



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**EL GEN *ANRIL* COM A MARCADOR D'EPISODIS
CARDIOVASCULARS EN PACIENTS AMB
MALALTIA RENAL CRÒNICA**

TESI DOCTORAL

Ariadna Arbiol Roca

Juliol 2018

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOQUÍMICA, BIOLOGIA
MOLECULAR I BIOMEDICINA

**EL GEN *ANRIL* COM A MARCADOR D'EPISODIS
CARDIOVASCULARS EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL
CRÒNICA**

Tesi doctoral presentada per **Ariadna Arbiol Roca** per optar al Grau de **Doctora en
Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina**

La doctoranda:

Ariadna Arbiol Roca

Les Directores de tesi:

Dra. Núria Lloberas Blanch

Dra. Ariadna Padró Miquel

La Tutora de tesi:

Dra. Francesca Canalias Reverter

*Als meus pares,
a la meva germana
i al Víctor*

AGRAÏMENTS

Haver arribat el moment d'escriure els agraïments és un moment de records i de mirar enrere. Després de 4 anys a la Facultat de Química UB, 2 anys de Bioquímica UB, un duríssim QIR i 4 anys de residència de Bioquímica Clínica a l'Hospital Universitari de Bellvitge, per fi puc escriure els agraïments d'aquesta tesi doctoral.

M'agradaria donar les gràcies a tothom, que d'una manera o altra, han estat amb mi durant la realització d'aquesta tesi i que per tant, formen part d'una etapa molt important de la meva vida.

Els meus primers agraïments són per les directores d'aquesta tesi, Dra. Núria Lloberas Blanch i Dra. Ariadna Padró Miquel. Per donar-me l'oportunitat de participar en aquest projecte de recerca, per tot el que m'heu ensenyat, per la vostra disponibilitat i accessibilitat, per la vostra predisposició, paciència i per haver confiat en mi. A l'Ariadna per tenir el cap tan ben estructurat, per ser una facultativa exemplar i un model a seguir i pel miler d'hores que ha dedicat a aquesta tesi, gràcies de tot cor! Sense tu aquesta tesi no seria el mateix. A la Núria per obrir-me les portes al món de la nefrologia, per la disponibilitat dels mitjans per a dur a terme aquesta tesi, per la seva empenta i el seu positivisme, i per tot i tenir mil coses al cap, sempre trobar un moment per a mi. A la vegada, donar les gràcies a la Dra. Francesca Canalias, per acceptar tutoritzar aquesta tesi des del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB i per la seva ajuda amb tots el tràmits burocràtics.

A la comissió de seguiment d'aquesta tesi doctoral: Dr. Pedro Alía, Dra. Josefina Mora i Dr. Joan Torras pels bons consells que m'han donat i pel bon ambient que es respirava a les comissions de seguiment.

Al Dr. Josep Maria Cruzado, Cap de Servei de Nefrologia, per la seva ajuda en la realització d'aquesta tesi, per la seva disponibilitat i proximitat. Al Dr. Miguel Hueso, nefròleg i ideòleg d'aquest projecte, per l'entusiasme mostrat des del primer moment per aquest projecte. A la Dra. Maria Teresa González per la seva ajuda i predisposició. A tots els nefròlegs del Servei de Nefrologia de l'HUB pel reclutament dels pacients i a tot el grup del Laboratori de Nefrologia del Campus Bellvitge per acollir-me, ajudar-me i fer-me sentir una més. En especial, a la Inés Llaudó, la Gema, el Pere Fontova i l'Anna Vidal.

Agrair a tots els pacients amb insuficiència renal crònica en hemodiàlisi i/o receptors d'un trasplantament de ronyó que de forma anònima i voluntària han participat d'aquesta tesi, sense ells hauria estat impossible.



Agraeixo a la *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)* i la *Fundación José Luis Castaño* la concessió de la beca Post-Residència de l'any 2015 que em va permetre poder avançar el doctorat.

A la Dra. María José Castiñeiras i la Dra. Núria Llecha els hi vull agrair la confiança dipositada en mi com a facultativa especialista a l'acabar la residència.

A la Dra. Dolores Dot per confiar en mi des del primer dia que vaig entrar com a resident al Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Per tots els seus coneixements transmesos, per la seva empenta, per la seva energia, per la seva coherència i ajuda en tot moment. Gràcies per ensenyar-me el camí per a ser una bona professional però sobretot gràcies per creure en mi i per estar sempre allà i pels quilòmetres que ens queden per córrer juntes.

Al meu tutor, Dr. José Valero, per la seva atenció i bons consells durant els quatre anys de residència.

A la Dra. Blanca Allende per la confiança dipositada en mi com a facultativa especialista de l'Àrea Sèrica del Laboratori Clínic L'Hospitalet des del primer dia que vaig entrar, ja que ha suposat una gran empenta pel meu desenvolupament professional. Per la seva coherència, constant ajuda i per fer el dia a dia molt més fàcil.

A tot el personal del Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge: tècnics, infermers i facultatius especialistes. En especial, a totes les adjuntes per ensenyar-me i guiar-me en el camí d'aquesta professió. A la Macarena Dastis per preocupar-se i interessar-se sempre per mi, a l'Anna Cortés per les nostres converses del dia a dia, pel seu positivisme, pels bons consells i els riures que amenitzen els dinars i al Raül Rigo per tots els coneixements transmesos i per donar-me l'oportunitat de fer pòsters i articles en el món de la cromatografia.

Als meus companys de residència Clàudia, Cristina, Bárbara i en especial gràcies al Chema, el meu co-R, pels milions de riures inaguantables i bons moments compartits, per fer d'aquells quatre anys inoblidables i per ser un plaer treballar conjuntament. Us agraeixo els moments compartits, tant a dins com a fora de l'Hospital, els riures, la complicitat, la companyonia, les hores intensives de feina, els seminaris, exposicions, els viatges, els congressos... són moments que mai oblidaré. De ben segur que seguirem compartint-los durant molts anys. Un agraïment especial a l'Ana Argudo, per la complicitat que vam tenir des del primer dia.

No puc oblidar-me dels meus companys actuals del Laboratori Clínic L'Hospitalet, per acollir-me tant bé en aquesta gran família i fer d'anar a treballar, tot un plaer. Us vull donar les gràcies a tots i molt especialment: a l'Eva Dopico, per ser una excel·lent companya de despatx, a la Rosa Ruiz per ser un plaer compartir feina amb ella i pels bons moments de riures i complicitat, a la Montse Medina per ser una gran professional amb rigor i criteri, a la Reme, i a l'Eva Mariano, per les llargues històries que ha hagut d'escoltar de la trajectòria d'aquesta tesi i per ser la millor tècnic de tardes que el Core podia tenir.

Un especial agraïment a la Núria Montaner i a la Laura Siles, les meves companyes de primera fila de la classe de Bioquímica, les meves biòlogues preferides. Gràcies a elles vaig entendre ràpidament què era una cèl·lula mentre jo els hi explicava mecanismes de reacció de química orgànica... Ens vam complementar molt bé, per ser treballadores i intel·ligents i unes empollones amb estil ;) Per totes les hores d'estudi a la peixera, totes les quedades, sopars i festes de Bioquímica. Un record especial a tota la classe de bioquímics exemplars i cracks de l'aula 14 de la Facultat de Biologia.

A la Marta Jorba per ser una amiga incondicional, pels milers de rotllos que ha aguantat d'aquesta tesi i del món del laboratori clínic. Pels inoblidables moments viscuts als estius, això quedarà sempre en la nostra memòria. I a la Mireia Marcé per ser molt bona persona i sempre tenir un moment per saber com estic, pels milers de sopars, festes i bons moments compartits junt amb el Marc i tota la colla.

A l'Ester Torrents per ser una bona amiga i sempre confiar en mi. Per les quedades per anar de compres, pels sopars i pels dies de platja de no parar de parlar... mentre el Xavi i el Víctor parlen de triatló ;)

A les meves íntimes amigues: Coral Gimeno, Marta Jorba, Cristina Lerma, Marta Rubio i Ester Sánchez. Pels estius inoblidables que hem viscut de platja, passeigs, gelats i nits d'estiu de festa i més festa. Mai se m'oblidaran, gràcies!

A la Cristina Arcas, perquè sé que, tot i la distància, la nostra amistat perdura i sempre ha confiat en mi.

Un agraïment molt especial a la meva família pel suport que m'han donat sempre. Als meus pares donar-los-hi les gràcies pels valors que m'han transmès i per tot el que han fet i fan per mi ja que sempre han estat un suport incondicional. Per ensenyar-me el camí cap a l'exigència i que amb esforç i sacrifici s'arriba on es vol. Per encoratjar-me i ajudar-me en tots

els meus projectes i animar-me a continuar sempre endavant. A la meva germana Laia, pels bons moments viscuts i per confiar sempre en mi i el meu criteri.

Gràcies a tu Víctor, per tota l'ajuda en la recta final d'aquesta tesi, per creure fermament en mi, per la teva paciència, per coneixe'm millor que ningú i en definitiva, per ser el millor company d'aquest llarg viatge.

Gràcies a tots!

La inspiració existeix, però t'ha de trobar treballant

Pablo Picasso



ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	I
ÍNDEX.....	VII
ABREVIATURES.....	XI
RESUM DE LA TESI.....	XV
I. INTRODUCCIÓ.....	1
1. MALALTIA RENAL CRÒNICA.....	3
1.1. DEFINICIÓ I DIAGNÒSTIC.....	3
1.2. INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA TERMINAL.....	4
2. MALALTIA CARDIOVASCULAR EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL CRÒNICA.....	6
2.1. EPIDEMIOLOGIA.....	6
2.2. L'ATEROSCLEROSI EN LA MALALTIA RENAL CRÒNICA.....	7
2.3. EL PROCÉS INFLAMATORI DE L'ATEROSCLEROSI.....	7
2.4. CLASSIFICACIÓ DE LA MALALTIA CARDIOVASCULAR D'ORIGEN ATEROSCLERÒTIC.....	10
3. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR.....	11
4. LA MALALTIA CARDIOVASCULAR I LA GENÈTICA.....	17
4.1. EL GEN <i>ANRIL</i>	18
4.2. POLIMORFISMES DELS GENS <i>ANRIL</i> I <i>CARD8</i>	20
4.3. POLIMORFISMES DEL GEN <i>ANRIL</i> I DEL GEN <i>CARD8</i> EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL CRÒNICA.....	26
II. HIPÒTESI.....	33
III. OBJECTIUS.....	39
IV. RESULTATS.....	45
CAPÍTOL 1.....	45
CAPÍTOL 2.....	59
V. DISCUSSIÓ.....	75
VI. CONCLUSIONS.....	91
VII. BIBLIOGRAFIA.....	97
VIII. ANNEX.....	115





ABREVIATURES

AIT	accident isquèmic transitori
ANRIL	<i>antisense noncoding RNA in the INK4 Locus</i>
ATG	globulina antitímocítica
CARD8	<i>caspase recruitment domain 8</i>
CDKN	<i>cyclin-dependent kinase Inhibitor</i>
DM	diabetis mellitus
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	diàlisi peritoneal
EPO	eritropoetina
FAVI	fístula arterial venosa interna
GWAS	<i>genome-wide association study</i>
HD	hemodiàlisi
HTA	hipertensió arterial
HVE	hipertrofia ventricle esquerra
IAM	infart agut de miocardi
IC95 %	interval de confiança del 95 %
IL-1 β	<i>interleukin - 1β</i>
IMC	índex de massa corporal
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
MCV	malaltia cardiovascular
MPC-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MRC	malaltia renal crònica

mRNA *messenger ribonucleic acid*

mTOR *mechanistic target of rapamycin*

n nombre d'individus

NFκβ *nuclear factor κβ*

NLRP3 *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing receptor family*

NODAT *new onset diabetes after transplantation*

OR *Odds Ratio*

PCR proteïna C reactiva

PRC *polycomb protein complexes*

PTH hormona paratirina

RNA *ribonucleic acid*

RR *Relative Risk*

rs *reference SNP*. Numeració característica i individual que rep cada polimorfisme

SCA síndrom coronari agut

SNP *single nucleotide polymorphism*

STAT1 *signal transducer and activator of transcription 1*

STEMI *ST-segment elevation myocardial infarction*

TR trasplantament de ronyó

VFG velocitat de filtració glomerular



RESUM DE LA TESI

Aquesta tesi doctoral s'ha centrat en l'estudi de la relació entre diversos polimorfismes dels gens *ANRIL* i *CARD8* i l'aparició d'episodis cardiovasculars en una població de pacients amb malaltia renal crònica constituïda per pacients en hemodiàlisi i receptors d'un trasplantament de ronyó.

Per tal de poder estratificar correctament aquests pacients en funció del seu risc cardiovascular, la hipòtesi del treball ha estat que la informació relativa a la presència de certes variants genètiques relacionades amb l'arterioesclerosi s'ha d'afegir als factors de risc cardiovasculars clàssics.

Concretament, el projecte de tesi s'ha dividit en dues parts: en una primera part l'objectiu ha estat estudiar el paper dels polimorfismes del gen *ANRIL* en el risc d'episodis cardiovasculars en pacients amb malaltia renal crònica terminal en hemodiàlisi. I a la segona part s'ha estudiat si el polimorfisme estadísticament més significatiu del primer estudi, continua exercint el seu paper promotor del risc cardiovascular una vegada els pacients han estat sotmesos a trasplantament renal.

La tesi doctoral demostra que el polimorfisme rs10757278 està en desequilibri de lligament amb un conjunt de polimorfismes propers del gen *ANRIL*, i que està relacionat estadísticament amb l'aparició d'episodis cardiovasculars en pacients en hemodiàlisi. Concretament, els pacients homozigots per l'al·lel de risc (genotip GG) han mostrat un risc del doble aproximadament -HR: 2.15 (1.14-4.01), $P=0.018$ - que els pacients portadors de l'al·lel protector A. A més a més, s'ha demostrat que aquest efecte es mantenia tot i ajustar per les variables de risc cardiovascular clàssiques, fins i tot la diabetis, amb la qual manté un efecte sinèrgic.

Aquesta relació amb el risc cardiovascular s'ha confirmat també en la població de pacients trasplantats renals on el risc de patir un episodi cardiovascular pels pacients amb genotip GG augmenta 2.93 vegades (1.69-5.11), $P_{aj}<0.0001$ respecte als portadors de l'al·lel A. Concretament, l'associació d'aquest polimorfisme amb el desenvolupament d'ictus isquèmic té un efecte més important -HR: 4.43 (1.81-10.85) $P_{aj}=0.001$ - que en el cas d'infart agut de miocardi -HR: 2.27 (1.10-4.67), $P_{aj}=0.026$.

Per altra banda, el polimorfisme rs2043211 del gen *CARD8* no mostra associacions significatives amb patir un episodi cardiovascular o amb mortalitat en pacients receptors d'un trasplantament de ronyó. Tot i així, quan es combina amb el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL*, l'increment del risc cardiovascular dels homozigots combinats de l'al·lel de risc manté l'efecte que l'SNP d'*ANRIL* havia mostrat de forma independent, suggerint que *CARD8* podria tenir algun paper en el mecanisme d'acció del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL*.

Els resultats obtinguts en la present tesi doctoral demostren per primera vegada la relació de la variant genètica rs10757278 del gen *ANRIL* amb els episodis cardiovasculars, especialment pel que fa als ictus isquèmics, en pacients amb malaltia renal crònica: en hemodiàlisi i receptors d'un trasplantament de ronyó. Afegir l'estudi d'aquest polimorfisme a la pràctica clínica permetria estratificar millor els pacients amb alt risc cardiovascular i oferir-los un tractament d'alta intensitat que permetés disminuir la morbi-mortalitat per aquesta causa.



Aquesta tesi està basada en els següents articles.

- I. **Arbiol-Roca A**, Padró-Miquel A, Hueso M, Navarro E, Alía-Ramos P, González-Álvarez MT, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM, Lloberas N. Association of *ANRIL* gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients. Clin Chim Acta. 2017;466:61-7.

