

# STUDIO EPIDEMIOLOGICO E MOLECOLARE SULLA MALATTIA AUTOSOMICA DOMINANTE DEL RENE POLICISTICO (ADPKD) NELLA PROVINCIA DI VICENZA: POSSIBILE EFFETTO FONDATORE?

Valentina Corradi<sup>1,2</sup>, Fiorella Gastaldon<sup>1</sup>, Grazia Maria Virzi<sup>1,2</sup>, Maurizio Clementi<sup>3</sup>, Federico Nalesso<sup>1</sup>, Dinna N. Cruz<sup>1,2</sup>, Massimo de Cal<sup>1,2,4</sup>, Rossella Torregrossa<sup>1,2</sup>, Claudio Ronco<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Interaziendale di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

<sup>2</sup>IRRV-International Renal Research Institute, Vicenza

<sup>3</sup>Genetica Clinica, Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi, Padova

<sup>4</sup>Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi, Padova

## Epidemiological and molecular study of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in the province of Vicenza (a region of North Eastern Italy): a founder effect?

*Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common genetic renal disorder, with a prevalence of 1:400 to 1:1000. ADPKD is genetically and clinically heterogeneous. In addition, significant intrafamilial renal disease variability is evident. The prevalence of ADPKD patients on renal replacement therapy in Italy has been reported to be 8.2%. In the dialysis population of Vicenza province (northeast Italy), in one area especially, ADPKD cases account for 13.4%. We hypothesize that this high frequency is related to a founder effect in this geographically isolated population. Since April 2007 we have studied the characteristics of ADPKD patients and the presence of haplotypes shared by several families. The clinical profile of patients in the Vicenza province is similar to that described in the literature but there is a high prevalence of ADPKD in several isolated areas. These areas are characterized by the presence of three distinct haplotypes, suggesting a strong lineage-specific gene.*

Conflict of interest: None

Financial support: This study has been supported by Ricerca Sanitaria Finalizzata della Regione Veneto (RSF N. 261/06) on autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)

Informed consent: Both the protocol and the informed consent have been approved by Comitato Etico dell'Azienda Ulss 6 Vicenza - Ospedale San Bortolo (N. 47/07)

### KEY WORDS:

ADPKD,  
Linkage analysis,  
Founder effect,  
Cystic kidney  
disease,  
Family history

### PAROLE CHIAVE:

ADPKD,  
Analisi di  
linkage,  
Effetto  
fondatore,  
Malattie  
cistiche renali

### ✉ Indirizzo degli Autori:

Prof. Claudio Ronco  
Dipartimento Interaziendale di  
Nefrologia  
Dialisi e Trapianto Renale  
Ospedale "San Bortolo"  
Via Rodolfi 37  
36100 Vicenza  
e-mail: cronco@goldnet.it

## INTRODUZIONE

La malattia autosomica dominante del Rene Policistico (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, ADPKD - OMIM # 173900) è una malattia ereditaria monogenica, tra le più comuni nella popolazione. La sua incidenza è compresa tra 1:400 e 1:1000 nati vivi (1-3). La malattia policistica renale dell'adulto è diffusa in tutto il mondo, senza eccezioni di razza e sesso (4, 5). È la quarta causa di insufficienza renale cronica

negli USA rappresentando il 3% della popolazione dializzata, dopo il diabete (35%), l'ipertensione (24%) e le glomerulonefriti (15%) (6). In Europa 7.8 maschi e 6.0 femmine per milione sono affetti da ADPKD (7). Secondo i dati provenienti dai Registri Dialitici Nazionali, in Italia i pazienti ADPKD in trattamento dialitico costituiscono l'8.2% (8).

ADPKD è una malattia ad esordio tardivo, in genere i primi segni clinici si manifestano tra la terza e la quarta decade di vita (9). L'organo più gravemente

interessato è il rene, che appare grossolanamente ingrandito da cisti bilaterali, contenenti liquido, a livello dei tubuli renali (10). Sebbene solo una piccola percentuale (1-10%) dei nefroni sviluppi le cisti, l'intero organo subisce alterazioni strutturali e funzionali, fino a portare il 50% dei pazienti allo stadio finale della malattia renale in media entro i 60 anni (2). ADPKD è una patologia clinicamente eterogenea: vi sono, infatti, variazioni considerevoli nell'età di insorgenza persino all'interno della stessa famiglia.

La nefrolitiasi si osserva nel 20% dei casi e i calcoli più comunemente riscontrati sono quelli di ossalato di calcio e di acido urico (11). Nel 75% dei casi, la malattia è associata ad ipertensione arteriosa (12), causata da un'elevata attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, determinata dalla compressione delle cisti sulla vascolarizzazione renale e la conseguente ipoperfusione del parenchima renale.

ADPKD è in realtà una malattia sistemica. Le manifestazioni extrarenali sono frequenti: le cisti epatiche sono presenti nel 50-70% dei pazienti (13-15) e gli aneurismi cerebrali nel 5-10% dei pazienti asintomatici, con rischio di danno neurologico permanente o morte per emorragia sub-aracnoidea (16-20). Altre anomalie extrarenali associate ad ADPKD sono la diverticolosi del colon (16) e il prolasso delle valvola mitrale (25-30%) (16, 21).