- II. **Arbiol-Roca A**, Padró-Miquel A, Hueso M, Navarro E, Alía-Ramos P, González-Álvarez MT, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM, Lloberas N. Data on genotypic distribution and linkage disequilibrium of several *ANRIL* polymorphisms in hemodialysis patients. Data Brief. 2017;11:221-4. (Annex 1)

- III. **Arbiol-Roca A**, Padró-Miquel A, Vidal-Alabró A, Hueso M, Fontova P, Bestard O, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Alía-Ramos P, Cruzado JM, Lloberas N. *ANRIL* as a genetic marker for ischemic stroke in renal transplant patients. Transpl Int. 2018 [Epub ahead of print]







I. INTRODUCCIÓ





I. INTRODUCCIÓ

1. MALALTIA RENAL CRÒNICA

1.1. DEFINICIÓ I DIAGNÒSTIC

La malaltia renal crònica (MRC) afecta un 10 % de la població mundial i constitueix un important problema de salut pública amb un increment progressiu del nombre de pacients candidats a tractament renal substitutiu (1). Segons l'últim Registre de Malalts Renals de Catalunya, la incidència de la MRC l'any 2015 es va incrementar, amb un total de 157 casos per milió de població (2). La MRC afecta per tant, a un percentatge important de la població i està relacionada principalment amb l'envelliment, la hipertensió arterial (HTA), la diabetis mellitus (DM) i la malaltia cardiovascular (MCV) (3).

La darrera actualització de la Societat Internacional de Nefrologia KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) de l'any 2012 (1), defineix la malaltia renal crònica com aquelles anormalitats estructurals o funcionals del ronyó presents durant més de 3 mesos i amb implicacions per a la salut (evidència d'un o més marcadors de dany renal i velocitat de filtració glomerular (VFG) renal < 60 mL/min). En el quadre que es mostra a continuació (Taula 1) es descriuen els marcadors que defineixen la MRC (KDIGO 2012):

Marcadors de dany renal (un o més)	Albuminúria > 30 mg/24h; albúmina/creatinina > 30 mg/g Anormalitats del sediment urinari Anormalitats electrolítiques y altres degudes a desordres tubulars Anormalitats detectades per histologia Anormalitats estructurals detectades per imatge Història de trasplantament renal
Disminució de la VFG	VFG < 60 mL/min/1,73 m ²

Taula 1. Definició de malaltia renal crònica segons KDIGO.

A la mateixa guia proposen la classificació dels diferents estadis d'insuficiència renal en funció únicament de la velocitat de filtració glomerular renal:

Estadi I: VFG \geq 90 mL/min/1,73 m²

Estadi II: VFG entre 60 i 89 mL/min/1,73 m²

Estadi III: VFG entre 30 i 59 mL/min/1,73 m²

Estadi IV: VFG entre 15 i 29 mL/min/1,73 m²

Estadi V: VFG < 15 mL/min/1,73 m²

1.2. INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA TERMINAL

A mesura que evoluciona la MRC, la capacitat de funcionament dels ronyons va minvant afectant a l'aclariment de creatinina i altres variables relacionades com els percentatges d'eliminació de creatinina i urea en sang (Kt/V), entre d'altres. Arriba un punt on el sistema renal ja no pot realitzar cap de les seves funcions i cal optar per les teràpies substitutives.

La manifestació més avançada de la MRC, la insuficiència renal crònica terminal o en estadi V, i la posterior necessitat de tractament renal substitutiu mitjançant diàlisi (peritoneal o hemodiàlisi) o trasplantament renal (TR) presenten també una incidència i una prevalença creixents durant les últimes dècades. A Catalunya, dels 630.000 catalans que pateixen MRC, 9.600 estan en tractament renal substitutiu, els quals equivalen a una prevalença de 1.360 pacients per cada milió de població. La incidència és de 164 per cada milió d'habitants (4). Pel que fa als TR, a Catalunya, l'any 2016, es van fer 708 trasplantaments renals que representen una taxa de 94.1 per milió de població (5).

- Diàlisi peritoneal (DP)

La diàlisi peritoneal és una tècnica que permet depurar líquids i electròlits en els pacients que pateixen insuficiència renal. En la DP, el peritoneu actua com a membrana semipermeable que separa, per una part, la sang dels capil·lars mesentèrics i, per l'altra, un líquid de característiques predeterminades que es renova periòdicament. Els mecanismes de transport mitjançant difusió i ultrafiltració actuen a través de la membra peritoneal per extreure soluts urèmics i aigua, per tal d'aconseguir un equilibri àcid-base i electrolític. És una forma senzilla de practicar diàlisi domiciliària. La principal complicació és la peritonitis (6).

- Hemodiàlisi (HD)

L'hemodiàlisi és una tècnica de depuració extra corpòria en la qual es posa en contacte, a través d'una membrana semipermeable, la sang amb un líquid de diàlisi de característiques predeterminades. Supleix les funcions d'excreció de soluts, eliminació de líquid retingut i regulació de l'equilibri àcid-base i electrolític. L'acció té lloc gràcies a un mecanisme de difusió

o transport per conducció i a la ultrafiltració o transport per convecció. L'hemodiàlisi s'acostuma a practicar 3 vegades per setmana durant 3-5 hores per sessió, depenent de la funció renal residual, la superfície corporal, la tècnica d'hemodiàlisi i els trastorns associats que presenti el pacient. Les complicacions descrites inclouen la hipotensió, les rampes, la síndrome de desequilibri de diàlisi, les arítmies cardíacques i el dolor anginos, la reacció per pirògens, l'embòlia gasosa i el síndrome del primer ús, entre d'altres (6).

Els accessos per a realitzar les diferents teràpies són:

- Catèter de diàlisi peritoneal: És un catèter permanent que s'introdueix mitjançant una intervenció quirúrgica a l'abdomen, normalment en règim de cirurgia major ambulatoria o curta estada (6).
- Fístula Arterial Venosa Interna (FAVI) o pròtesi vascular: És la unió d'una artèria amb una vena del propi pacient mitjançant una petita intervenció quirúrgica que es realitza normalment amb anestèsia local (6).
- Catèter percutani temporal o permanent: El catèter es posa en una vena jugular, subclàvia o femoral (6).

- Trasplantament renal

El trasplantament renal consisteix en la implantació d'un ronyó sa provinent d'un donant cadàver o donant viu mitjançant una intervenció quirúrgica i és el tractament d'elecció de la malaltia renal crònica terminal. Amb el trasplantament renal s'aconsegueix una major supervivència de l'empelt, una major qualitat de vida per al pacient, i és la teràpia major cost-efectiva en comparació amb la resta de teràpies renals substitutives. Malgrat els seus avantatges, el trasplantament de ronyó només es pot dur a terme en pacients amb un bon estat general i que no tinguin contraindicacions mèdiques o quirúrgiques. No tots els pacients que estan fent diàlisi es poden trasplantar i això és per diferents causes: edat avançada, presència d'altres malalties importants, tumors, infeccions o malalties psiquiàtriques greus entre d'altres (6).

El maneig del trasplantament renal ha evolucionat molt en el darrer mig segle mostrant un gran avanç pel que fa a les tècniques quirúrgiques, en el tipus de tractament immunosupressor utilitzat i en el diagnòstic i tractament de les complicacions en el pacient i l'empelt renal (7, 8). Actualment, els fàrmacs immunosupressors utilitzats són els inhibidors de la calcineurina: tacrolimus i ciclosporina, i els inhibidors de mTOR: sirolimus i everolimus gairebé sempre en combinació amb micofenolat mofetil. Com a pauta habitual en el trasplantament, als pacients

se'ls administra teràpia d'inducció amb globulina antitímocítica (ATG), basiliximab o daclizumab, i glucocorticoides via intravenosa.

La principal complicació del trasplantament renal és el rebuig immunològic de l'empelt. Els treballs publicats en els darrers anys evidencien una millora en la supervivència del pacient i de l'empelt a curt termini però els resultats no són tant concloents a llarg termini (9). Els fàrmacs immunosupressors han aconseguit reduir significativament els episodis de rebuig cel·lular agut. Tot i així, aquests fàrmacs no han mostrat un impacte significatiu en la supervivència de l'empelt a llarg termini, degut principalment a l'aparició gairebé ineludible de la disfunció crònica de l'empelt deguda a mecanismes immunes i no immunes (cel·lulars i humorals) i a la mort del pacient com a conseqüència de l'ús crònic d'aquestes teràpies que donen lloc a malalties cardiovasculars i càncer. La investigació en trasplantament per tal de millorar la supervivència de l'òrgan trasplantat, s'ha dirigit cap a progressos en la selecció i manteniment hemodinàmica del donant en mort encefàlica, avanços en la detecció i tractament d'episodis de rebuig, la disponibilitat i monitorització de nous immunosupressors, la profilaxi i tractament de processos infecciosos i els avanços experimentals tant en les tècniques quirúrgiques com en la preservació d'òrgans (10). En els darrers anys, els resultats a curt termini han estat molt positius millorant de forma gradual i assolint una taxa de supervivència de l'empelt del 90% aproximadament durant el primer any.

2. MALALTIA CARDIOVASCULAR EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL CRÒNICA

2.1. EPIDEMIOLOGIA

Tot i que la mortalitat per malalties cardiovasculars, en els països desenvolupats, ha mostrat una tendència decreixent en els darrers anys, a Espanya segueix sent la principal causa d'èxitus amb una taxa de morbimortalitat superior a la població general. Aquesta taxa pot arribar a multiplicar-se per 1000 en estadis avançats de malaltia renal crònica (11, 12).

En els pacients en hemodiàlisi, la taxa de mortalitat és entre 10 i 30 vegades superior a la de la població general (13) i superior a la d'altres grups de pacients reconeguts com a pacients d'alt risc cardiovascular, com per exemple: diabètics, hipertensos o amb història d'infart agut de miocardi previ (13, 14). Tot i que el risc cardiovascular dels pacients trasplantats de ronyó és inferior a la dels pacients en HD inclosos en llista d'espera de TR (15), diversos estudis observacionals han demostrat com aquest risc segueix sent superior al de la població general

de similar edat i sexe (16, 17); de manera que la patologia cardiovascular és també la principal causa de mortalitat en aquest grup de pacients, representant més del 50 % dels èxits (18). La malaltia cardiovascular, doncs, segueix sent molt prevalent després del TR, situant-se al voltant del 10 % als 3 anys del trasplantament, fet que incrementa en 2,7 vegades el risc de mort i de pèrdua de l'empelt renal, especialment després del primer any post TR (19).

Conèixer els principals factors de risc de la malaltia cardiovascular ens ajudarà a la seva prevenció. L'epidemiologia cardiovascular es caracteritza per tenir una etiologia multifactorial, i els factors de risc cardiovascular es potencien entre sí mitjançant mecanismes pleiotròpics i, de manera freqüent, solen presentar-se associats.

2.2. L'ATEROSCLEROSI EN LA MALALTIA RENAL CRÒNICA

L'arteriosclerosi en la MRC és una alteració caracteritzada per la presència de plaques d'ateroma en les artèries principalment de calibre mitjà, amb una distribució irregular, que es desenvolupa a l'inici a la capa íntima i que és responsable de la isquèmia distal a la lesió. S'anomenen comunament calcificacions vasculars i estan localitzades a la íntima i/o a la mitjana de la paret arterial. Diferents estudis han demostrat que la prevalença d'aquestes plaques ateromatoses i calcificades, en artèries coronàries, ilíaqües, caròtides i altres vasos, és superior en pacients en diàlisi respecte a la població en general (1). Es postula que l'estat urèmic per si mateix, més que el tractament renal substitutiu, s'associa a una aterosclerosi accelerada causant accidents cardiovasculars arterioscleròtics. Diferents estudis demostren que la incidència és fins a tres vegades superior en pacients urèmics, tant en estat de pre-diàlisi com en diàlisi, respecte a la població general d'edat similar (20). Però, per altra banda, també s'ha demostrat per coronariografia que la progressió de l'arteriosclerosi i la calcificació coronària és superior en pacients en hemodiàlisi que en pacients urèmics en tractament conservador (21). Per tant, es pot concloure que els pacients amb MRC tenen un procés arterioscleròtic avançat degut a l'estat urèmic i en part, a la diàlisi.

2.3. EL PROCÉS INFLAMATORI DE L'ATEROSCLEROSI

L'arteriosclerosi és una patologia molt més complexa que una simple acumulació de lípids i de colesterol a la paret vascular de les artèries. Actualment, es considera una malaltia inflamatòria que apareix en resposta al dany de la paret vascular (22, 23). El procés inflamatori

exerceix un paper important a la patogènesis de l'aterosclerosi participant marcadament en alguns dels estadis del desenvolupament de la placa d'ateroma: des del reclutament de leucòcits fins a la desestabilització de la placa ateroscleròtica. De fet, s'ha demostrat que concentracions elevades de determinats marcadors d'inflamació són predictius d'un elevat risc de ruptura de la placa (22).

En els darrers anys, s'ha descrit com a origen de l'aterosclerosi una **disfunció endotelial** a l'interior de la paret vascular causada per múltiples factors que originarien un dany a l'endoteli.

- Disfunció endotelial i estrès oxidatiu

L'endoteli vascular representa una barrera funcional i dinàmica entre la sang circulant i el teixit circumdant amb múltiples funcions: modula i regula el to vascular, controla l'activitat de les cèl·lules musculars llises de la capa mitja, regula el creixement cel·lular local i el dipòsit de matriu extracel·lular, té un efecte protector dels vasos davant la presència de substàncies tòxiques circulants a la sang, té funcions antitrombòtiques (inhibeix l'adhesió plaquetària i la coagulació, i regula el sistema fibrinolític) i participa en la resposta immune i reparadora a les lesions locals (24). L'endoteli produeix òxid nítric que és un potent vasodilatador, inhibeix l'adhesió i agregació plaquetària, inhibeix la proliferació de les cèl·lules del múscul llis i té efecte antioxidant.

Els pacients amb MRC tenen un dèficit d'òxid nítric per increment de la seva degradació amb el superòxid des dels estadis inicials de la malaltia fet que comporta la disfunció endotelial per alteració de la vasodilatació, afavorint el desenvolupament d'aterosclerosi, d'hipertensió i la posterior aparició d'episodis cardiovasculars. La presència de qualsevol factor de risc cardiovascular ocasiona alteracions en les funcions de l'endoteli i l'aparició d'una cascada de factors proinflamatoris que provoca l'apoptosi de les cèl·lules endotelials. Tot plegat comporta la pèrdua de propietats antitrombòtiques de la paret vascular i l'alteració del nombre i funcionalitat de les cèl·lules endotelials. Conseqüentment, l'exposició perllongada i repetida de l'endoteli a l'estrès oxidatiu, associat als factors de risc cardiovasculars, comporta l'esgotament dels seus mecanismes protectors antioxidants i antiinflamatoris (25).

En conclusió, la lesió a l'endoteli vascular altera la seva funcionalitat habitual, originant un estat inflamatori que desencadena múltiples cascades moleculars i cel·lulars donant pas al desenvolupament de la malaltia ateroscleròtica (23). La disfunció endotelial està implicada a

cada etapa de la progressió de l'aterosclerosi, des de la formació de l'estria grassa a la fase inicial fins a la ruptura de la placa, mitjançant diferents mecanismes:

- Expressió i regulació de molècules d'adhesió
- Increment de la secreció de quimioquines, que a la seva vegada participen en l'adherència i el reclutament de leucòcits que penetren a la íntima i predisposen a la paret del vas a l'acumulació de lípids, augment de la permeabilitat
- Oxidació de molècules LDL
- Activació de plaquetes
- Formació de citocines
- Migració i proliferació de cèl·lules del múscul llis de la paret vascular.

Els propis mediadors de la inflamació incrementen la captació de lipoproteïnes modificades per macròfags i la seva evolució cap a cèl·lules escumoses. Per la seva part, les cèl·lules T penetren a la íntima i segreguen citocines, amb la consegüent amplificació del procés inflamatori, migració i proliferació de cèl·lules musculars llises. En fases avançades del procés, els mediadors inflamatoris poden participar en el debilitament de la capa fibrosa de la lesió ateromatosa i facilitar la seva ruptura, d'aquesta manera és com es desencadenen els síndromes coronaris aguts (26).

Els pacients amb MRC presenten un estat inflamatori que augmenta a mesura que evoluciona la malaltia renal, essent més accentuat en els pacients en HD (27).