La malattia policistica renale dell'adulto è geneticamente eterogenea. Nell'85% dei casi è correlata a mutazioni in *PKD1* (16p13.3), mentre nel rimanente 15% in *PKD2* (4q21-q23). Questi 2 geni codificano per due proteine di membrana (policistina-1 e policistina-2) localizzate sulla membrana e sulle ciglia del tubulo renale e dell'epitelio biliare. Il fenotipo di entrambe le forme è del tutto sovrapponibile, se si eccettua la minore severità e l'insorgenza tardiva della patologia nella forma ADPKD2. Questo indica che i prodotti genici di *PKD1* e *PKD2* sono coinvolti in un meccanismo comune, che è alterato in presenza di difetti nell'una o nell'altra proteina corrispondente. In entrambi i casi esiste una notevole variabilità nell'età di insorgenza e nella severità della malattia, anche in individui portatori della stessa mutazione. Questo suggerisce il coinvolgimento di geni modificatori, non direttamente responsabili dell'ADPKD. *PKD1* si colloca sul braccio corto del cromosoma 16 ed è suddiviso in 46 esoni; il suo RNA messaggero (mRNA) è lungo 14 kilobasi (Kb). La regione genomica di *PKD1* ha una struttura complessa: la porzione del gene compresa tra l'esone 1 e l'esone 33 è duplicata in 6 geni ad alta omologia. Ne deriva che solo la porzione 3' terminale del gene, corrispondente agli esoni 34-46, non è duplicata, cosa che ha rallentato di molto il sequenziamento completo di *PKD1* e ostacola a tutt'oggi, sotto il profilo tecnico, la ricerca delle mutazioni. Il gene *PKD2* clonato nel 1996 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 4 (4q21-

q23). È costituito da 15 esoni e codifica per un mRNA di circa 5.4 Kb. L'identificazione di *PKD1* e *PKD2* suscitò un grande interesse circa le loro varianti, nonostante le difficoltà incontrate e il loro alto livello di eterogeneità allelica. Tale fu l'interesse che nel 2007 Gout et al. (22), svilupparono un *database* che oggi racchiude tutte le varianti patogenetiche germinali e somatiche identificate per *PKD1* e *PKD2*, i polimorfismi e le varianti indeterminate. Questo *database*, costantemente aggiornato, è accessibile *online* gratuitamente all'indirizzo <http://pkdb.mayo.edu><sup>(c)</sup> (2007 Wiley-Liss, Inc).

Dall'Aprile 2007 a Dicembre 2009 nell'area afferente al Dipartimento Interaziendale di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale dell'Ospedale di Vicenza si è sviluppato un progetto, nato dall'osservazione

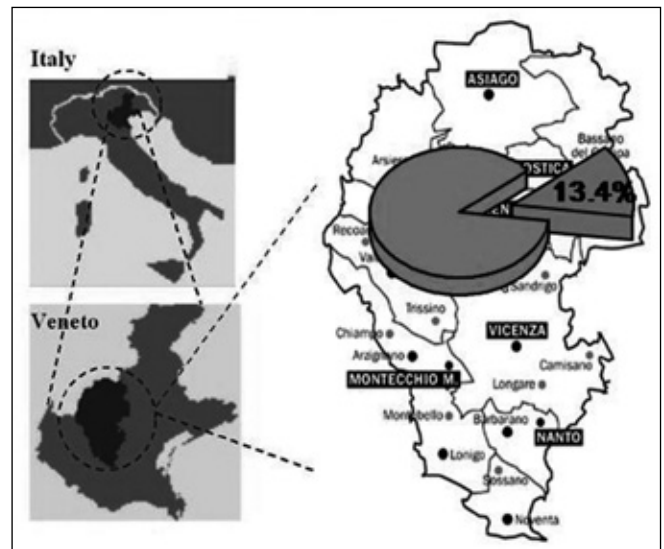


Fig. 1 - Prevalenza dei pazienti ADPKD in trattamento dialitico nella provincia di Vicenza.

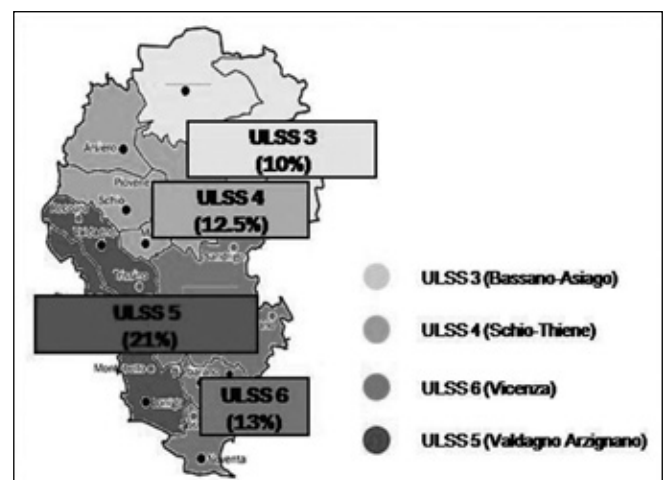


Fig. 2 - Prevalenza dei pazienti ADPKD in trattamento dialitico divisa per aree della provincia di Vicenza.

di una maggiore prevalenza (13.4%) di ADPKD tra i pazienti dializzati nell'area afferente al Dipartimento stesso (Fig. 1). Questo dato ci ha indotti ad ipotizzare la possibile presenza di "un effetto fondatore" nella Provincia ed in particolare in due isolati geografici che evidenziavano una significativa prevalenza tra i pazienti in trattamento dialitico (Fig. 2). Questa indagine, unica nel suo genere, si è proposta due obiettivi principali: analizzare la prevalenza di ADPKD e verificare la presenza di un aplotipo comune a più famiglie, che potesse spiegare l'elevata prevalenza della malattia in alcuni isolati geografici. L'obiettivo finale dello studio era l'individuazione di un metodo diagnostico genetico-molecolare disegnato *ad hoc* per i pazienti ADPKD della provincia di Vicenza da affiancare a quello geografico, per una diagnosi più precoce della malattia.

## MATERIALI E METODI

Il protocollo di studio ha previsto due fasi: una *clinico-epidemiologica* con il reclutamento e l'anamnesi familiare di tutti i probandi, afferenti a queste aree, e delle loro famiglie, raccogliendone i dati clinici e familiari; ed una fase *genetico-molecolare* con la stesura degli alberi genealogici di ogni probando e l'analisi di *linkage* per la determinazione degli aplotipi associati alla malattia.