Les principals causes descrites d'aquest estat inflamatori són: la presència d'un aclariment renal disminuït de citoquines proinflamatòries, el propi estat urèmic, l'estrès oxidatiu, la presència d'altres comorbiditats (insuficiència cardíaca, hipervolemia, diabetis, malalties inflamatòries...), la malaltia renal de base o les infeccions persistents. En els pacients trasplantats renals, la insuficiència renal, els empelts renals no funcionants o el rebuig de l'empelt renal també poden contribuir a incrementar el grau d'inflamació. Aquesta inflamació s'ha associat a un empitjorament de la funció renal, un increment de la MCV i a la pèrdua de l'empelt a llarg termini (28).

Els mecanismes moleculars que intervenen en la patogènia de les calcificacions vasculars no són ben coneguts però existeixen evidències que la inflamació i els factors genètics podrien contribuir al seu desenvolupament (20).

2.4. CLASSIFICACIÓ DE LA MALALTIA CARDIOVASCULAR D'ORIGEN ATEROSCLERÒTIC

Dins de la malaltia cardiovascular s'inclou un subgrup de trastorns relacionats amb la formació i desenvolupament de processos ateroscleròtics: la cardiopatia isquèmica, la malaltia cerebrovascular i l'arteriopatia perifèrica.

Cardiopatia isquèmica

La cardiopatia isquèmica és la malaltia causada per l'arteriosclerosi de les artèries coronàries. Té tres manifestacions clíniques fonamentals: angina de pit i infart agut de miocardi (IAM), incloses dins del terme síndrome coronari agut, i la mort sobtada cardíaca d'origen coronari.

El terme **síndrome coronari agut** (SCA) engloba un conjunt d'entitats clíniques en les que el flux coronari arterial pateix una interrupció o obstrucció sobtada, habitualment secundària a la ruptura o erosió d'una placa d'ateroma localitzada a la paret arterial que genera la formació d'un trombe intraluminal que clou total o parcialment la llum arterial limitant el flux de sang en una o varies artèries coronàries. Sempre que l'aportació de flux sanguini coronari està per sota del llindar necessari per satisfer la demanda metabòlica del miocardi, es produeix una situació d'isquèmia miocardiàca que s'associa a un pas de metabolisme aeròbic a anaeròbic, i si la oclusió és persistent en el temps, es produeix necrosi del teixit miocardiàc i mort cel·lular, el que es considera amb el nom d'**infart agut de miocardi**. En canvi, si la isquèmia és transitòria i no hi ha necrosi miocardiàca, s'anomena **angina de pit**.

La frontera entre l'infart agut de miocardi i l'angina és molt fina, i arran de la darrera definició d'IAM (29), on es té en compte la troponina com a biomarcador més sensible i específic per al diagnòstic d'IAM, ha augmentat el diagnòstic d'infarts aguts de miocardi que abans es diagnosticaven com a angines inestables.

Per últim i més greu, ens trobem amb aquells pacients que debuten en forma de **mort sobtada** com a conseqüència, en molts casos, de complicacions arítmiques en el context d'un SCA.

Malaltia cerebrovascular

Pel que fa a la malaltia cerebrovascular, es pot subdividir en dos grans grups segons el seu mecanisme: ictus isquèmic o ictus hemorràgic. Els **ictus isquèmics** representen el 85 % de tots els ictus i es poden distingir entre isquèmia cerebral focal, que afecta a una sola zona de l'encèfal i la isquèmia cerebral global, que afecta a l'encèfal de forma difosa. Segons la duració del procés isquèmic, es considera dos tipus d'isquèmia cerebral focal: l'accident isquèmic transitori (AIT) de duració inferior a 24 hores i l'infart cerebral que produeix un dèficit neurològic que persisteix més de 24 hores, indicant la presència de necrosi tissular. D'altra

banda, els **ictus hemorràgics** constitueixen un 15 % de tots els ictus i són causats per la ruptura d'un vas sanguini encefàlic degut a un pic d'hipertensió o un aneurisma congènit. Segons la localització, l'hemorràgia es pot classificar en cerebral o bé, subaracnoïdea (30).

Arteriopatia perifèrica

Finalment, l'arteriopatia perifèrica o arteriosclerosi obliterant és l'arteriosclerosi que implica a les extremitats inferiors. És conseqüència d'ateroesclerosi, embolismes o formació de trombes. El principal símptoma és la **claudicació intermitent** que s'origina durant l'exercici quan la demanda de sang i oxigen als músculs excedeix de l'aportada. És un dolor muscular que reverteix amb el repòs. És una malaltia que es subestima i és difícil de diagnosticar perquè cal que el pacient descriu de forma adequada el dolor (31).

3. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR

La major prevalença dels factors de risc cardiovascular clàssics en els pacients en hemodiàlisi (edat, sexe, tabaquisme, HTA, dislipèmia, DM...) no explica totalment l'elevada incidència de mortalitat cardiovascular en aquests pacients (32). De fet, diferents estudis han demostrat que el *score* de Framingham infraestima el risc cardiovascular en els pacients amb patologia renal (33, 34). Per aquest motiu, també es tenen en compte la presència de factors de risc cardiovasculars nous o no clàssics propis de la MRC terminal: malnutrició, alteració del metabolisme del fosfo-càlcic, la calcificació valvular, la hipervolemia, l'anèmia... que jugarien un paper important en el desenvolupament de l'aterosclerosi accelerada i l'arteriosclerosi que presenten aquests pacients; i per tant, en el desenvolupament de les complicacions cardiovasculars (35-37).

La prevalença de factors de risc cardiovascular és també elevada en els pacients trasplantats. A més a més dels factors clàssics que tenen una prevalença en aquest grup de pacients similar a la població general -edat, sexe, obesitat, vida sedentària, alcohol, tabac, història d'antecedents amb malaltia cardiovascular-... hi ha altres factors també clàssics amb una prevalença augmentada com a conseqüència del tractament immunosupressor: hipertensió arterial, dislipèmia, diabetis mellitus post trasplantament, hiperinsulinèmia, anèmia... entre d'altres. Per contraposició, cal destacar que, a diferència de la població general, els factors de risc tradicionals causants de la MCV, en pacients receptors d'un trasplantament de ronyó, són menys determinants a l'hora de desenvolupar la MCV (38).

Factors de risc cardiovascular:

- **Edat**

L'edat del receptor és un factor important, no modificable, i relacionat amb l'augment del risc cardiovascular. L'edat dels pacients que inicien HD i dels pacients que són receptors d'un TR ha anat augmentant al llarg dels anys. Això fa que aproximadament 10-15 % dels pacients ja tinguin alguna patologia cardiovascular associada en el moment de rebre el tractament renal substitutiu, fet que incrementa el seu risc i la taxa de mortalitat cardiovascular i per tant tenen un pitjor pronòstic (1).

L'edat del donant és considerada també factor de risc de patir episodis cardiovasculars en el post TR (39). És habitual acceptar donants de fins a 50 anys però el progressiu augment anual del nombre de trasplantaments ha anat acompanyat d'un increment en l'edat dels donants que comporta una incidència més elevada de disfunció renal crònica dels empelts (1).

- **Sexe**

El sexe masculí és un dels factors de risc, no modificable, de malaltia cardiovascular (1).

- **Tabaquisme**

El tabaquisme és també un factor de risc cardiovascular reconegut en la població general. La prevalença de l'ús del tabac en els pacients amb MRC es troba al voltant del 40 %, similar a la de la població general (1) i aquesta es manté després del TR (40). Té un efecte negatiu sobre la funció renal ja que augmenta la pressió sanguínia i el cabal cardíac i provoca aterosclerosi de les artèries renals, entre d'altres (41).

En pacients en hemodiàlisi, el tabaquisme es manté com un important factor de risc cardiovascular (42, 43). Segons la *USRDS (United States Renal Data System)* (43), el tabac s'associa a major risc de desenvolupar insuficiència cardíaca *de novo*, infart agut de miocardi, vasculopatia perifèrica i s'associa també a major risc de mortalitat (44). També s'ha descrit que afavoreix l'augment de la rigidesa arterial (45) i el desenvolupament d'hipertrofia ventricular esquerra en pacients amb HD (46).

En estudis prospectius s'ha vist que el tabac és un factor de risc d'aparició d'episodis coronaris en els pacients trasplantats (47) i en estudis retrospectius s'ha associat a un major risc d'episodis cardiovasculars i mortalitat (40). També s'ha demostrat que el tabaquisme s'associa a un increment del risc de pèrdua de l'empelt renal (48, 49).

- Hipertensió arterial

La HTA és un factor de risc d'isquèmia miocardiaca, aterogènesi, calcificació coronària arterial i d'hipertrofia ventricular esquerra (50).

Els pacients en diàlisi tenen un pobre control de la pressió arterial a causa del tractament renal substitutiu. Entre el 50 i el 90 % dels pacients en hemodiàlisi i al voltant del 30 % dels pacients en diàlisi peritoneal tenen una pressió arterial augmentada (51).

La prevalença d'hipertensió en la població trasplantada oscil·la entre un 60-90 % (52-54) i contribueix de forma independent a la pèrdua de l'empelt renal i a la morbimortalitat cardiovascular (55). Cal tenir en compte que els fàrmacs anticalcineurínics (ciclosporina A i tacrolimus) i els esteroides augmenten la pressió arterial per mecanismes de vasoconstricció (56). Tot i que s'ha demostrat que un bon control de la pressió arterial amb fàrmacs hipotensius aconsegueix reduir la incidència d'accidents cerebrovasculars, el seu efecte sobre els episodis cardiovasculars no és tan evident (52).

- Dislipèmia

La prevalença de la dislipèmia en malalts renals crònics terminals és del 60-80 %. Afavoreix l'aparició de malaltia cardiovascular i intervé en la progressió de la insuficiència renal amb un increment dels triglicèrids (57, 58).

La dislipèmia és molt freqüent en el post TR amb una prevalença del 60-70 % i pot estar present ja als 3-6 mesos del post TR (53, 59). El patró dislipèmic característic és l'augment del colesterol total, colesterol LDL, triglicèrids i de l'apolipoproteïna B. La seva etiologia és multifactorial, tot i que el tractament immunosupressor amb corticoides, anticalcineurínics i sirolimus té un paper rellevant. El mecanisme mitjançant aquests fàrmacs indueixen la dislipèmia sembla ser que és per la seva capacitat d'unió al receptor de les LDL al fetge i posterior inactivació, fet que impedeix la internalització del colesterol per part del fetge i inhibeix la síntesi d'àcids biliars a partir d'aquest (53). Aquest efecte s'observa amb una major intensitat en el tractament amb sirolimus, seguit de ciclosporina A i finalment de tacrolimus (60, 61).

Més del 80 % dels pacients trasplantats renals precisen de tractament hipolipemiant amb estatines per al seu control (62).

La dislipèmia es considera un factor de risc de desenvolupament de MCV (63), mortalitat (64) i pèrdua de l'empelt renal (64, 65).

- **Diabetis Mellitus**

La nefropatia diabètica és la causa més freqüent de MRC terminal i s'associa a HTA, hipertrigliceridèmia, hipercolesterolèmia i hipertròfia de ventricle esquerre (HVE) (66).

El desenvolupament de diabetis mellitus post TR és el que es coneix amb el nom anglès de *New Onset Diabetes After Transplantation* (NODAT). La incidència de NODAT es situa al voltant del 30 % dels pacients trasplantats i té un impacte negatiu sobre la supervivència tant de l'empelt com del pacient trasplantat ja que és un factor de risc independent per al desenvolupament de MCV (59, 67, 68). Els factors de risc de desenvolupar-la són: edat del receptor, història familiar de diabetis, intolerància a la glucosa pre trasplantament, sobrepès, alguns antígens del sistema HLA i el tractament amb esteroides i anticalcineurínics a dosis altes (59).

- **Obesitat**

L'obesitat està relacionada amb mortalitat global i cardiovascular en població general sense MRC (69). És un factor de risc cardiovascular i renal modificable que provoca tot un seguit d'alteracions: resistència a la insulina, intolerància a la glucosa, dislipèmia, aterosclerosi, HTA, inflamació i la progressió a la nefropatia (70, 71).

L'obesitat és un factor de risc en MRC i diàlisi. Entre els pacients trasplantats és molt freqüent i s'associa amb alteracions lipídiques, resistència a la insulina i disfunció cardíaca fent que aquests pacients presentin un major risc cardiovascular i que disminueixi la supervivència de l'empelt (65).

- **Filtrat glomerular**

El filtrat glomerular o la concentració de creatinina en sèrum són factors de risc independents pel desenvolupament de malaltia cardiovascular. A menor VFG, major és la probabilitat de presentar un episodi cardiovascular. L'estudi ALERT revela que per cada 100 µmol/L d'augment de la creatinina en sèrum, augmenta el doble el risc de mortalitat global i cardiovascular (62).

D'altra banda, també influeix en el desenvolupament de la nefropatia crònica de l'empelt i en la supervivència del trasplantament (59).

- **Anèmia**

És una complicació freqüent en els pacients amb MRC i MRC terminal. Es produeix una disminució de l'hemoglobina en sang com a conseqüència d'una disminució de la producció i

secreció d'eritropoetina (EPO) i una alteració del metabolisme del ferro. L'anèmia comporta una disminució de l'aportació d'oxigen i un increment tant de la freqüència cardíaca com de la despesa cardíaca, i per tant, de l'augment de la pressió arterial, de la HVE (72), l'augment del gruix íntima-mitja carotí i inici de lesió vascular (1). La correcció de l'anèmia amb EPO exògena disminueix la massa ventricular esquerra i millora la funció ventricular (73).

En els pacients trasplantats de ronyó, l'anèmia està associada als fàrmacs immunosupressors com el micofenolat de sodi i els inhibidors dels mTOR. L'anèmia es considera un factor de risc de mortalitat i de pèrdua de l'empelt renal (74).

- **Metabolisme fosfo-càlcic**

L'augment de la concentració de l'hormona paratirina (PTH), la disminució de la vitamina D i la hiperfosfatèmia juguen un paper molt important en la patogènesi de la MCV.

La funció fisiològica de la PTH i la vitamina D és augmentar la concentració de calci en el múscul vascular llis i als miocardiòcits, intervenir en el metabolisme oxidatiu del miocardi i conseqüentment afectar la pressió arterial i la contractilitat cardíaca. El dèficit de vitamina D junt amb l'hiperparatiroidisme, característic dels pacients amb MRC, pot afavorir la producció de calcificacions coronàries, valvulars i de la lesió aterogènica i per tant, incrementar la MCV (75).

En pacients en diàlisi, la hiperfosfatèmia i l'hiperparatiroidisme es relacionen amb un augment de la mortalitat (76).

- **Malnutrició**

La malnutrició en els pacients en diàlisi té una prevalença molt variable, al voltant del 18-75 % (77). S'associa amb un estat microinflamatori i és un potent factor de risc de mortalitat global i cardiovascular (78). La mesura de la concentració d'albumina en sèrum, com a marcador de l'estat nutricional del pacient, permet detectar i tractar la malnutrició contribuint a la millora de la supervivència dels pacients que reben diàlisi (1).

- **Proteïnúria**

Per sí mateixa la proteïnúria és un factor predictiu de malaltia cardiovascular ja que és un marcador de disfunció endotelial relacionat amb el procés ateroscleròtic i la funció de l'empelt. En el post trasplantament pot ser originada per diverses causes: rebuig agut, hipertensió arterial, recidiva de la malaltia de base, malaltia glomerular *de novo*, nefropatia

crònica de l'empelt, entre d'altres. El seu control ha de ser prioritari ja que no només influeix en la supervivència de l'empelt a llarg termini pel possible desenvolupament de nefropatia crònica de l'empelt, sinó que també per la seva morbiditat cardiovascular. Pacients trasplantats renals amb proteïnúria ostenten una taxa de mortalitat dues vegades superior que aquells pacients que no la presenten. (79).

- **Hipertròfia del ventricle esquerre**

La hipertròfia del ventricle esquerre es considera un factor de risc independent per la malaltia cardiovascular. Els pacients renals tenen HVE per múltiples factors: HTA, anèmia, sobrecàrrega de volum, hiperparatiroidisme i la presència de la fístula arteriovenosa. El tractament immunosupressor amb ciclosporina A i corticoides també hi ha estat relacionat.

- **Accés vascular**

En els pacients en diàlisi l'accés vascular juga també un paper molt important en relació a la mortalitat. L'ús del catèter com a accés vascular per a realitzar diàlisi s'associa de forma significativa a un augment de la mortalitat (80).

- **Temps en diàlisi**

Es relaciona inversament amb la mortalitat. La diàlisi presenta un estat elevat d'inflamació persistent i d'estrès oxidatiu associat a un augment de la morbiditat i mortalitat cardiovascular. El perllongament de l'estat de diàlisi provoca l'agreujament de l'estat general i aquest repercuteix en les complicacions cardiovasculars. Els pacients que han estat trasplantats en estat pre-diàlisi són pacients que tenen un millor pronòstic cardiovascular (1).

S'ha fet palès que després del trasplantament i gràcies a la millora que s'aconsegueix en la funció renal, disminueixen la inflamació crònica i l'estrès oxidatiu relacionat amb la urèmia, fet que podria contribuir a millorar el perfil de risc cardiovascular i, per tant, la supervivència (1).

- **Tipus de diàlisi**

Sembla ser que no existeixen masses diferències pel que fa a la mortalitat post-trasplantament per causa cardiovascular entre pacients que havien rebut diàlisi peritoneal o bé hemodiàlisi tot i que hi ha diferents estudis contradictoris (81).

- Tipus de donant

El tipus de donant viu o de cadàver està molt relacionat amb la variable diàlisi. El fet de poder trasplantar-se un ronyó procedent d'un donant viu ofereix al pacient l'oportunitat d'alliberar-se o fins i tot evitar el tractament renal substitutiu amb diàlisi, així com de l'agreujament de l'estat general i la repercussió que aquest tractament comporta sobre les complicacions cardiovasculars (1).

- Tractament amb fàrmacs immunosupressors

L'objectiu fonamental de la immunosupressió és aconseguir la supressió de la resposta immunitària de l'empelt. Cal trobar l'equilibri entre el rebuig i els múltiples efectes secundaris. Com ja s'ha anat descrivint, el tractament immunosupressor ja sigui amb anticalcineurínics, inhibidors de mTOR i/o amb corticoides poden provocar algun efecte secundari: HTA per mecanismes de vasoconstricció (56), dislipèmia (53, 60, 61), aparició de NODAT (59) i anèmia (74) entre d'altres.

- Necrosi tubular aguda

És una de les complicacions del post trasplantament, l'absència de diüresis i funció de l'empelt, té un pitjor pronòstic per la supervivència de l'empelt i del pacient (1).

- Rebuig clínic agut

Durant el primer any post TR s'associa amb un major risc de patir malaltia cardiovascular en el pacient trasplantat (82, 83).

4. LA MALALTIA CARDIOVASCULAR I LA GENÈTICA

A més a més dels diferents factors de risc comentats, s'ha demostrat que el risc cardiovascular presenta agregació familiar, fet que suggereix la contribució genètica a la predisposició a patir un episodi cardiovascular (84). A més a més, tal com s'ha comentat anteriorment, és ben conegut que els factors de risc de MCV per a la població general tenen una rellevància menor que per als pacients amb MRC (34, 85-87). És per aquest motiu, que està emergent la necessitat de cercar nous marcadors genètics que tinguin alguna relació amb els marcadors de MCV propis de la malaltia renal i que ens permetin seleccionar els pacients amb MRC que presentin major risc cardiovascular.

4.1. EL GEN *ANRIL*

En els darrers anys s’han realitzat una gran quantitat d’estudis d’associació global del genoma GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) que relacionen les variants genètiques amb la malaltia cardiovascular. Un dels gens que presenta un interès emergent és un “Long non-coding RNA” anomenat *ANRIL* (*Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus*).

Els “Long non-coding RNAs” són molècules de RNA majors a 200 nucleòtids que no codifiquen per a proteïnes però que desenvolupen una funció reguladora de l’expressió d’altres gens (88, 89). Per tant, *ANRIL* no conté gens que codifiquin proteïnes però el seu extrem 3’ es localitza pròxim als gens supressors de tumors *CDKN2A* (*p16*) i *CDKN2B* (*p15*) i gràcies a la seva funció epigenètica, potencia, entre d’altres, l’activitat de les cèl·lules musculars llises (88) a través de la regulació dels gens *downstream*.

El gen *ANRIL* és un locus de 58 kb que es troba situat al cromosoma 9p21.3. Es localitza dins del clúster de gens *p15/CDKN2Bp16/CDKN2A-p14/ARF* en direcció antisentit. També es denomina amb el sinònim de *CDKN2B-AS1* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense RNA 1*) o *CDKN2B-AS* tenint en compte la seva orientació antisentit respecte el gen *CDKN2B*. Està format per 19 exons i per *splicing* alternatiu genera fins a 20 isoformes de diferents mides, la major d’elles de 3834 nucleòtids.

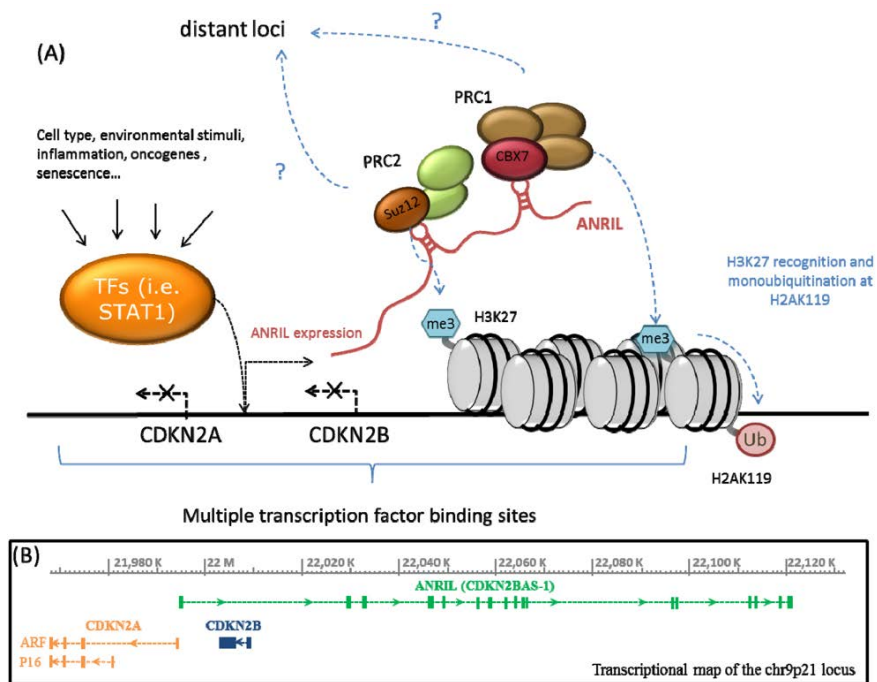


Figura 1. (A) Cromosoma 9p21.3, regió rica en elements reguladors i factors de transcripció. (B). Gens codificats en el locus 9p21. Imatge cedida amb permís. International Journal of Molecular Science. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 1278-1292 Copyright 2013 © (90).

La regió 9p21 és rica en elements reguladors i en factors de transcripció al llarg de la seva seqüència. Aquests factors de transcripció són activats en resposta a factors externs i mitjançant vies de senyalització i són els encarregats d'activar o inhibir la transcripció d'*ANRIL*. Les proteïnes PRC1 i PRC2 (*Polycomb protein complexes 1 i 2*) tenen dominis d'unió a RNA en les seves subunitats anomenades CBX7 i SUZ12. El transcrit d'*ANRIL* s'uneix a la subunitat SUZ12 del PRC2 per induir la metilació de la histona 3 a la lisina 27 (H3K27) i com a conseqüència es silencia el locus *CDKN2A/B*. D'altra banda, *ANRIL* s'uneix també a la subunitat CBX7 del PRC1 i permet el reconeixement de H3K27 necessari per la monoubiquitinització de la histona 2A a la lisina 119 (H2AK119) i mantenir la silenciació del gen. Per tant, la modulació d'*ANRIL* impacta en la repressió de les proteïnes *Polycomb*, induint o inhibint l'expressió de *CDKN2A/B* i modificant histones (Figura 1). Els diversos polimorfismes d'*ANRIL* associats amb malaltia cardiovascular modifiquen els llocs d'unió d'aquest gen amb els factors de transcripció PRC1 i PRC2, així com també altres factors de transcripció com STAT1, relacionats amb el desenvolupament i progressió de la resposta inflammatòria.

En estudis funcionals en cèl·lules de mamífer s'ha vist que els *knockdown* d'*ANRIL* disminueixen la proliferació i, per contra, la seva sobreexpressió accelera la proliferació, incrementa l'adhesió i disminueix l'apoptosi (88). Per tant, *ANRIL* regula mitjançant mecanismes epigenètics l'expressió en *cis* i en *trans* dels gens diana. D'aquesta manera, *ANRIL* s'uneix al silenciador epigenètic PRC1 i PRC2 i a les proteïnes activadores associades a PRC, RYBP i YY1, les quals al seu torn actuen activant altres gens *downstream* en la cadena de senyalització relacionats amb l'aterosclerosi explicant així, l'efecte proaterogènic d'*ANRIL* (88). Paradoxalment, *ANRIL* també activa, directa o indirectament, uns altres gens *downstream* que provoquen l'efecte contrari, és a dir, que són protectors de la formació de la placa d'ateroma. És el cas del gen *CARD8* (*Caspase Activation and Recruitment Domain family member 8*). El mecanisme detallat pel qual *ANRIL* regula l'expressió de *CARD8* encara es troba per identificar, però podria ser que aquesta doble funcionalitat a priori contradictòria del gen *ANRIL* contribuiria a l'equilibri regulador de l'aterogènesi.

El gen que codifica per a la proteïna *CARD8* està situat al cromosoma 19q13, conté 50 kb i està format per 14 exons, dels quals els tres primers no codifiquen per a proteïna i s'expressa en diferents teixits però especialment en els monòcits. *CARD8* és una molècula adaptadora que s'uneix a *NLRP3* i participa en la formació de l'inflamasoma. Un cop format l'inflamasoma, inhibeix l'activació de la *Caspasa-1* que trenca la pro-interleuquina-1 β per donar lloc a la forma madura de la *IL-1 β* . A més a més, regula negativament el factor d'activació nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$).

D'aquesta manera CARD8 inactiva la Caspasa-1, disminueix l'IL-1 β , disminueix l'NF κ B, activa l'apoptosi i finalment redueix la resposta inflamatòria (91).

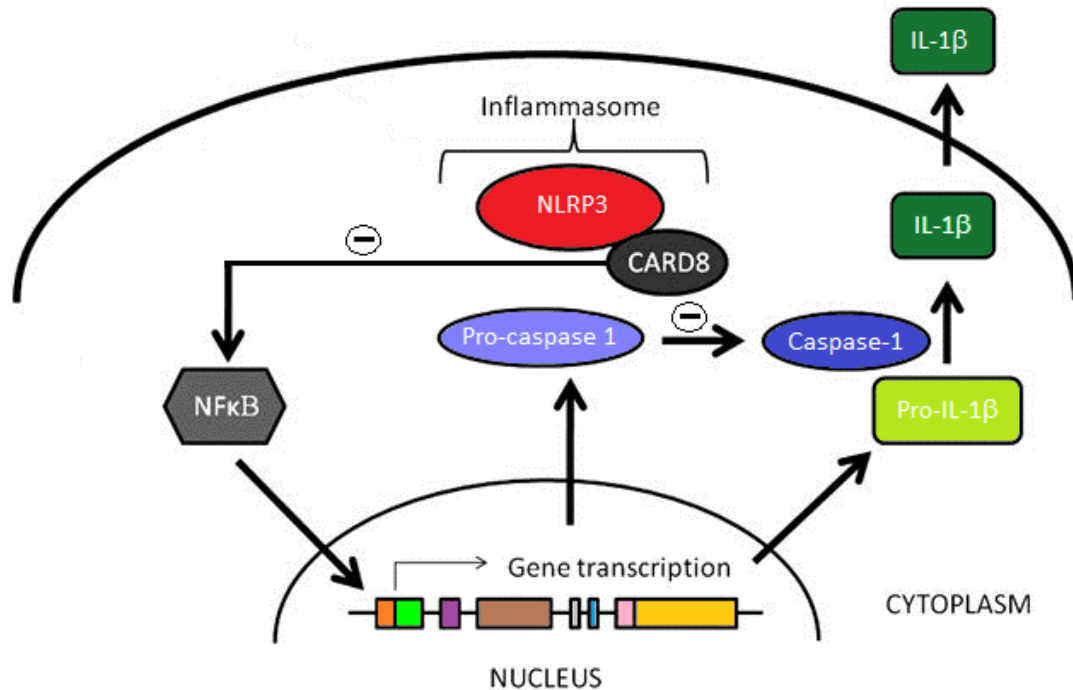


Figura 2. Mecanismes d'interacció de CARD8. Imatge adaptada amb permís de Springer/Nature. *Genes & Immunity*. 2010;11(4):351-6. Copyright 2010 © (92).

4.2. POLIMORFISMES DELS GENS *ANRIL* I *CARD8*

Els polimorfismes (*SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms*) del locus 9p21 han estat associats amb malaltia cardiovascular en diferents estudis GWAS, i dins d'aquest locus, l'*ANRIL* és considerat el gen candidat en relació a l'aterosclerosi. En primer lloc perquè diferents polimorfismes associats amb malaltia cardiovascular, estan localitzats dins del gen *ANRIL* (93). En segon lloc perquè *ANRIL* es troba expressat en cèl·lules i teixits involucrats amb l'aterosclerosi. I per últim, diferents estudis han trobat associació entre l'expressió del gen *ANRIL* i la severitat de l'aterosclerosi (93, 94).

4.2.1. Estudis d'associació del gen *ANRIL*

Actualment, hi ha quatre grans estudis d'associació en població caucàsica que relacionen polimorfismes del locus 9p21 del gen *ANRIL* amb malaltia cardiovascular.

Helgadottir *et al.* (95) va descriure l'any 2007 l'associació entre l'infart de miocardi i el polimorfisme rs10757278. L'estudi incloïa 4587 casos i 12767 controls en població europea.

Aproximadament, el 21 % dels individus eren homozigots GG i tenien 1.64 vegades major risc de patir un infart de miocardi, respecte als individus AA. A la vegada, va veure com diferents SNPs d'aquest locus es troben en desequilibri de lligament (95).

El segon estudi de McPherson *et al.* (96), va trobar associació amb malaltia cardiovascular en sis poblacions caucàsiques diferents de més de 23000 participants. Els homozigots per l'al·lel de risc (GG) tenien 30-40 % major risc de malaltia cardiovascular. Dels 100000 SNPs inicials van trobar associació amb el rs10757274 i rs2383206, i afirmaven que ambdós estan en desequilibri de lligament (96).

També l'any 2007, *Nature* publica un GWAS de *Wellcome Trust Case Control Consortium* (97) amb 14000 casos i 3000 controls amb set malalties comunes, entre elles, la malaltia cardiovascular. Van trobar que el locus 9p21 era el que més s'associava a malaltia cardiovascular i en concret, el polimorfisme rs1333049 del gen *ANRIL* (97).

Samani *et al.* (98), van realitzar dos estudis d'associació amb malaltia cardiovascular. En el primer van participar 1926 casos i els resultats van ser replicats en població germànica amb infart agut de miocardi (875 casos i 1644 controls). Van trobar que el locus 9p21 era el que tenia major associació amb malaltia cardiovascular i en concret el polimorfisme rs1333049 del gen *ANRIL* (98).

En aquests grans estudis i d'altres no classificats com a *GWAS*, també s'han relacionat diversos polimorfismes del gen d'*ANRIL* amb mortalitat global, amb mortalitat cardiovascular (99) i amb malaltia cardiovascular en població general: infart agut de miocardi (95), malaltia coronària (96-98, 100) i ictus isquèmic (101) en població blanca europea. També s'ha trobat relació amb aneurisma intracranial (102).