### FASE CLINICO-EPIDEMIOLOGICO

#### Arruolamento e valutazione clinica dei pazienti e delle loro famiglie

Dall'Aprile 2007 sono stati arruolati tutti i pazienti ADPKD afferenti al Dipartimento (la provincia di Vicenza conta approssimativamente 800000 abitanti). La diagnosi di ADPKD si è basata sull'ultrasonografia, secondo i criteri descritti da Ravine et al. (23) al momento dell'arruolamento, ossia la presenza di almeno due cisti renali (unilaterali o bilaterali) nei soggetti di età compresa tra 15 e 30 anni; due cisti in ogni rene in età compresa tra 30 e 59 anni; quattro cisti in ogni rene in età maggiore a 60 anni. Nel 2009 questi criteri sono stati rivisti, in particolare nella fascia 15-39 anni in cui devono essere presenti almeno tre cisti renali uni o bilaterali. Rimangono invariati i criteri nelle fasce di età comprese tra 40-59 e  $\geq 60$  anni (24).

Per ogni paziente sono stati raccolti i dati anagrafici, clinici e familiari completi. I dati anagrafici comprendono età, età alla diagnosi e sesso. I dati clinici raccolti comprendono il motivo e metodo dell'accerimento diagnostico (*screening* familiare, sintomatologia renale o accidentale), provenienza del paziente

(controllo ambulatoriale, trattamento sostitutivo dialitico, controllo post-trapianto), i livelli di creatinina alla diagnosi, le comorbidità (ipertensione, diabete, calcoli renali, cancro renale), le complicazioni/associazioni renali (emorragia cerebrale, nefrectomia, cisti epatiche), progressione renale e tutti i dati relativi alla terapia sostitutiva renale, se in atto. Per questo studio la diagnosi di CKD (*Chronic Kidney Disease*) è stata definita con valore di creatinina plasmatica maggiore a 1.2 mg/dL, mediante metodo enzimatico spettrofotometrico, in accordo con gli *standard* forniti dal Laboratorio di Chimica Clinica del nostro Ospedale. Tutti i dati clinici e anagrafici dei probandi sono stati inseriti in un *database* dedicato.

I criteri di inclusione alla fase genetico-molecolare sono stati i seguenti: il primo affetto della famiglia, descritto dal probando, doveva risultare nativo nella provincia di Vicenza ed ogni famiglia caratterizzata da almeno due generazioni di individui affetti.

### FASE GENETICO-MOLECOLARE

#### Analisi di *linkage* e sequenziamento diretto

All'anamnesi familiare, in cui sono state raccolte le informazioni anagrafiche di almeno tre generazioni (compreso il probando) e i relativi dati clinici, è seguita la stesura dell'albero genealogico utilizzando il programma *Gene.exe*.

Ad ogni individuo arruolato per l'analisi di *linkage* sono stati prelevati 9 mL di sangue venoso periferico in tubi contenenti EDTA. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit commerciale Genra Puregene Blood Kit® (QIAGEN).

L'analisi di *linkage* è l'analisi genetica indiretta scelta per l'individuazione del gene correlato ad ADPKD e la ricerca degli aplotipi associati alla malattia, nelle famiglie informative, vista la variabilità genetica e la complessità dei geni coinvolti.

Per l'analisi sono stati utilizzati 10 marcatori microsatelliti (STR, *short tandem repeats*) fiancheggiati i due geni: per *PKD1*, chr 16: telomero D16S3024(TG)<sub>21</sub>, D16S3395(ATT)<sub>15</sub>, KG8 [intragamico](CA)<sub>9</sub>, D16S291(CA)<sub>20</sub>, D16S663(TG)<sub>28</sub> centromero; per *PKD2*, chr 4: centromero VG2(TG)<sub>13</sub>, VG3 [intragamico](TA)<sub>4</sub>GA<sub>13</sub>:NN<sub>27</sub>, VG4 (CA)<sub>18</sub>, D4S2929 (AC)<sub>15</sub>, D4S1563 (TG)<sub>19</sub> telomero (Figg. 3 e 4). Alcuni di questi sono marcatori convenzionalmente usati, scelti consultando la letteratura. Mentre VG2, VG3 e VG4 sono marcatori disegnati nel nostro laboratorio. La scelta si è basata essenzialmente su tre criteri fondamentali: la vicinanza al gene di interesse (entro 2cM), il numero di repeat ( $\geq 9$ ) e il valore di eterozigosità (HET). L'eterozigosità dei marcatori VG2, VG3 e VG4 è stata

calcolata in 100 controlli sani di età compresa tra i 18 e i 65 anni di ambo i sessi. L'eterozigotità (HET) e la frequenza allelica sono state valutate utilizzando il software GENEPOP (versione 2.1).

Per il disegno dei primers è stato utilizzato il programma Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) disponibile nel Web ad opera del *Whitehead Institute*. Tutti i primers forward per gli STR sono marcati con un fluorocromo

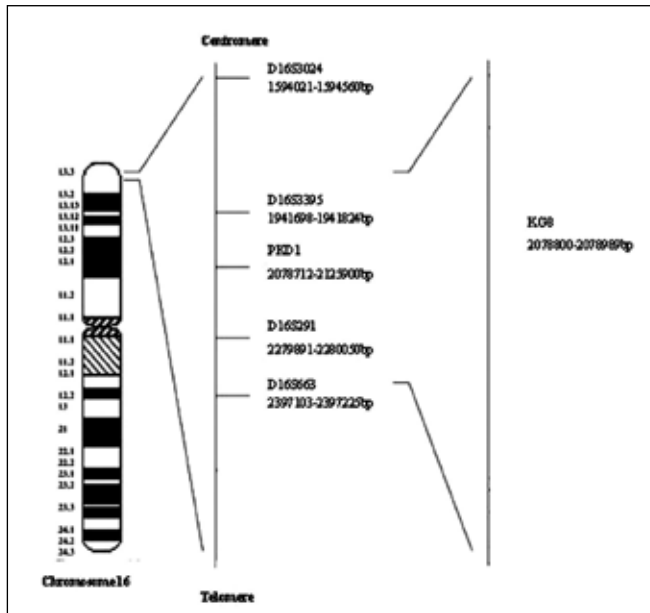


Fig. 3 - Mappa fisica dei marcatori microsatelliti relativi a PKD1 (16p13.3) e loro posizioni [bp].