Per últim, val la pena destacar l'estudi PROCARDIS format per 4251 casos i 4443 controls, posa de manifest la presència d'un haplotip de risc cardiovascular de 53 Kb en el cromosoma 9p21.3 del gen *ANRIL* en població europea que s'hereta de manera conjunta (103).

4.2.2. Polimorfismes del gen *ANRIL*

A continuació es descriuen quatre dels polimorfismes mes rellevants del gen *ANRIL* en relació a la susceptibilitat de patir un episodi cardiovascular.

rs10757278

La variant genètica rs10757278 és un canvi d'una adenosina per una guanina (NC_000009.11:g.22124477A>G). La distribució al·lèlica descrita per HapMap en població europea és del 50 % d'al·lel G i 50 % d'al·lel A (104).

El polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* és el que més s'ha relacionat amb malaltia cardiovascular. Helgadottir *et al.* (95) a l'estudi GWAS comentat anteriorment reporta susceptibilitat amb malaltia cardiovascular en diferents poblacions (canadenca, danesa i americana de raça blanca). Conclou que els pacients amb genotip GG per aquest polimorfisme tenen 1.64 (IC95%: 1.47-1.82) vegades major susceptibilitat de patir un episodi cardiovascular respecte als pacients AG i aquests 1.26 (IC95%: 1.16-1.36) vegades major que els AA. En el mateix estudi, troben associació amb el risc de patir un infart agut de miocardi primerenc: els homozigots GG tenen un risc relatiu de 2.02 (IC95%: 1.72-2.36) de patir un IAM i els heterozigots AG un risc relatiu de 1.49 (IC95%: 1.31-1.69). Afegint el factor edat, mostren com els homes de menys de 50 anys i les dones de menys de 60 anys amb genotip GG tenen el doble de risc de presentar IAM que els individus AA (95). El mateix autor publica associació entre aquest SNP amb ictus, aneurisma de l'aorta abdominal i amb aneurismes intracranials (105).

S'han realitzat altres estudis poblacionals que han trobat associació entre el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* i infart agut de miocardi en població europea (106, 107), amb malaltia cardiovascular en població coreana (108) i amb el risc de patir malaltia cardiovascular prematura i familiar en població americana caucàsica (109).

Pel que fa a l'associació amb ictus isquèmic, hi ha controvèrsia entre les publicacions. Dues meta-anàlisis recents realitzats amb 21 i 8 estudis, respectivament conclouen l'existència d'associació entre el polimorfisme rs10757278 i ictus isquèmic en diferents poblacions (110, 111). En canvi, hi ha treballs on troben associació amb malaltia coronària però no amb ictus isquèmic (112, 113).

Per últim, l'estudi ADVANCE (*Atherosclerotic Disease, Vascular Function and Genetic Epidemiology*) (114) troba associació amb lesions coronàries precoces. El SNP presenta una freqüència al·lèlica del 54 % respecte a un 47 % en el grup de controls ancians (OR portadors al·lel G: 1.28 ajustat per edat i sexe, $P=7 \cdot 10^{-5}$).

El mecanisme mitjançant el qual aquest SNP rs10757278 d'*ANRIL* està associat amb malaltia cardiovascular és perquè altera un punt d'unió inhibitori de STAT1, un factor de transcripció que participa en la resposta inflamatòria i que s'ha associat amb angiogènesi i amb patologia ateroscleròtica (115). El factor de transcripció STAT1 regula la via de senyalització de la resposta inflamatòria estimulant la citoquina proinflamatòria interferó γ (116) i participa en la maduració dels monòcits (117).

rs4977574

La variant genètica rs4977574 és un canvi d'una adenosina per una guanina (NC_000009.11:g.22098574A>G). La distribució al·lèlica descrita per *HapMap* en població europea és de 46 % d'al·lel minoritari G i 54 % d'al·lel majoritari A (104).

És un dels polimorfismes destacats a diferents estudis *GWAS*. Samani *et al.* (98) amb 1926 casos i 2938 controls conclouen que els pacients GG tenen 1.35 (IC95%: 1.24-1.46) major risc de patir malaltia coronària respecte als portadors de l'al·lel A. Helgadottir *et al.* (95) troben associació amb malaltia cardiovascular en població europea i americana caucàsica. L'estudi *GWAS* dirigit per *Myocardial Infarction Genetics Consortium* associa el polimorfisme amb el risc de patir infart agut de miocardi, a més a més, també troben associació entre el polimorfisme i l'expressió de *CDKN2B* en teixit lipídic subcutani (118).

A més, ha estat relacionat amb infart agut de miocardi en diferents estudis poblacionals. L'estudi liderat per Lu Qi *et al.* (119) mostra com el polimorfisme s'associa amb major risc de patir un primer infart agut de miocardi amb un OR: 1.15 (IC95%: 1.03-1.29) en població hispànica. Szpakowicz *et al.* (120) descriuen associació amb supervivència als 5 anys en pacients d'alt risc de STEMI (*ST-elevation myocardial infarction*) amb un HR: 2.7 (IC95%: 1.3-5.4) en europeus.

D'altra banda, un estudi recent de l'any 2013 (121) hipotetitzava que si aquest polimorfisme s'associa amb malaltia cardiovascular, també ho hauria de fer amb ictus isquèmic. D'aquesta manera, Lökvist *et al.* (121) troben associació entre aquest polimorfisme i ictus isquèmic i malaltia dels vasos grans OR: 1.12 (IC95%: 1.04-1.20) en població sueca. Seguint amb el mateix raonament, si el SNP es relaciona amb malaltia cardiovascular, també ho ha de fer amb la malaltia arterioscleròtica subclínica: calcificacions de l'artèria coronària i/o la llum vascular de la caròtida. A l'estudi de Vargas *et al.* (122) l'any 2016, troben associació entre el polimorfisme

rs4977574 i calcificacions en artèries coronàries ($P=4\cdot 10^{-9}$) en població caucàsica i en població hispànica d'Estats Units.

rs10757274

La variant genètica rs10757274 és un canvi d'una adenosina per una guanina (NC_000009.11:g.22096055A>G). La distribució al·lèlica descrita per *HapMap* en població europea és de 49 % d'al·lel minoritari G i 51 % d'al·lel majoritari A (104).

McPherson *et al.* (96), a l'estudi *GWAS*, descriu associació amb infart agut de miocardi en població islandesa i població europea. Citen com els pacients heterozigots AG i els homozigots GG tenen un risc un 15-20 % i un 30-40 % respectivament incrementat respecte als homozigots AA patir malaltia coronària.

Paynter *et al.* (123) van veure en un estudi de cohorts prospectiu fet amb 22129 dones d'Estats Units que el risc de patir un episodi cardiovascular era major per a pacients GG: HR: 1.32 (IC95%: 1.07-1.63) i pels AG: HR: 1.25 (IC95%: 1.04-1.51), respecte als no portadors dels al·lells de risc (AA) (123). En població americana caucàsica, a l'estudi de casos-controls de Abdullah *et al.* (109) realitzat amb 310 casos de malaltia cardiovascular familiar prematura (40.3 ± 5.1 anys) i 560 controls, troben associació entre el polimorfisme i el risc de patir malaltia cardiovascular familiar.

Shen *et al.* també troben associació amb infart agut de miocardi en població caucàsica (106) i asiàtica (108). D'altra banda, estudis realitzats en altres races, com ara la xinesa, confirmen els resultats obtinguts amb IAM en altres cohorts (124).

Pel que fa a ictus isquèmic, Smith *et al.* (101) en el seu estudi comprova si SNPs associats amb malaltia coronària també s'associen amb ictus. Efectivament, l'estudi realitzat en població sueca troba associació entre el polimorfisme rs10757274 i ictus isquèmic (HR: 1.15 (IC95%: 1.05-1.26, $P=0.003$)) (101).

rs6475606

La variant genètica rs6475606 és un canvi d'una citosina per una timina (NC_000009.11:g.22081850C>T). La distribució al·lèlica descrita per *HapMap* en població europea és de 46 % d'al·lel minoritari T i 54 % d'al·lel majoritari C (104).

Pel que fa als estudis GWAS, McPherson *et al.* (96) mostren l'augment d'1.3 vegades de la susceptibilitat de patir una malaltia cardiovascular en els heterozigots CT i d'1.54 en els homozigots TT respecte als homozigots CC (96). Samani *et al.* (98) a l'estudi format per 875 casos i 1644 controls conclou, que els pacients TT tenen major risc de malaltia coronària que els pacients CC (OR: 1.28 (IC95%: 1.13-1.44, $P=5.2 \cdot 10^{-5}$)). A la vegada, a l'estudi *Wellcome Trust Case Control Consortium* realitzat amb 1926 casos i 2938 controls troben un OR de 1.37 (IC95%: 1.26-1.48, $P=4.4 \cdot 10^{-14}$) entre el polimorfisme i malaltia coronària (97).

L'estudi GWAS de Foroud *et al.* (102) mostra relació amb aneurisme intracranial, pacients TT 1.36 vegades major risc que els pacients CC (IC95%: 1.22-1.52, $P=3.59 \cdot 10^{-8}$). Aquests resultats han estat confirmats en població xinesa, demostrant que l'al·lel C redueix el risc d'aneurisma intracranial (OR: 0.710 (IC95%: 0.522-0.966, $P=0.029$)) (125).

D'altra banda, també ha estat associat amb dany miocardiàc després d'una intervenció quirúrgica de *By-pass* de les artèries coronàries, OR: 1.79 (IC95%: 1.28-2.50, $P=0.001$) en població caucàsica (126).

4.2.3. Polimorfisme del gen *CARD8*

rs2043211

La variant genètica rs2043211 del gen *CARD8* consisteix en una transversió d'una timina per una adenina (NM_001351787.1:c.30T>A) que provoca un canvi d'una Cys al codó 10 per un codó stop en el mRNA de *CARD8* (NP_001338713.1:p.Cys10Ter). La distribució al·lèlica descrita per HapMap en població europea és de 27 % d'al·lel minoritari T i 73 % d'al·lel majoritari A (104).

Diversos estudis mostren que pacients homozigots pel codó stop (TT) tenen una expressió de *CARD8* reduïda i conseqüentment la inhibició de la *Caspasa-1* i de *NFκB* no és tant efectiva provocant un augment de la resposta inflamatòria (127). D'altra banda, en els homozigots normals (AA) l'expressió de *CARD8* correcta, provoca la inhibició de la *Caspasa-1* i de *NFκB* i per tant, l'apoptosi cel·lular (128, 129). L'apoptosi de la cèl·lula és un mecanisme que està regulat i és necessari pel correcte funcionament del teixit, i així evitar la proliferació i descontrol cel·lular, com pot ser la resposta inflamatòria. La implicació d'aquest SNP en processos inflamatoris s'ha demostrat en diversos estudis observacionals o casos-controls on s'avaluava la malaltia de Crohn (92), la malaltia inflamatòria intestinal (130), l'artritis reumatoide (128, 131) i la malaltia d'Alzheimer (132), entre d'altres.

A diferència dels polimorfismes del gen *ANRIL*, els polimorfismes del gen *CARD8* no han mostrat grans resultats en els estudis *GWAS* publicats. A més a més, hi ha pocs articles que analitzin la relació entre aquesta variant genètica i la malaltia cardiovascular.

Paramel *et al.* (133) no troben associació entre el polimorfisme rs2043211 i l'infart agut de miocardi en dues poblacions sueques diferents però en el mateix estudi troben major expressió de mRNA de *CARD8* en plaques arterioscleròtiques respecte artèries sanes i alhora, associació entre l'al·lel minoritari T i menors concentracions de Proteïna C Reactiva (PCR) i de la proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1) (133).

D'altra banda, a l'estudi de Zhang *et al.* (134) conclouen que els pacients TT tenen major susceptibilitat d'arteriosclerosi obliterant respecte als pacients AA (OR: 1.494 (IC95%: 1.131-1.974, $P=0.005$)) en població xinesa.

Per contra, l'estudi de Bai *et al.* (135) conclou que l'al·lel minoritari T del polimorfisme rs2043211 de *CARD8* en homozigosi és protector front a l'ictus isquèmic en dues cohorts diferents (OR: 0.68 (IC95% 0.48-0.96, $P=0.028$)). En canvi, en el mateix estudi, no troben associació amb malaltia coronària ($P=0.235$).

I finalment, l'estudi de Roberts *et al.* (136) troben que l'al·lel minoritari T protegeix front a aneurisma de l'aorta abdominal (AT+TT vs AA; OR: 0.83 (IC95%: 0.69-0.99, $P=0.047$) en població caucàsica provinent de Nova Zelanda.

4.3. POLIMORFISMES DEL GEN *ANRIL* I DEL GEN *CARD8* EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL CRÒNICA

Els estudis publicats fins al moment mostren un paper important dels polimorfismes del gen *ANRIL* en l'aterosclerosi i la malaltia cardiovascular. La gran majoria d'estudis publicats han estat realitzats en població general i a la literatura hi ha poca informació respecte la contribució d'*ANRIL* i dels seus polimorfismes en el risc cardiovascular en pacients amb malaltia renal crònica, població de major risc de patir episodis cardiovasculars.

L'únic article realitzat amb malalts renals crònics, és l'article de Melk *et al.* (2013) (137). En aquest estudi van seleccionar 2064 pacients caucàsics receptors d'un trasplantament renal: 688 morts per causa cardiovascular i 1376 controls. En aquest treball troben que els polimorfismes rs10757278 i rs10757274 del gen *ANRIL* s'associen amb mortalitat cardiovascular de manera significativa. Els pacients GG pel polimorfisme rs10757274 tenen

1.30 (IC95%: 1.01-1.68, $P=0.043$) vegades major risc de mortalitat cardiovascular respecte als pacients AA i 1.36 (IC95%: 1.05-1.77, $P=0.020$) pel que fa al polimorfisme rs10757278. És interessant destacar també que en aquest treball la diabetis mellitus i el temps dels pacients en hemodiàlisi es relacionen significativament amb la mort cardiovascular.





II. HIPÒTESI





II. HIPÒTESI

És coneguda la relació que hi ha entre els factors de risc cardiovascular i el desenvolupament de la malaltia cardiovascular. En la població general, els factors de risc clàssics, com són: l'edat, el sexe, la diabetis mellitus, la dislipèmia, l'obesitat, l'hàbit tabàquic, el sedentarisme, entre d'altres, són els causants de la malaltia cardiovascular. Als pacients malalts renals crònics en tractament renal substitutiu, ja sigui en hemodiàlisi o trasplantament renal, a més a més dels factors de risc tradicionals, cal afegir-hi altres factors de risc no tradicionals propis de la insuficiència renal, del tractament immunosupressor o del propi trasplantament. Per tant, són pacients amb un elevat risc de presentar un episodi cardiovascular al llarg de la seva malaltia. És cert que els pacients receptors d'un trasplantament de ronyó tenen una menor incidència de malaltia cardiovascular respecte als pacients en hemodiàlisi, però tot i així, segueix sent major que la de la població general.

D'altra banda, l'agregació familiar de la patologia cardiovascular suggereix una contribució genètica en el seu desenvolupament. Diversos estudis d'associació *GWAS* han suggerit que algunes variants genètiques del gen *ANRIL* són marcadors fortament associats amb el risc de patir un esdeveniment cardiovascular: infart agut de miocardi, angina de pit, ictus isquèmic, inclús mortalitat cardiovascular, en població general.

A la vegada, es coneix que el gen *ANRIL* és un long non coding RNA que no codifica per a proteïna però que sembla ser que intervé com un important modulador de l'expressió de gens *downstream* en la cadena de senyalització. És el cas del gen *CARD8* que s'ha hipotetitzat que pot tenir un paper rellevant en l'ateroesclerosi.

Per tot això, la hipòtesi plantejada en aquesta tesi doctoral és que en pacients amb malaltia renal crònica, ja siguin en diàlisi com trasplantats renals, a més a més dels factors de risc no genètics ja citats, els polimorfismes del gen *ANRIL* poden tenir un paper en la susceptibilitat a patir un episodi cardiovascular.





III. OBJECTIUS





III. OBJECTIUS

Objectius principals

1. Estudiar la influència dels polimorfismes rs10757274, rs4977574, rs10757278 i rs6475606 del gen *ANRIL* sobre el risc de patir un episodi cardiovascular en pacients amb malaltia renal crònica en diàlisi.
2. Estudiar el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* com a marcador d'episodis cardiovasculars en pacients receptors d'un trasplantament renal.

Objectius secundaris

1. Avaluar el desequilibri de lligament dels quatre polimorfismes del gen *ANRIL* rs10757278, rs4977574, rs10757274 i rs6475606 en la nostra població d'estudi en diàlisi.
2. Estudiar la sinergia entre el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* i la diabetis mellitus sobre el risc de patir un episodi cardiovascular en pacients en diàlisi.
3. Avaluar l'associació entre el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* i la mortalitat global i cardiovascular en pacients receptors d'un trasplantament renal.
4. Estudiar la relació del polimorfisme rs2043211 del gen *CARD8* amb els episodis cardiovasculars, així com la mortalitat global i cardiovascular en pacients receptors d'un trasplantament de ronyó.
5. Estudiar la sinergia entre els polimorfismes rs10757278 del gen *ANRIL* i rs2043211 del gen *CARD8* en la susceptibilitat a patir un episodi cardiovascular en pacients receptors d'un trasplantament renal.





IV. RESULTATS





CAPÍTOL 1

Arbiol-Roca A, Padró-Miquel A, Hueso M, Navarro E, Alía-Ramos P, González-Álvarez MT, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM, Lloberas N.

Association of *ANRIL* gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients.

Clin Chim Acta. 2017;466:61-7.





Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients



A Arbiol-Roca^a, A Padró-Miquel^a, M Hueso^b, E Navarro^c, P Alía-Ramos^a, MT González-Álvarez^b, I Rama^b, J Torras^b, JM Grinyó^b, JM Cruzado^b, N Lloberas^{b,*}

^a Biochemistry Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^b Nephrology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^c Molecular Oncology Laboratory, IDIBELL, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2016

Received in revised form 28 December 2016

Accepted 28 December 2016

Available online 2 January 2017

Keywords:

Chronic kidney disease

Hemodialysis

Single nucleotide polymorphism

ANRIL gene

Major adverse cardiovascular event

ABSTRACT

Background: Cardiovascular disease is the leading cause of death in patients with chronic kidney disease (CKD). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in ANRIL gene have been associated with higher cardiovascular morbidity and mortality in general population. The main objective was to ascertain whether ANRIL polymorphisms could identify risk of major adverse cardiovascular event (MACE) in patients starting on hemodialysis (HD).

Methods: This was a prospective observational cohort study. 284 CKD patients starting on HD were included in the study and followed until achievement of the primary end-point (MACE) or end of the study. All patients were genotyped for four ANRIL SNPs (rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606). Kaplan-Meier curves and multivariate Cox survival analyses, together with multiple logistic regression were used to analyze the association between ANRIL SNPs and MACE.

Results: We found that ANRIL SNP rs10757278 was a representative SNP of a strong linkage disequilibrium block and showed significant genotypic associations with MACE in hemodialysis patients. Homozygous patients for the risk allele (GG) showed 2.17 (1.05–4.49) fold increased risk of MACE during hemodialysis than carriers of the protective allele (AA or AG). Diabetes mellitus was a strong enhancer of this effect.

Conclusions: Our results indicate that ANRIL polymorphisms may confer risk to development of MACE in incident patients on hemodialysis.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The prevalence of end-stage renal disease (ESRD) could rise sharply over the next few decades, driven by population aging and an increasing prevalence of diabetes and hypertension [1]. Currently, affects 8–16% population worldwide with a regular and progressive annual growth trend in the number of patients on renal replacement therapies (RRT) [2]. Hemodialysis (HD) is the most frequent form of RRT and can be life-saving [3,4]. However, mortality rates under this technique remain high [5]. In fact, reported annual mortality is between 13 and 20%, being

annual cardiovascular mortality of 9% [6]. Therefore, CKD patients on HD are a high-risk group for cardiovascular morbidity and mortality [2,7]. In patients on HD, cardiovascular mortality risk is 10 to 20 times higher than in the general population and it is even higher in patients younger than 45 years old [3,8]. This elevated risk may be due in part to a higher prevalence of traditional risk factors such as advanced age, hypertension, diabetes mellitus and dyslipidemia. Moreover, hemodialysis encompasses other inherent risk factors such as anemia and alterations in the calcium and phosphate metabolism [9]. On the other hand, in addition to the traditional risk factors, the contribution of genetic predisposition to cardiovascular disease (CVD) could play an important role [10].

In recent years, there is increasing evidence suggesting that noncoding RNAs (ncRNAs), which are functional RNA molecules not translated into proteins, play an important role in development of cardiovascular disease [11]. Interestingly, genome-wide association studies (GWAS) have identified the a Long non-coding RNA (LncRNA) called ANRIL (Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus) located on chromosome 9p21.3, as the strongest genetic factor associated with atherosclerotic cardiovascular disease [12].

Abbreviations: ANRIL, Noncoding Antisense RNA in the INK4 Locus; CKD, chronic kidney disease; CVD, cardiovascular disease; ESRD, end-stage renal disease; GWAS, genome-wide association studies; HD, hemodialysis; MACE, major adverse cardiovascular event; PRC, Polycomb repressive complexes; RRT, renal replacement therapies; SNP, single nucleotide polymorphism.

* Corresponding author at: Nephrology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Lab Exp Nephrology 4122, Pab. Govern, 4a planta, UB, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

E-mail address: nlloberas@ub.edu (N. Lloberas).

The core risk haplotype spans approximately 50 kb and does not contain protein coding genes. Furthermore, it has been suggested that ANRIL expression induces a disruption of an inhibitory STAT1 binding site [13] and binds to the epigenetic silencer Polycomb repressive complexes (PRC) 1 and 2 and to PRC-associated activating proteins RYBP and YY1, regulating target genes in cis and in trans. ANRIL overexpression led to accelerate proliferation, increased adhesion and decreased apoptosis [12] mechanism related with the pathogenesis of atherosclerosis.

Several GWA studies have shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) from ANRIL are associated with cardiovascular and all-cause mortality [14] and CVD morbidity in general population: myocardial infarction [15], coronary heart disease [16–18], ischemic stroke [19], or intracranial aneurysm susceptibility [20]. There are several studies and meta-analysis describing significant association between rs10757278 polymorphism and myocardial infarction [21–25]. Helgadottir et al. identified that variant rs10757278 on chromosome 9p21, adjacent to the tumor suppressor genes CDKN2A and CDKN2B, was strongly associated with myocardial infarction in European ancestry [15]. ANRIL common variant rs4977574 has been considered a powerful atherosclerotic biomarker and it was shown to be associated with myocardial infarction in European whites [15–17,26] and Hispanic population [27]. Cardiovascular heart disease has been reported for SNP rs6475606 [20]. ANRIL SNP rs10757274 has also been associated with the development of atheroma plaque as well as with the promotion of thrombogenesis [28].

However, the information in chronic kidney disease patients is limited. There is only one study in renal transplant recipients that showed a higher risk for cardiovascular events in patients carrying ANRIL SNPs (rs10757274 (GG) and rs10757278 (GG)) [29].

In the present study, four SNPs were selected based on previous results from the above mentioned GWA studies [13–19]. Our hypothesis is that ANRIL polymorphisms could mediate susceptibility to major adverse cardiovascular event (MACE) in CKD patients on HD.

2. Material and methods

2.1. Study population

The study protocol was approved by Ethics Committee of Bellvitge University Hospital. The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Helsinki Declaration. Informed written consent has been obtained from all subjects.

This was an observational follow-up cohort study. The study population was constituted by 284 CKD patients that started on hemodialysis (HD) at Bellvitge University Hospital, and whose DNA was available. All of them were under study to be included to the waiting list for a renal transplant. The main objective was to ascertain whether ANRIL polymorphisms could identify risk of MACE in patients starting on HD. Major adverse cardiovascular event (MACE) was defined as myocardial infarction, unstable angina or stroke. Patients who did not achieve the end point were followed up until the end of data collection, September 30th 2015, renal transplant or death.

Recorded baseline variables were age, gender, date of HD initiation, hypertension, pre-existence of cardiovascular disease, history of transplantation, diabetes mellitus, serum creatinine, albumin, calcium, phosphorous, parathyroid hormone, cholesterol and ferritin concentration, blood hemoglobin and hemoglobin A_{1c}. All routine laboratory measurements were done using accredited assay methods.

2.2. SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of patients using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Sydney, Australia) and was stored at –80 °C.

Genotyping of the SNPs (rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606) was carried out using TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 384-well plates that included positive and negative controls. TaqMan PCR and genotyping analyses were carried out on the 7900HT Fast Real-time PCR System, Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Samples were genotyped in CCIT (Centres Científics i Tecnològics) at University of Barcelona.

Genotyping was done using Taqman SNP assay kit (part no. 4351379; assays ID: C_11841860_10 (rs10757278), C_1754681_10 (rs4977574), C_26505812_10 (rs10757274) and C_29146328_20 (rs6475606) from Applied Biosystems (Foster City, CA) following standard recommendations. Briefly, 0.5 µL assay mix was mixed with 5 µL iTaq Universal Probes Supermix (part no. 172-5130), 1 µL genomic DNA (10–20 ng/µL) and 3.5 µL water (B. Braun, Barcelona, Spain). The resulting mixture was heated to 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min in the thermal cycler. It was then followed by 40 cycles of denature at 95 °C for 15 s and anneal/extend at 60 °C for 1 min.

2.3. Statistical analysis

Statistical calculations were performed with STATA 12.0 software. Descriptive analyses were performed to summarize the baseline data and the demographic characteristics for both hemodialysis patients without MACE and with MACE. Allele frequency distribution was tested for Hardy-Weinberg equilibrium. Linkage study between SNPs was performed by chi-2 test. Kaplan-Meier survival curves from hemodialysis initiation to the end point were compared by log-rank test to explore the relation between genotypes and MACE.

Cox's proportional hazard models were employed to analyze the relationship between SNPs and MACE. Colinearity study was done to discard related covariates ($r > 0.4$) for the multiple regression analysis. Covariates that were statistically significant in the univariate model were kept to perform a backward stepwise analysis. The relationship between ANRIL SNPs and MACE was also assessed by a multivariate logistic model. Finally, patients were stratified according to the SNP that was more related with MACE and with presence or absence of diabetes. The risk of MACE was compared. The level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Patients

A total of 284 adult patients (mean age 56 ± 2 yrs) were included in the present study. Demographic and physiologic data relative to all included patients stratified by the end point MACE are summarized in Table 1.

The mean follow-up period was 2.7 ± 0.3 yrs. During this period, 41 patients (14.4%) suffered from a MACE. The remaining patients ($n = 243$) were censored when one of the following situations occurred: first, renal transplantation ($n = 181$); second, loss of follow-up ($n = 14$) and third, non-cardiovascular death ($n = 39$). Finally, there were 9 patients MACE-free still on HD at the end of data collection. MACE diagnosis was performed between 3 months and 5 years after HD initiation (3.4 ± 1.1 yrs).

3.2. SNPs distributions

All investigated variants were highly prevalent. Approximately, the frequencies of homozygous for protective allele, heterozygous and homozygous for the risk allele genotypes were 25%, 50% and 25%, respectively. Frequencies observed in the present study were in accordance with reported allele frequencies in a Caucasian population [15,16] and all of them did not significantly deviate from the Hardy-Weinberg

Table 1
Baseline clinical and demographic characteristics of Total, MACE and MACE-free in hemodialysis patients.

	Total n = 284		MACE-free n = 243		MACE n = 41		P value
	Mean	(95% CI)	Mean	(95% CI)	Mean	(95% CI)	
Age (years)	55.9	(54.0–57.7)	54.9	(52.9–56.9)	61.7	(57.7–65.6)	0.011
Sex (male) (%)	40.1		62.1		46.3		0.056
Hypertension (%)	67.6		65.4		80.5		0.057
MACE prior-HD (%)	23.2		18.5		51.2		<0.001
Diabetes Mellitus (%)	59.2		53.9		90.2		<0.001
Renal transplantation (%)	66.9		74.5		22.0		<0.001
Creatinine (μmol/L)	580.1	(552.2–608.0)	586.6	(555.4–617.8)	541.8	(486.0–597.7)	0.27
Albumin (g/L)	38.1	(37.5–38.8)	38.4	(37.7–39.1)	36.6	(34.7–38.5)	0.061
Calcium (mmol/L)	2.18	(2.15–2.22)	2.19	(2.15–2.24)	2.14	(2.06–2.22)	0.31
Phosphorous (mmol/L)	1.94	(1.85–2.03)	1.94	(1.84–2.04)	1.94	(1.72–2.15)	0.96
Cholesterol (mmol/L)	4.73	(4.58–4.88)	4.70	(4.53–4.87)	4.90	(4.51–5.29)	0.34
Ferritin (μg/L)	243.6	(189.7–297.5)	262.9	(195.3–330.5)	185.8	(115.1–256.4)	0.22
Hemoglobin (g/L)	102.8	(101.0–104.7)	102.8	(100.8–104.8)	103.1	(97.7–108.4)	0.92
Hemoglobin A1C (%)	6.7	(6.4–7.0)	6.5	(6.2–6.9)	7.1	(6.4–7.8)	0.10
Parathyroid hormone (pmol/L)	38.7	(31.7–45.7)	40.0	(31.6–48.4)	32.8	(24.5–41.1)	0.43

Continuous variables were expressed as mean and 95% CI: confidence interval, categorical variables were expressed as percentages to the entire study patients. *P* values in bold were statistically significant in the Student *t*-test or Chi-square test that compares MACE-free versus MACE cohort.

equilibrium ($P > 0.1$). Genotype distribution for each polymorphism is shown in Table 1 in Ref [30].

According to genetic localization data, the SNPs rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606 are closely linked. Pairwise comparison using exact analysis of test disequilibrium yielded departures from independence for all pair of loci (r^2 between 0.65 and 0.96, $P < 0.001$), confirming linkage disequilibrium for the four SNPs (see Table 2 and Fig. 1 in Ref [30]).

3.3. MACE-free survival analysis

Kaplan Meier survival curves for each polymorphism along with the signification of the log rank test by protective allele vs homozygosity for the other allele are shown in Figs. 1–4 (there is one hash mark at each censoring time).

For SNPs rs10757278, rs4977574 and rs10757274, homozygosity for the risk allele (GG) showed a significantly higher risk of MACE ($P = 0.0153$, $P = 0.0327$ and $P = 0.0464$, respectively) than carriers for protective allele (AA or AG). For the SNP rs6475606, similar trend was observed although not achieving statistical significance: patients

homozygous for the risk allele (TT) showed more MACE than carriers for the protective allele (CC or CT) ($P = 0.0883$).

3.4. Cox's proportional hazard models

Relationship between MACE and ANRIL polymorphisms (homozygous for risk allele) and covariates were evaluated initially by univariate Cox regression analysis (Table 2). We found statistically significant relationship between MACE and rs10757278, rs4977574, rs10757274, age, sex, hypertension, previous MACE before starting on HD, diabetes mellitus, renal transplantation and serum albumin concentration.

We tested for colinearity among statistically significant covariates in the univariate models and found that diabetes mellitus was correlated with age ($r = 0.61$), pre-existence of cardiovascular disease ($r = 0.40$) and renal transplantation ($r = 0.60$). Therefore, the only variable that was kept in the model was diabetes mellitus because of its causal role on the others.

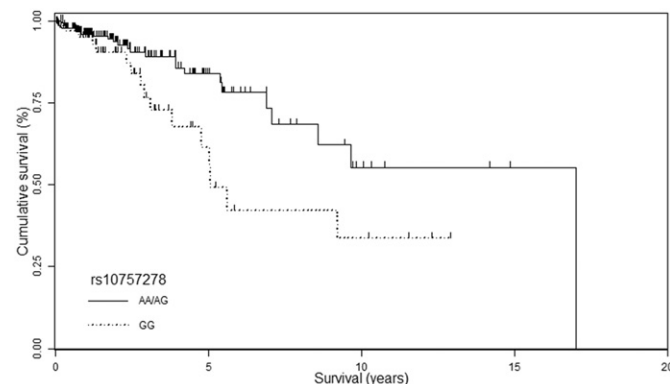
To assess the influence of ANRIL SNPs on MACE we performed a backward stepwise multivariate Cox regression analyses, adjusting for the selected covariates (sex, hypertension, diabetes mellitus and albumin concentration). Diabetes mellitus was the only covariate that was kept on the adjusted model (Table 3).