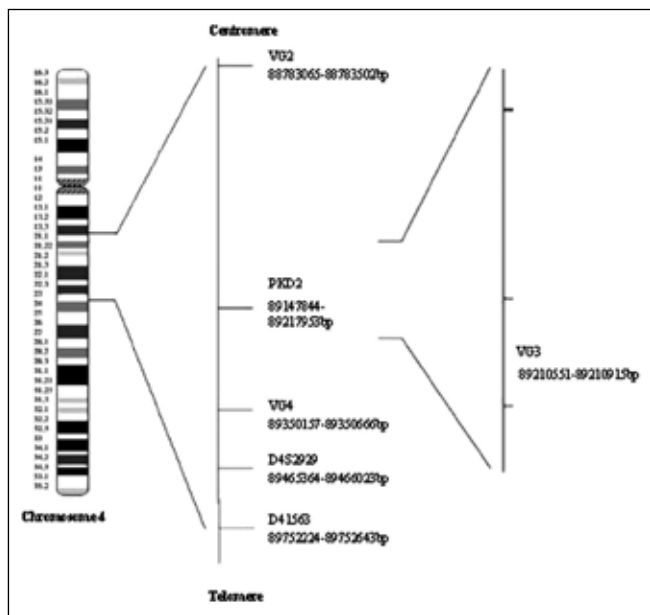


Fig. 4 - Mappa fisica dei marcatori microsatelliti relativi a PKD2 (4q21-q23) e loro posizioni [bp].

all'estremità 5'. Le PCR sono state realizzate in un volume finale variabile compreso tra 25  $\mu$ L e 50  $\mu$ L, con tre enzimi diversi secondo le condizioni di amplificazione dello specifico marcatore: AmpliTaqGold® (Applied Biosystems), Phusion High-Fidelity DNA Polymerase® (Finnzymes) e TaKaRa Taq™ (TAKARA BIO INC).

Successivamente i frammenti derivati da ciascuna amplificazione sono stati analizzati mediante il sequenziatore automatico, AB 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'analisi degli elettroferogrammi è stata realizzata con il software GeneMapper® Software v4.0.

I campioni di DNA caratterizzati dallo stesso aplotipo PKD2, all'analisi di linkage, sono stati sottoposti a sequenziamento diretto, utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130®.

**TABELLA I - CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PRIMI 100 PAZIENTI ARRUOLATI. LE VARIABILI CATEGORICHE SONO ESPRESSE IN PERCENTUALE; LE VARIABILI CONTINUE IN MEDIANA (RANGE: MINIMO-MASSIMO)**

Caratteristiche	ADPKD (N=100)
<b>Dati anagrafici</b>	
Età all'anamnesi, anni	48 (range: 11-80)
Età alla diagnosi, anni	29 (range: 5-69)
Maschi, (%)	58
<b>Motivo dell'accertamento diagnostico (%)</b>	
Screening	51
Accidentale	10
Problemi renali	39
Familiarità per ADPKD (%)	86
<b>Quadro clinico</b>	
<b>Comorbidità (%)</b>	
Iperensione	75
Calcoli Renali	24
Diabete Mellito	4
Neoplasia Renale	1
<b>Complicazioni/Associazioni (%)</b>	
Cisti epatiche	40
Nefrectomia per:	15
Neoplasia renale	1
Trapianto renale	6
altre cause	8
Malattie Cardiovascolari	5
Emorragia Cerebrale	4
Malattie Cerebrovascolari	2
<b>Pazienti CKD stage V all'anamnesi (%)</b>	29
<b>Pazienti non CKD stage V all'anamnesi (%)</b>	71
Valore di creatinina >1.2 mg/dL, alla diagnosi ADPKD	30 (42.3)
<b>Sociali (%)</b>	
Fumatori	22
Consumatori regolari di caffeina	55