ANRIL polymorphism rs10757278 (GG) was the only one that showed a significant relationship with MACE ($P = 0.045$, $HR = 1.91$) in the multivariate model. Patients homozygous for the risk allele (GG genotype) showed 1.91 (1.02–3.61) fold increased risk of major adverse

Table 2
Univariate Cox survival analyses of MACE in hemodialysis patients.

Variables	HR	(95% CI)	<i>P</i>
rs10757278 (GG)	2.15	(1.14–4.01)	0.018
rs4977574 (GG)	1.95	(1.04–3.66)	0.036
rs10757274 (GG)	1.88	(1.00–3.55)	0.050
rs6475606 (TT)	1.72	(0.92–3.22)	0.092
Age	1.04	(1.01–1.06)	0.002
Sex (male vs female)	2.32	(1.24–4.34)	0.009
Hypertension	2.69	(1.18–6.12)	0.018
MACE prior-HD	2.83	(1.52–5.29)	0.001
Diabetes mellitus	6.22	(1.91–20.2)	0.002
Renal transplantation	0.17	(0.08–0.37)	<0.001
Creatinine	1.00	(1.00–1.00)	0.15
Albumin	0.95	(0.90–0.99)	0.041
Calcium	0.61	(0.21–1.79)	0.37
Phosphorous	1.03	(0.61–1.75)	0.92
Cholesterol	1.13	(0.89–1.43)	0.32
Ferritin	1.00	(1.00–1.00)	0.64
Hemoglobin	1.01	(0.99–1.03)	0.35
Hemoglobin A1C	1.25	(0.97–1.60)	0.079
Parathyroid hormone	0.99	(0.97–1.01)	0.42

The SNP was introduced in the model as homozygous for the non-protective allele compared with carriers for the protective allele. HR hazard ratio, CI confidence interval, *P* values in bold were statistically significant.

**Fig. 1.** Kaplan-Meier survival curve for the rs10757278 AA/AG vs GG. Log rank test, $P = 0.015$.

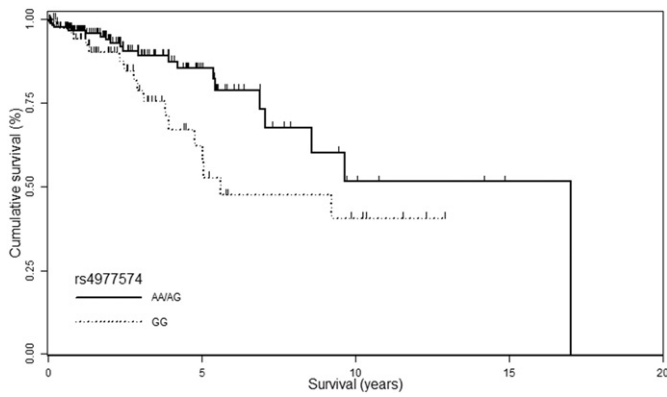


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curve for the rs4977574 AA/AG vs GG. Log rank test, $P = 0.033$.

cardiovascular event than patients carrying the protective allele (AA or AG genotype).

3.5. Logistic regression proportional odds model

We further assessed the influence of the ANRIL SNPs on MACE regardless of the time elapsed between the initiation of HD and the event. The logistic analysis adjusted by covariates showed that rs10757278 (GG) and rs4977574 (GG) were significantly correlated with MACE together with diabetes mellitus. In detail, for rs10757278, patients homozygous for the risk allele (GG) had 2.17 (1.05–4.49) fold increased risk of MACE than carriers of the protective allele ($P = 0.037$). The same occurred for rs4977574, as patients with the GG genotype had 2.28 (1.12–4.63) higher risk to suffer from a MACE than A-carrier patients ($P = 0.023$). The remaining SNPs (rs10757274 and rs6475606) didn't achieve statistical significance but showed the same trend in relation to MACE ($P = 0.085$ and $P = 0.19$).

In both statistical models, diabetes mellitus was more significant than ANRIL SNPs and showed higher hazards ratios. Approximately, diabetic patients had 7-fold increased risk of MACE than non-diabetic patients.

3.6. Risk stratification

Considering the Cox and logistic adjusted model for each polymorphism, diabetes mellitus and SNP rs10757278 showed the best association with the study end point (MACE).

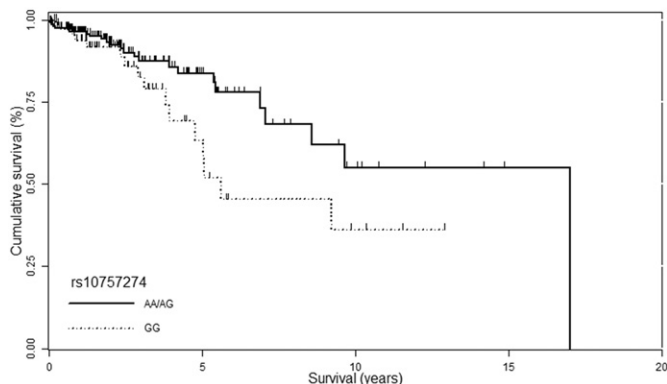


Fig. 3. Kaplan-Meier survival curve for the rs10757274 AA/AG vs GG. Log rank test, $P = 0.046$.

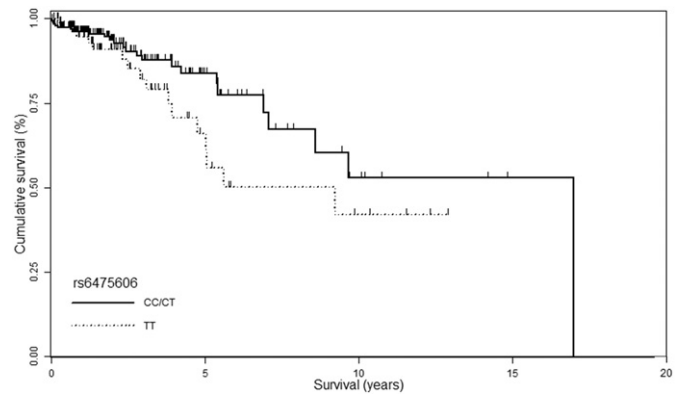


Fig. 4. Kaplan-Meier survival curve for the rs6475606 CC/CT vs TT. Log rank test, $P = 0.089$.

According to these two variables, patients were classified from highest to lowest risk to MACE: GG-diabetes mellitus, A-diabetes mellitus, GG-non diabetes mellitus and A-non diabetes mellitus. Using Cox regression, hazard ratios were calculated relative to the group displaying a higher risk of MACE (Table 4).

The first group showed 47% less MACE risk ($P = 0.057$), second group 81% less risk ($P = 0.11$) and third group 91.5% less risk ($P = 0.001$) than GG - diabetes mellitus group.

4. Discussion

Cardiovascular mortality is 10 to 30 times higher in individuals with ESRD than in the general population when matched for age, ethnic origin and gender. Particularly, the HD population is at high risk for cardiovascular disease [2,7]. Recent findings from genome-wide association studies have been pointing to novel disease-associated DNA regions, opening doors for new and more accurate targets for research and future therapies for several diseases. One of these new locus is the chromosome 9p21, which was highlighted as the strongest genetic susceptibility locus for cardiovascular disease [12,16,17,31–33].

Recent genome-wide association studies have identified a large antisense non-coding RNA gene (ANRIL) as a genetic susceptibility locus associated with coronary disease [15–18]. Many of the polymorphisms in the 9p21 locus disrupt several predicted transcription factor binding sites [13] suggesting that the locus expression is regulated by numerous signaling pathways. In particular, some of these transcription factors are involved in key physiological processes such as inflammation, RAS response, and FOXO-Sirtuin-longevity signaling. ANRIL mediates the response to at least two of these signaling pathways: STAT1 [13] and RAS [34]. ANRIL locus is very complex since it encodes a high number of ANRIL splicing isoforms [35,36]. The mechanism by which SNPs at the ANRIL locus modify risk to MACE is currently unknown. It has been described that these SNPs alter the profile of ANRIL splicing

Table 3
Multivariate Cox survival analyses of MACE in hemodialysis patients.

Variables	HR	(95% CI)	P
rs10757278 (GG)	1.91	(1.02–3.61)	0.045
Diabetes mellitus	5.85	(1.79–19.1)	0.003
rs4977574 (GG)	1.68	(0.90–3.15)	0.11
Diabetes mellitus	5.80	(1.77–18.9)	0.004
rs10757274 (GG)	1.56	(0.82–2.95)	0.17
Diabetes mellitus	5.79	(1.77–18.9)	0.004
rs6475606 (TT)	1.38	(0.73–2.60)	0.32
Diabetes mellitus	5.84	(1.78–19.2)	0.004

The SNP was introduced in the model as homozygous for the non-protective allele compared with carriers for the protective allele.

HR hazard ratio, CI confidence interval, P values in bold were statistically significant.

Table 4

Cox's regression analyses for risk stratification of MACE by diabetes mellitus and rs10757278 genotype in hemodialysis patients.

Groups	HR	(95% CI)	<i>P</i>
A-diabetes mellitus ^a	0.528	(0.273–1.018)	0.057
GG-non diabetes mellitus ^a	0.190	(0.025–1.451)	0.11
A-non diabetes mellitus ^a	0.085	(0.020–0.376)	0.001

HR hazard ratio, CI confidence interval, *P* values in bold were statistically significant.

^a Compared with GG-diabetes mellitus group.

isoforms, at the transcriptional or splicing level or even generating circular forms of ANRIL [37], which in turn would impact on the expression of the neighbouring p15/CDKN2B-p16/CDKN2Ap14/ARF (INK4/ARF) gene cluster, involved in the control of cell proliferation [38].

Association studies published so far are mainly performed with general population [16,17]. Up to now, regarding CKD, there is only one study in renal transplant recipients [29] while the effect of ANRIL SNPs on HD patients has not been explored yet. The current study shows, for the first time, that ANRIL SNPs are related to the development of major adverse cardiovascular events (MACE) in incident HD patients.

The specific allele frequencies of the four ANRIL SNPs studied (rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606) were in Hardy-Weinberg equilibrium and comparable to previous reports [16–18,39]. In order to assess the tag-SNP best applicable for clinical application in our population we test for linkage disequilibrium. We found a strong linkage disequilibrium block between these four ANRIL SNPs, as it was previously demonstrated [33]. Furthermore, from the 4 ANRIL SNPs studied, the most representative with the outcome studied in our population was rs10757278, corroborating data described by Helgadottir et al. [15]. We decided to gather genotypes in the cohort of carriers of the protective allele and non-carriers (patients homozygous for the risk allele) since their MACE-free curves were similar. Results showed differences for studied SNPs when genotypes were classified in two groups. For SNPs: rs10757278, rs4977574 and rs10757274 carriers of A-allele (AA or AG) were compared to patients homozygous GG, whereas for SNP rs6475606, carriers of C-allele (CC or CT) were compared with the TT genotype. This classification of the protective and risk allele is consistent with previous studies [15,16].

The results of our study confirm the previously reported associations between these SNPs and MACE [40–42]. In addition, we extend these findings, for the first time, to hemodialysis population. For the four ANRIL SNPs studied (rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606) carriers of protective allele had lower MACE incidence than homozygous patients for the risk allele. These results were supported by the univariate models for the COX regression showing a significant relationship between rs10757278 (GG) (*HR* = 2.15), rs4977574 (GG) (*HR* = 1.95) and rs10757274 (GG) (*HR* = 1.88) with MACE. On the other hand, the SNP rs6475606 (TT) did not achieve statistical significance (*P* = 0.092). Therefore, non-carriers of the protective allele showed twice likelihood to suffer MACE than carriers. The effect size seen in HD patients investigated in this study was in accordance with that described in previous studies in non CKD cohorts patients [15,16].

Relevant cardiovascular risk factors in HD population [43] were analyzed to minimize bias in our results. Age, previous CVD and renal transplantation were correlated with presence of diabetes mellitus. Aging is an important contributor to type 2 diabetes and CVD is a comorbidity variable also related to DM. Therefore, some diabetic patients are not suitable candidates for renal transplant [44]. Consequently, the only confounding variable included in the regression model was diabetes mellitus because it is highly related with all the others. Based on Cox regression multivariate analysis, only rs10757278 (GG) ANRIL polymorphism had a significant relevance with MACE (*P* = 0.045, *HR* = 1.91 (1.02–3.61)). Thus, GG patients showed a 1.91 times higher and earlier

risk of MACE than patients carrying the A allele. This result is in agreement with findings from Assimes et al. [41] that found the strongest association with this SNP rs10757278 (GG) and cardiovascular artery disease and Do R et al. [42] that showed association with myocardial infarction.

On the other hand, when logistic regression was performed to assess the correlation between ANRIL SNPs and MACE regardless of time, rs10757278 (GG) and rs4977574 (GG) achieved statistical significance. Therefore, in accordance with studies by Melk et al., GG patients had approximately twice risk for MACE during HD period compared to A carriers. In contrast, there are studies that found statistical relationship between rs10757274 or rs6475606 and MACE. Foroud et al. [20] showed a relationship between rs6475606 and intracranial aneurysms and Ro Do et al. [42] found association between rs10757274 and myocardial infarction. Our results show the same trends but probably, higher sample size is needed to achieve statistical significance. Moreover, these SNPs are in linkage disequilibrium and inherited in block. In both models (Cox and logistic), diabetes mellitus achieved strong statistical power and higher hazards ratios when it was compared with SNPs data. In fact, diabetes mellitus has been recognized as a major risk factor for atherosclerosis with a complex pathogenesis involving multiple biological processes [45].

Given the strong correlation between diabetes and MACE, we lead to better understanding the role of ANRIL SNPs in this relationship. After stratification of the population according to the SNP together with the diabetes status, we concluded that rs10757278 polymorphism added prognostic information to previously established risk factors for cardiovascular disease like diabetes mellitus. Therefore, among DM population on HD, non-carriers of protective allele (GG) the susceptibility to MACE is particularly higher than in carriers of the protective allele (A), allowing to stratify patients into different levels of MACE risk. This finding corroborates the results described by Melk et al. in renal allograft recipients [29].

Only expression of ANRIL isoforms containing exons proximal to the INK4/ARF locus has been correlated with risk of arteriosclerotic vascular disease [37]. Thus, protective allele A of rs10757278 affects splicing of ANRIL transcripts since it inhibits skipping of exon 15 and promotes the production of cANRIL species (endogenous circular RNA structures) ending in exon 14 [37]. In addition, the atherosclerotic risk allele at rs10757278 decreases expression of ANRIL and the coding INK4/ARF transcripts that regulate cell division, although the mechanism by which such distant genetic variants influence INK4/ARF tumor suppressor locus expression is unknown [37]. Thus, the mechanism linking ANRIL polymorphism and MACE may be related with changes in ANRIL structure and INK4/ARF regulation. Interestingly, Jarinova et al., demonstrated that the 3' end region of ANRIL and its neighbouring intergenic region, which included some of the risk SNPs, had activity as a transcriptional enhancer and could impact on the expression of short/long ANRIL isoforms [46]. It is tempting to speculate that these short/long isoforms could differentially interact with the polycomb repressive complexes to differentially regulate the chromatin structure around the INK4/ARF locus [47]. Unfortunately, we could not examine the relationship between ANRIL SNPs and relative expression levels in the tissue, because specimens were not available.

In summary, the major finding of this study was that rs10757278 ANRIL SNP, as a representative of a strong linkage disequilibrium block, showed significant genotypic association with major adverse cardiovascular events (MACE) in patients on HD. Positive associations between ANRIL SNP and MACE remained even after adjustment for other risk factors for MACE as DM. We found an adding effect between diabetes mellitus and ANRIL SNP rs10757278 that improved the patient risk stratification. This study is the first showing that the associations of ANRIL SNPs with MACE are also applicable in incident patients on HD. Further studies will need to assess the clinical benefits (or the contribution) of ANRIL polymorphisms in the management of MACE in HD population.