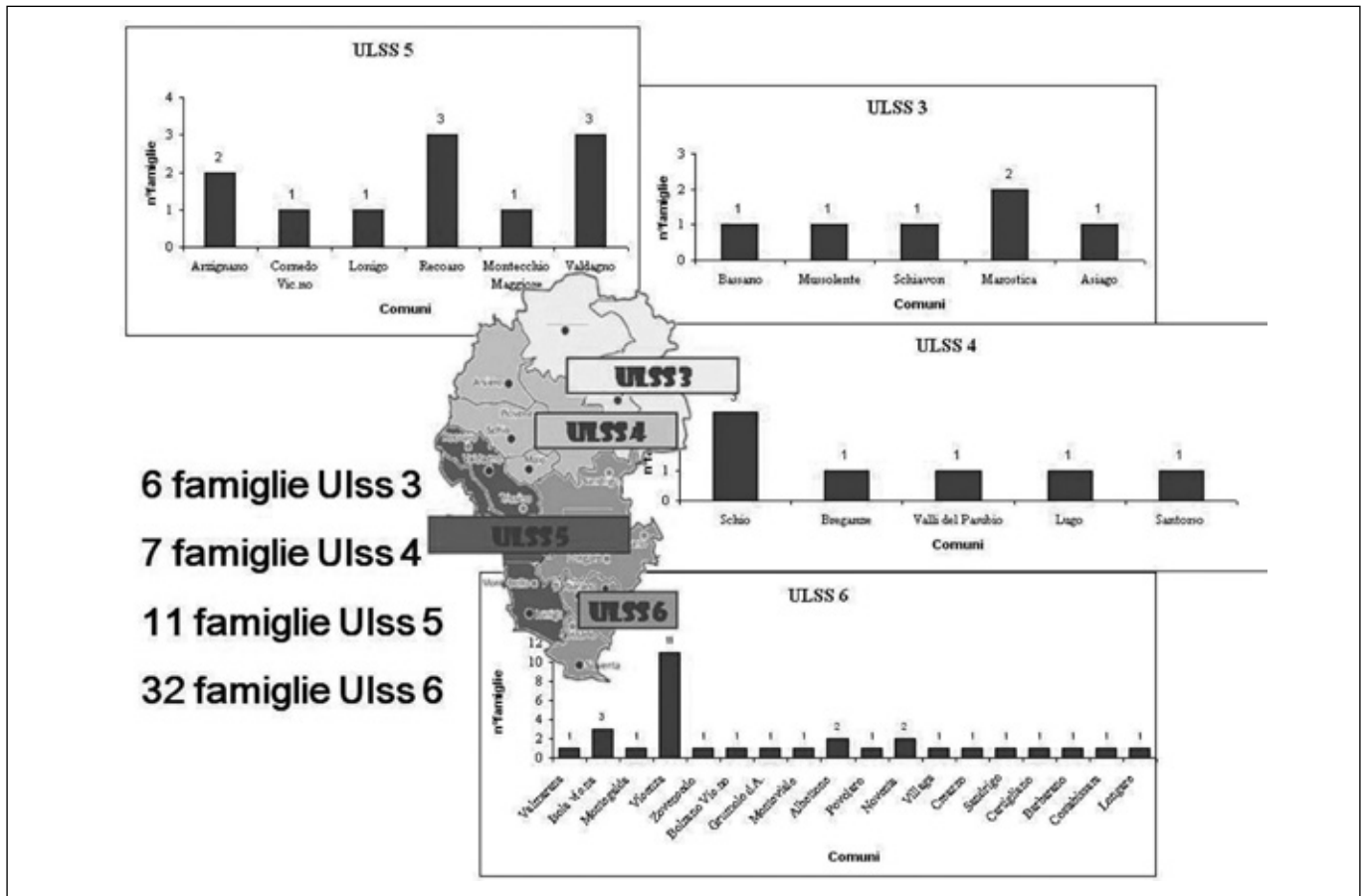


Fig. 5 - Comuni di appartenenza delle famiglie suddivise per ULSS di appartenenza.

**RISULTATI**

Dall'Aprile 2007 i dati raccolti attraverso 152 anamnesi di pazienti ADPKD, nella provincia di Vicenza, hanno permesso l'identificazione di 68 famiglie, caratterizzate da 233 individui affetti da ADPKD. In seguito, alla consultazione dei database impiegati nel Centro Trapianti e nell'Ambulatorio del Dipartimento, il numero degli individui affetti da ADPKD, giunti almeno una volta in Dipartimento, ammontava a 333.

Delle 68 famiglie individuate, 12 sono risultate non essere native della Provincia (2 Catanzaro, 1 Messina, 1 Agrigento, 1 Lecce, 1 Ferrara, 4 Padova, 1 Verona e infine 1 Trieste) e pertanto escluse dallo studio. Le rimanenti 56 famiglie sono provenienti da Comuni differenti: 6 provengono dalla zona afferente all'ULSS 3, 7 dall'ULSS 4, 11 dall'ULSS 5 e 32 dall'ULSS 6 (Fig. 5).

Nella Tabella I si possono osservare le caratteristiche cliniche dei primi 100 pazienti ADPKD (58 M), appartenenti a 42 famiglie, dall'età mediana di 48 anni (range: 11-80). Dieci pazienti sono stati accidentalmente diagnosticati, 51 per screening familiare e 39 per dolori/sintomi renali. Tra le comorbidità, l'iperten-

sione è presente nel 75% dei casi, i calcoli renali nel 24% mentre il diabete mellito nel 4%. Tra le complicazioni renali: le cisti epatiche sono presenti nel 40% dei pazienti e le nefrectomie uni/bi-laterale nel 15% dei casi. L'86% dei pazienti riportava storia familiare positiva, di cui il 95% in grado di descrivere la storia clinica del parente affetto.

L'analisi di linkage è stata esclusa in 46 delle 68 famiglie. Ventisei famiglie non rispettavano i criteri di inclusione (vedi Materiali e Metodi): 12 famiglie per provenienza del "fondatore", 12 per numerosità di affetti e 2 per scarsità di informazioni. Nelle rimanenti 20 famiglie l'analisi non si è realizzata per impossibilità di organizzare i prelievi ai familiari dei probandi per motivi di orario, disponibilità lavorativa, distanza o negazione allo studio (quest'ultimo punto solamente in 4 famiglie).

Pertanto, l'analisi di linkage si è potuta concludere in 22 famiglie, per un totale di 201 individui genotipizzati per ciascuno dei 10 marcatori microsatelliti selezionati. L'analisi ha evidenziato 15 famiglie associate a PKD1 e 5 a PKD2. In 2 famiglie l'analisi è risultata di dubbia associazione.

TABELLA II - APLOTIPI E LUOGO DI PROVENIENZA DELLE FAMIGLIE PKD1-LINKAGE

Fam.	Luogo di provenienza	TEL-3024 (TG)/3395 (ATT)/KG8 (CA)/291 (CA)/663 (TG)-CEN
1	Arzignano	28/14/5/21/28
2	<b>Valmarana</b>	<b>25/15/5/19/26</b>
8	Santorso	25/14/3/19/28
10	Bolzano Vic.no	27/15/5/17/27
20	<b>Cornedo Vic.no</b>	<b>25/15/5/19/26</b>
21	Valli del Pasubio	27/14/5/22/26
25	Marostica	29/15/5/21/29
35	Lugo	25/14/5/20/26
36	<b>Recoaro</b>	<b>27/14/5/19/30</b>
37	<b>Vicenza</b>	<b>25/15/5/19/26</b>
43	Cartigliano	11/14/3/21/29
50	Isola vic.na	26/15/3/17/29
52	Schio	29/15/3/17/28
56	<b>Recoaro</b>	<b>27/14/5/19/30</b>
58	<b>Recoaro</b>	<b>27/14/5/19/30</b>

TABELLA III - APLOTIPI E LUOGO DI PROVENIENZA DELLE FAMIGLIE PKD2-LINKAGE

Fam.	Luogo di provenienza	CEN-VG2 (TG)/VG3 (TA+GA)/VG4 (CA)/2929 (AC)/1563 (TG)-TEL
3	Isola vic.na	22/33/13/27/21
4	Isola vic.na	22/33/13/27/21
15	Monteviale	14/31/13/14/21
22	Schiavon	14/27/13/14/25
26	<b>Povolaro</b>	<b>22/33/13/27/21</b>

Nelle famiglie associate a *PKD1* abbiamo identificato 11 aplotipi associati alla malattia. Nelle Tabelle II e III si possono osservare le famiglie analizzate, il luogo di provenienza e gli aplotipi identificati. Nelle famiglie 002-020-037 l'aplotipo associato a *PKD1*, che segrega con la malattia, è risultato lo stesso e precisamente: cromosoma 16 TEL-D16S3024 (TG)<sub>25</sub>, D16S3395 (ATT)<sub>15</sub>, KG8 (CA)<sub>5</sub>, D16S291 (CA)<sub>19</sub>, D16S663 (TG)<sub>26</sub>-CEN. Le famiglie 036-058-056 presentavano lo stesso aplotipo associato a *PKD1* e precisamente: cromosoma 16 TEL-D16S3024 (TG)<sub>27</sub>, D16S3395 (ATT)<sub>14</sub>, KG8 (CA)<sub>5</sub>, D16S291 (CA)<sub>19</sub>, D16S663 (TG)<sub>30</sub>-CEN.

Nelle famiglie associate a *PKD2* abbiamo identificato 3 aplotipi associati alla malattia. Anche in questo caso in tre famiglie, 003-004-026, l'aplotipo associato a *PKD2* identificato è risultato lo stesso: **cromosoma 4 CEN- VG2 (TG)<sub>22</sub>, VG3 (TA+GA)<sub>33</sub>, VG4 (CA)<sub>13</sub>, D4S2929 (AC)<sub>27</sub>, D4S1563 (TG)<sub>21</sub>-TEL.**

I campioni dei pazienti ADPKD appartenenti alle famiglie 003-004-026, con aplotipo relativo a *PKD2*,

**cromosoma 4 CEN- VG2 (TG)<sub>22</sub>, VG3 (TA+GA)<sub>33</sub>, VG4 (CA)<sub>13</sub>, 2929 (AC)<sub>27</sub>, 1563 (TG)<sub>21</sub>-TEL**, sono stati ulteriormente analizzati. L'analisi di sequenza delle 15 regioni esoniche del gene *PKD2* ha permesso di riscontrare una variazione in eterozigosi nell'esone 14, definita patogena, in seguito alla consultazione del database ADPKD, e pertanto ritenuta responsabile della malattia. Infatti, la mutazione non senso R845X, caratterizzata da un cambiamento nucleotidico 2533C>T (Arg845X), è classificata come mutazione germinale responsabile di ADPKD (tipo 2) (25).

L'analisi di sequenza estesa a tutti i componenti delle tre famiglie ha confermato l'identificazione della mutazione germinale (R845X) negli affetti e la sua assenza nei sani.

Infine, i tre marcatori microsatelliti disegnati nel nostro laboratorio, VG2-VG3-VG4, utilizzati nell'analisi di linkage delle 22 famiglie, risultano avere un'eterozigotità (HET) comparabile a quella determinata nei controlli sani. Il calcolo delle frequenze alleliche per il calcolo delle HET per ciascun marcatore è stato verificato con l'ausilio del programma GENEPOP versione 1.2 [Genepop (web version) - Option 5 (Allele Frequencies, ecc.)]. Il marcatore VG3 ha un motivo ripetuto caratterizzato da due ripetizioni dinucleotidiche in tandem: 14 TA seguiti da 13 GA. Per questa "repeat" sono stati distinti 12 diversi alleli: la repeat (TA+GA)<sub>27</sub> si mostra la più frequente (frequenza=0.46); il marcatore VG4 presenta 5 alleli, il cui più frequente (0.51) risulta (CA)<sub>13</sub>. Infine il marcatore VG2 presenta 10 variazioni alleliche con repeat (TG)<sub>14</sub> maggiormente frequente (0.55).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati raccolti attraverso le 152 anamnesi dei pazienti ADPKD afferenti al Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale di Vicenza hanno permesso di descrivere le caratteristiche cliniche del nostro campione. Il profilo clinico dei primi 100 pazienti ADPKD della provincia di Vicenza è sostanzialmente simile a quello descritto in letteratura. Nel nostro studio non c'è un sesso maggiormente rappresentato (58 maschi, 42 femmine), in accordo con i recenti reports (26). L'ipertensione e i calcoli renali sono frequenti nel 75% e nel 24% rispettivamente, come già descritto (11, 12). Il carcinoma renale è stato diagnosticato in un unico caso, dato che conferma la sua eccezionalità tra le comorbidità in ADPKD (27). Infine la malattia è imputabile nell'84% a *PKD1* e nel 16% a *PKD2* dei pazienti analizzati per linkage, come riportato in letteratura (28).

Questo dato ci ha permesso di sottolineare come la provincia di Vicenza non sia caratterizzata globalmente da un'anomala prevalenza di ADPKD, ma lo

sia invece in alcuni isolati geografici. Assumendo che la prevalenza di ADPKD sia di circa 1:1000 (1-3), la Provincia di Vicenza, caratterizzata da una popolazione di 800000 abitanti, dovrebbe stimare all'incirca 800 pazienti affetti. Nonostante ciò, le informazioni raggruppate attraverso la stesura degli alberi genealogici, le anamnesi familiari e la consultazione dei database impiegati nel Centro Trapianti e nell'Ambulatorio del Dipartimento di Nefrologia, hanno permesso di stimare 333 affetti da ADPKD nella Provincia.

Sicuramente il dato è sottostimato: in parte per la silente sintomatologia della malattia, che di per sé non si dimostra almeno fino ai 30-40 anni (9) e molto più tardivamente se si tratta della forma ADPKD2 (29). Si possono notare, infatti, alcune peculiarità a dimostrazione di ciò: il campione di pazienti descritto è caratterizzato da una età mediana di 48 anni, solamente il 29% è a funzione renale terminale ed il 30% presenta un valore di creatinina plasmatica alterato.

Il secondo motivo per cui il nostro dato potrebbe essere sottostimato è la diagnosi di falsi negativi, tra gli individui giovani che all'esame ecografico non manifestano cisti (in particolare nelle forme ADPKD2).

L'analisi di *linkage* ha permesso di identificare sia in *PKD1* che in *PKD2* aplotipi comuni in famiglie diverse, apparentemente non imparentate tra loro.

Mentre nelle famiglie 002-020-037, associate allo stesso aplotipo-*PKD1* segregante con la malattia, abbiamo riscontrato un individuo in comune, le famiglie 036-058-056 non presentano alcuna relazione di parentela, nonostante siano provenienti dallo stesso comune (Recoaro). In entrambi i casi purtroppo l'analisi di sequenze del gene *PKD1* non si è resa possibile (vedi Introduzione).

Diversamente invece, nelle tre famiglie 003-004-026 con stesso aplotipo-*PKD2*, ulteriori approfondimenti hanno evidenziato un individuo in comune tra la famiglia 003 e 004, ma nessuno con la famiglia 026. Infatti, le famiglie 003 e 004 derivano dalla stessa area geografica, ma non risultano a conoscenza della loro parentela. La famiglia 026 invece non ha origine nella stessa area e il probando non riferisce dati a generazioni precedenti alla sua. Nonostante ciò, in seguito al sequenziamento diretto del gene *PKD2*, è stata identificata la stessa mutazione in tutti gli individui affetti, in ognuna delle tre famiglie.

Questo risultato, confermato dall'identificazione della stessa mutazione, potrebbe rappresentare un primo dato a favore dell'ipotesi "effetto fondatore", come possibile spiegazione di una maggiore prevalenza della malattia in alcuni isolati geografici. Ipotesi ragionevole, considerando il contesto geografico del territorio. La Provincia di Vicenza, infatti, conta 121 comuni per la storica parcellizzazione del territorio (la più alta del Veneto) ed è caratterizzata da molti co-

muni montani. Supponiamo che, in seguito ad eventi casuali o ambientali, una popolazione originaria si sia frammentata dando origine a diversi gruppi caratterizzati da un piccolo numero di individui. Questi ultimi avranno dato origine ad una popolazione differente da quella originale, sia geneticamente che fenotipicamente. In particolare avranno "portato con sé" alcuni caratteri, portati da uno o più individui con l'effetto di far permanere solamente determinati alleli nella popolazione. Questo determinerà una minore variabilità genetica rispetto alla popolazione originale.

Tale fenomeno noto come "effetto del fondatore" potrebbe spiegare il perché di alcuni "nuclei familiari" associati ad un aplotipo in una determinata area.

Tenendo presente queste considerazioni è immediato immaginare il perché sia utile la messa a punto di un'analisi genetica pre-sintomatica *ad hoc* per la nostra Provincia, in grado di affiancare la diagnostica ecografica. Non avendo la presunzione di rappresentare un centro di riferimento per ADPKD, i risultati dell'analisi di *linkage* disegnata ad hoc per il nostro campione dimostrano come i marcatori da noi selezionati possano tracciare l'ereditarietà dell'ADPKD, identificando il gene responsabile della malattia nella famiglia. I marcatori selezionati in letteratura (D16S3024, D16S3395, KG8, D16S291 e D16S663 nel cromosoma 16 e D4S2929, D4S1563 nel cromosoma 4) e i tre marcatori individuati nel nostro Laboratorio (VG1, VG2, VG3 nel cromosoma 4) risultano sufficientemente polimorfici e informativi nelle famiglie analizzate, con accettabili eterozigotità. Inoltre la presenza di marcatori intragenici (KG8 intragenico a *PKD1* e VG3 a *PKD2*), strettamente associati ai due geni imputati, rende la predizione del genotipo di un individuo a rischio più sicura, riducendone l'errore. Infatti, l'accuratezza diagnostica di questi risultati dipende dalla probabilità che il gene responsabile della malattia sia effettivamente quello associato ai suddetti marcatori e dalla frequenza di ricombinazione tra i marcatori stessi e i geni malattia. In base a quanto finora noto e ai risultati ottenuti, l'accuratezza di questa analisi è risultata non essere inferiore al 99%. L'analisi quindi potrebbe risultare efficace per realizzare la diagnosi pre-sintomatica dell'ADPKD, come approccio età-indipendente, a differenza dell'ecografia.

Qualcuno potrebbe chiedersi quale sia la necessità di una diagnosi precoce della malattia, non esistendo ancor'oggi una reale terapia per ADPKD. Noi riteniamo che la consulenza genetica e la conseguente analisi genetica siano importanti ed indicati in famiglie ADPKD. Ad esempio nei casi in cui si debba procedere con lo screening dei potenziali donatori di rene consanguinei. In aggiunta, una diagnosi precoce di ADPKD permette di attuare il prima possibile tutte quelle misure atte a rallentare l'evoluzione della ma-

lattia e quindi il progressivo deterioramento della funzione renale.

Concludendo, il profilo clinico dei pazienti ADPKD della provincia di Vicenza è sostanzialmente simile a quello descritto in letteratura, osservazioni pubblicate recentemente (30). L'analisi di *linkage* disegnata ad hoc per il nostro campione, dimostra come i marcatori microsatelliti da noi selezionati, sette in letteratura (D16S3024, D16S3395, KG8, D16S291 e D16S663 nel cromosoma 16 e D4S2929, D4S1563 nel cromosoma 4) e tre individuati nel nostro Laboratorio (VG1, VG2, VG3 nel cromosoma 4), possano tracciare l'ereditarietà dell'ADPKD, identificando il gene responsabile della malattia nella famiglia. Inoltre, il territorio non risulta caratterizzato da un unico aplotipo caratteristico, bensì da tre diversi aplotipi risultanti comuni a più famiglie (due *PKD1-linkage* e uno *PKD2-linkage*) caratteristici di alcuni isolati geografici. Questo supporta l'ipotesi della presenza di alcuni fondatori caratteristici di alcuni isolati geografici piuttosto che di un unico fondatore per tutta la Provincia di Vicenza. Questi dati ci permettono di dare una possibile spiegazione della maggiore prevalenza di ADPKD tra i pazienti in trattamento dialitico.

## RIASSUNTO

*La malattia autosomica dominante del Rene Policistico (ADPKD) ha un'incidenza compresa tra 1:400 e 1:1000. È una malattia ad esordio tardivo, geneticamente e clinicamente eterogenea. È la principale causa genetica di insufficienza renale in età adulta. In Italia i pazienti ADPKD in trattamento dialitico costituiscono l'8.2%; nella provincia di Vicenza rappresentano il 13.4%. Questo dato ci ha indotto ad ipotizzare la possibile presenza di "un effetto fondatore", nella Provincia ed in particolare in due isolati geografici che evidenziavano una significativa prevalenza tra i pazienti in trattamento dialitico. L'indagine, svol-*

*ta presso il Dipartimento di Nefrologia dell'Ospedale di Vicenza, si è proposta 2 obiettivi principali: analizzare la prevalenza di ADPKD e verificare la presenza di un 'aplotipo' comune a più famiglie. Il profilo clinico dei pazienti ADPKD della Provincia è sostanzialmente simile a quello descritto in letteratura. Questo dato ci ha permesso di sottolineare come la provincia di Vicenza non sia caratterizzata globalmente da un'anomala prevalenza di ADPKD, ma lo sia invece in alcuni isolati geografici. Il territorio, infatti, non risulta caratterizzato da un unico aplotipo caratteristico, ma da tre aplotipi diversi comuni a più famiglie, caratteristici di alcuni isolati geografici.*

## RINGRAZIAMENTI

Un doveroso grazie ai pazienti arruolati nello studio e alle loro famiglie; allo "Staff" del Dipartimento di Nefrologia dell'Ospedale di Vicenza e a tutti coloro che hanno contribuito attivamente alla realizzazione di questo lavoro.

## DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

## CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI

Questo studio è stato supportato dalla Ricerca Sanitaria Finalizzata della Regione Veneto (RSF N. 261/06) sulla malattia autosomica dominante del Rene Policistico (ADPKD).

## STUDI SPERIMENTALI SU ESSERI UMANI

Il protocollo e il consenso informato sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Azienda Ulss 6 Vicenza - Ospedale San Bortolo (N. 47/07).

## BIBLIOGRAFIA

1. Davies F, Coles GA, Harper PS, Williams AJ, Evans C, Cochlin D. Polycystic kidney disease re-evaluated: a population-based study. *Q J Med* 1991; 79: 477-85.
2. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993; 329: 332-42.
3. Levy M, Feingold J. Estimating prevalence in single-gene kidney diseases progressing to renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 925-43.
4. Yersin C, Bovet P, Wauters JP, Schorderet DF, Pescia G, Paccaud F. Frequency and impact of autosomal dominant polycystic kidney disease in the Seychelles (Indian Ocean). *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 (10): 2069-74.
5. Freedman BI, Soucie JM, Chapman A, Krisher J, McClellan WM. Racial variation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (1): 35-9.
6. USRDS 2008. United States renal data system 2008 report. Available at: <http://www.usrds.org/adr.htm>. Accessed at February 11, 2009.
7. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007; 369 (9569): 1287-301.
8. ERA-EDTA 2006. European Renal Association-European Dialysis Transplant Association Registry 2006 Annual Report. Available at: <http://www.era-edta-reg.org/index.jsp>. Accessed at February 11, 2009.



9. Harrison. Principi di Medicina Interna 14° edizione; volume 2, Parte 10, Cap. 268.
10. Wilson PD. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 151-64.
11. Torres VE, Wilson DM, Hattery RR, Segura JW. Renal stone disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1993; 22 (4): 513-9.
12. Chapman AB, Johnson A, Gabow PA, Schrier RW. The renin-angiotensin-aldosterone system and autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1990; 323 (16): 1091-6.
13. Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Manco-Johnson ML, Duley IT, Everson GT. Risk factors for the development of hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hepatology* 1990; 11 (6): 1033-7.
14. Everson GT. Hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1993; 22 (4): 520-5.
15. Chauveau D, Fakhouri F, Grünfeld JP. Liver involvement in autosomal-dominant polycystic kidney disease: therapeutic dilemma. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1767-75.
16. Fick GM, Gabow PA. Hereditary and acquired cystic disease of the kidney. *Kidney Int* 1994; 46: 951-64.
17. Watson ML. Complications of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1997; 51: 353-65.
18. Chapman AB, Rubinstein D, Hughes R, et al. Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1992; 327: 916-20.
19. Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO. Sacular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3: 88-95.
20. Huston J 3rd, Torres VE, Sullivan PP, Offord KP, Wiebers DO. Value of magnetic resonance angiography for the detection of intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1871-7.
21. Lumiaho A, Ikaheimo R, Miettinen R, et al. Mitral valve prolapse and mitral regurgitation are common in patients with polycystic kidney disease type 1. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 1208-16.
22. Gout AM, Martin NC, Brown AF, Ravine D. PKDB: Polycystic Kidney Disease Mutation Database--a gene variant database for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mutat* 2007; 28: 654-9.
23. Ravine D, Gibson RN, Walker RG, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DM. Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *Lancet* 1994; 343 (8901): 824-7.
24. Pei Y, Obaji J, Dupuis A, et al. Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 2009 Jan; 20 (1): 205-12.
25. Deltas CC. Mutations of the human polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Hum Mutat* 2001; 18 (1): 13-24.
26. Nunes AC, Milani V, Porsch DB, et al. Frequency and clinical profile of patients with polycystic kidney disease in southern Brazil. *Ren Fail* 2008; 30 (2): 169-73.
27. Keith DS, Torres VE, King BF, Zincki H, Farrow GM. Renal cell carcinoma in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4 (9): 1661-9.
28. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease: the complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell* 1995; 81: 289-98.
29. Torra R, Badenas C, Pérez-Oller L, et al. Increased prevalence of polycystic kidney disease type 2 among elderly polycystic patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 36 (4): 728-34.
30. Corradi V, Gastaldon F, Virzi GM, et al. Clinical pattern of adult polycystic kidney disease in a northeastern region of Italy. *Clin Nephrol* 2009; 72 (4): 259-67.