Acknowledgements

Nuria Lloberas is a researcher from ISCIII Miguel Servet (CP06/00067) and REDinREN RD12/0021/003. Ariadna Arbiol enjoys a post residence grant from Fundación José Luis Castaño. This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III and Ministerio de Sanidad y Consumo (P12/01564 and P115/00871), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) cofunded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-a way to Build Europe.

References

- [1] T. Liyanage, T. Ninomiya, V. Jha, B. Neal, H.M. Patrice, I. Okpechi, M.H. Zhao, J. Lv, A.X. Garg, J. Knight, A. Rodgers, M. Gallagher, S. Kotwal, A. Cass, V. Perkovic, Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review, *Lancet* 385 (9981) (2015) 1975–1982.
- [2] V. Jha, G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A.Y. Wang, C.W. Yang, Chronic kidney disease: global dimension and perspectives, *Lancet* 382 (9888) (2013) 260–272.
- [3] A. Ortiz, A. Covic, D. Fliser, D. Fouque, D. Goldsmith, M. Kanbay, F. Mallamaci, Z.A. Massy, P. Rossignol, R. Vanholder, A. Wiecek, C. Zoccali, G.M. London, Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure, *Lancet* 383 (9931) (2014) 1831–1843.
- [4] B.D. Bradbury, R.B. Fissell, J.M. Albert, M.S. Anthony, C.W. Critchlow, R.L. Pisoni, F.K. Port, B.W. Gillespie, Predictors of early mortality among incident US hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS), *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2 (1) (2007) 89–99.
- [5] S. Anand, A. Bitton, T. Gaziano, The gap between estimated incidence of end-stage renal disease and use of therapy, *PLoS One* 8 (8) (2013), e72860.
- [6] A.S. Levey, R. Atkins, J. Coresh, E.P. Cohen, A.J. Collins, K.U. Eckardt, M.E. Nahas, B.L. Jaber, M. Jadoul, A. Levin, N.R. Powe, J. Rossert, D.C. Wheeler, N. Lameire, G. Eknoyan, Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes, *Kidney Int.* 72 (3) (2007) 247–259.
- [7] M. Tonelli, N. Wiebe, B. Culleton, A. House, C. Rabbat, M. Fok, F. McAlister, A.X. Garg, Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (7) (2006) 2034–2047.
- [8] D.J. de Zager, D.C. Grootendorst, K.J. Jager, P.C. van Dijk, L.M. Tomas, D. Ansell, F. Collart, P. Finne, J.G. Heaf, J. De Meester, J.F. Wetzels, F.R. Rosendaal, F.W. Dekker, Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis, *JAMA* 302 (16) (2009) 1782–1789.
- [9] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, Suppl.(3), *Kidney Inter.*, 2013 1–150.
- [10] D.M. Lloyd-Jones, B. Nam, R.B. D'Agostino Sr., et al., Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: A prospective study of parents and offspring, *JAMA* 291 (18) (2004) 2204–2211.
- [11] J.C. Scheuermann, L.A. Boyer, Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease, *EMBO J.* 32 (13) (2013) 1805–1816.
- [12] L.M. Holdt, D. Teupser, From genotype to phenotype in human atherosclerosis—recent findings, *Curr. Opin. Lipidol.* 24 (5) (2013) 410–418.
- [13] O. Harismendy, D. Notani, X. Song, N.G. Rahim, B. Tanasa, N. Heintzman, B. Ren, X.D. Fu, E.J. Topol, M.G. Rosenfeld, K.A. Frazer, 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response, *Nature* 470 (7333) (2011) 264–268.
- [14] A. Dutta, W. Henley, I.A. Lang, A. Murray, J. Guralnik, R.B. Wallace, D. Melzer, The coronary artery disease-associated 9p21 variant and later life 20-year survival to cohort extinction, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4 (5) (2011) 542–548.
- [15] A. Helgadottir, G. Thorleifsson, A. Manolescu, S. Gretarsdottir, T. Blondal, A. Jonasdottir, A. Sigurdsson, A. Baker, A. Palsson, G. Masson, D.F. Gudbjartsson, K.P. Magnusson, K. Andersen, A.I. Levey, V.M. Backman, S. Matthiasdottir, T. Jonsdottir, S. Palsson, H. Einarsson, S. Gunnarsdottir, A. Gylfason, V. Vaccarino, W.C. Hooper, M.P. Reilly, C.B. Granger, H. Austin, D.J. Rader, S.H. Shah, A.A. Quyyumi, J.R. Gulcher, G. Thorgeirsson, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, K. Stefansson, A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction, *Science* 316 (5830) (2007) 1491–1493.
- [16] R. McPherson, A. Pertsemlidis, N. Kavaslar, A. Stewart, R. Roberts, D.R. Cox, D.A. Hinds, L.A. Pennacchio, A. Tybjaerg-Hansen, A.R. Folsom, E. Boerwinkle, H.H. Hobbs, J.C. Cohen, A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease, *Science* 316 (5830) (2007) 1488–1491.
- [17] N.J. Samani, J. Erdmann, A.S. Hall, C. Hengstenberg, M. Mangino, B. Mayer, R.J. Dixon, T. Meitinger, P. Braund, H.E. Wichmann, J.H. Barrett, I.R. König, S.E. Stevens, S. Szymczak, D.A. Tregouet, M.M. Iles, F. Pahlke, H. Pollard, W. Lieb, F. Cambien, M. Fischer, W. Ouwehand, S. Blankenberg, A.J. Balmforth, A. Baessler, S.G. Ball, T.M. Strom, I. Braenne, C. Gieger, P. Deloukas, M.D. Tobin, A. Ziegler, J.R. Thompson, H. Schunkert, Genome-wide association analysis of coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 357 (5) (2007) 443–453.
- [18] Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls, *Nature* 447 (7145) (2007) 661–678.
- [19] J.G. Smith, O. Melander, H. Lovkvist, B. Hedblad, G. Engstrom, P. Nilsson, J. Carlson, G. Berglund, B. Norrving, A. Lindgren, Common genetic variants on chromosome 9p21 confers risk of ischemic stroke: a large-scale genetic association study, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2 (2) (2009) 159–164.
- [20] T. Foroud, D.L. Koller, D. Lai, L. Sauerbeck, C. Anderson, N. Ko, R. Deka, T.H. Mosley, M. Fornage, D. Woo, C.J. Moomaw, R. Hornung, J. Huston, I. Meissner, J.E. Bailey-Wilson, C. Langefeld, G. Rouleau, E.S. Connolly, B.B. Worrall, D. Kleindorfer, M.L. Flaherty, S. Martini, J. Mackey, F. De Los Rios La Rosa, R.B. Brown Jr., J.P. Broderick, Genome-wide association study of intracranial aneurysms confirms role of Anril and SOX17 in disease risk, *Stroke* 43 (11) (2012) 2846–2852.
- [21] Q. Zhang, X.F. Wang, S.S. Cheng, X.H. Wan, F.F. Cao, L. Li, X.D. Chen, W.J. Liu, X.C. Yang, L. Jin, Three SNPs on chromosome 9p21 confer increased risk of myocardial infarction in Chinese subjects, *Atherosclerosis* 207 (1) (2009) 26–28.
- [22] Y. Hiura, Y. Fukushima, M. Yuno, H. Sawamura, Y. Kokubo, T. Okamura, H. Tomoike, Y. Goto, H. Nonogi, R. Takahashi, N. Iwai, Validation of the association of genetic variants on chromosome 9p21 and 1q41 with myocardial infarction in a Japanese population, *Circ. J.* 72 (8) (2008) 1213–1217.
- [23] D. Saleheen, M. Alexander, A. Rasheed, D. Wormser, N. Soranzo, N. Hammond, A. Butterworth, M. Zaidi, P. Haycock, S. Bumpstead, S. Potter, H. Blackburn, E. Gray, E. Di Angelantonio, S. Kaptoge, N. Shah, M. Samuel, A. Janjua, N. Sheikh, S.R. Haider, M. Murtaza, U. Ahmad, A. Hakeem, M.A. Memon, N.H. Mallick, M. Azhar, A. Samad, S.Z. Rasheed, A.R. Gardezi, N.A. Memon, A. Ghaffar, F.U. Memon, K.S. Zaman, A. Kundi, Z. Yaqoob, L.A. Cheema, N. Qamar, A. Faruqui, R. Jooma, J.H. Niazi, M. Hussain, K. Kumar, A. Saleem, K. Kumar, M.S. Daood, F. Memon, A.A. Gul, S. Abbas, J. Zafar, F. Shahid, Z. Memon, S.M. Bhatti, W. Kayani, S.S. Ali, M. Fahim, M. Ishaq, P. Frossard, P. Deloukas, J. Danesh, Association of the 9p21.3 locus with risk of first-ever myocardial infarction in Pakistanis: case-control study in South Asia and updated meta-analysis of Europeans, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (7) (2010) 1467–1473.
- [24] W. Koch, S. Turk, A. Eri, P. Hoppmann, A. Pfeufer, L. King, A. Schomig, A. Kastrati, The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population, *Atherosclerosis* 217 (1) (2011) 220–226.
- [25] K.G. Abdullah, L. Li, G.Q. Shen, Y. Hu, Y. Yang, K.G. MacKinlay, E.J. Topol, Q.K. Wang, Four SNPs on chromosome 9p21 confer risk to premature, familial CAD and MI in an American Caucasian population (GeneQuest), *Ann. Hum. Genet.* 72 (Pt 5) (2008) 654–657.
- [26] L.M. Holdt, F. Beutner, M. Scholz, S. Gielen, G. Gabel, H. Bergert, G. Schuler, J. Thiery, D. Teupser, ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (3) (2010) 620–627.
- [27] L. Qi, J. Ma, Q. Qi, J. Hartiala, H. Allayee, H. Campos, Genetic risk score and risk of myocardial infarction in Hispanics, *Circulation* 123 (4) (2011) 374–380.
- [28] L. Mosca, E.J. Benjamin, K. Berra, J.L. Bezanson, R.J. Dolor, D.M. Lloyd-Jones, L.K. Newby, I.L. Pina, V.L. Roger, L.J. Shaw, D. Zhao, T.M. Beckie, C. Bushnell, J. D'Armentio, P.M. Kris-Etherton, J. Fang, T.G. Ganiats, A.S. Gomes, C.R. Gracia, C.K. Haan, E.A. Jackson, D.R. Judelson, E. Kelepouris, C.J. Lavie, A. Moore, N.A. Nussmeier, E. Ofili, S. Oparil, P. Ouyang, V.W. Pinn, K. Sherif, S.C. Smith Jr., G. Sopko, N. Chandra-Strobus, E.M. Urbina, V. Vaccarino, N.K. Wenger, Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update: a guideline from the American heart association, *Circulation* 123 (11) (2011) 1243–1262.
- [29] A. Melk, C. Schildhorn, M. Homme, M. Knoch, B.M. Schmidt, J. Serth, S. Scherer, B. Dohler, G. Opelz, Association of single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21.3 with cardiovascular death in kidney transplant recipients, *Transplantation* 95 (7) (2013) 928–932.
- [30] Arbiol-Roca A, Hueso M, Navarro E, Alía-Ramos P, González-Álvarez MT, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM, Lloberas N, Data on genotypic distribution and linkage disequilibrium of several ANRIL polymorphisms in hemodialysis patients, *Clin. Chim. Acta* "Submitted".
- [31] A. Helgadottir, G. Thorleifsson, A. Manolescu, S. Gretarsdottir, T. Blondal, A. Jonasdottir, A. Jonasdottir, A. Sigurdsson, A. Baker, A. Palsson, G. Masson, D.F. Gudbjartsson, K.P. Magnusson, K. Andersen, A.I. Levey, V.M. Backman, S. Matthiasdottir, T. Jonsdottir, S. Palsson, H. Einarsson, S. Gunnarsdottir, A. Gylfason, V. Vaccarino, W.C. Hooper, M.P. Reilly, C.B. Granger, H. Austin, D.J. Rader, S.H. Shah, A.A. Quyyumi, J.R. Gulcher, G. Thorgeirsson, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, K. Stefansson, A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction, *Science* 316 (5830) (2007) 1491–1493.
- [32] C. Wellcome Trust Case Control, Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls, *Nature* 447 (7145) (2007) 661–678.
- [33] H.M. Broadbent, J.F. Peden, S. Lorkowski, A. Goel, H. Ongen, F. Green, R. Clarke, R. Collins, M.G. Franzosi, G. Tognoni, U. Seedorf, S. Rust, P. Eriksson, A. Hamsten, M. Farrall, H. Watkins, P. Consortium, Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p, *Hum. Mol. Genet.* 17 (6) (2008) 806–814.
- [34] Y. Kotake, T. Nakagawa, K. Kitagawa, S. Suzuki, N. Liu, M. Kitagawa, Y. Xiong, Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15^{INK4B} tumor suppressor gene, *Oncogene* 30 (16) (2011) 1956–1962.
- [35] L. Folkersen, T. Kyriakou, A. Goel, J. Peden, A. Malarstig, G. Paulsson-Berne, A. Hamsten, W. Hugh, A. Franco-Cereceda, A. Gabrielsen, P. Eriksson, P. Consortium, Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants, *PLoS One* 4 (11) (2009), e7677.
- [36] L.M. Holdt, S. Hoffmann, K. Sass, D. Langenberger, M. Scholz, K. Krohn, K. Finstermeier, A. Stahringer, W. Wilfert, F. Beutner, S. Gielen, G. Schuler, G. Gabel, H. Bergert, I. Bechmann, P.F. Stadler, J. Thiery, D. Teupser, Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks, *PLoS Genet.* 9 (7) (2013), e1003588.
- [37] C.E. Burd, W.R. Jeck, Y. Liu, H.K. Sanoff, Z. Wang, N.E. Sharpless, Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk, *PLoS Genet.* 6 (12) (2010), e1001233.

- [38] S.A. Hannou, K. Wouters, R. Paumelle, B. Staels, Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (4) (2015) 176–184.
- [39] S. Kathiresan, B.F. Voight, S. Purcell, K. Musunuru, D. Ardissino, P.M. Mannucci, S. Anand, J.C. Engert, N.J. Samani, H. Schunkert, J. Erdmann, M.P. Reilly, D.J. Rader, T. Morgan, J.A. Spertus, M. Stoll, D. Girelli, P.P. McKeown, C.C. Patterson, D.S. Siscovick, C.J. O'Donnell, R. Elosua, L. Peltonen, V. Salomaa, S.M. Schwartz, O. Melander, D. Altshuler, P.A. Merlini, C. Berzuini, L. Bernardinelli, F. Peyvandi, M. Tubaro, P. Celli, M. Ferrario, R. Fève, N. Marziliano, G. Casari, M. Galli, F. Ribichini, M. Rossi, F. Bernardi, P. Zonin, A. Piazza, J. Yee, Y. Friedlander, J. Marrugat, G. Lucas, I. Subirana, J. Sala, R. Ramos, J.B. Meigs, G. Williams, D.M. Nathan, C.A. MacRae, A.S. Havulinna, G. Berglund, J.N. Hirschhorn, R. Asselta, S. Duga, M. Spreafico, M.J. Daly, J. Nemes, J.M. Korn, S.A. McCarroll, A. Surti, C. Guiducci, L. Gianniny, D. Mirel, M. Parkin, N. Burt, S.B. Gabriel, J.R. Thompson, P.S. Braund, B.J. Wright, A.J. Balmforth, S.G. Ball, A. Hall, P. Linsel-Nitschke, W. Lieb, A. Ziegler, I. König, C. Hengstenberg, M. Fischer, K. Stark, A. Grosshennig, M. Preuss, H.E. Wichmann, S. Schreiber, W. Ouwehand, P. Deloukas, M. Scholz, F. Cambien, M. Li, Z. Chen, R. Wilensky, W. Matthai, A. Qasim, H.H. Hakonarson, J. Devaney, M.S. Burnett, A.D. Pichard, K.M. Kent, L. Satler, J.M. Lindsay, R. Waksman, C.W. Knouff, D.M. Waterworth, M.C. Walker, V. Mooser, S.E. Epstein, T. Scheffold, K. Berger, A. Hage, N. Martinelli, O. Olivieri, R. Corrocher, P. McKeown, E. Erdmann, I.R. König, H. Holm, G. Thorleifsson, U. Thorsteinsdottir, K. Stefansson, R. Do, C. Xie, D. Siscovick, Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants, *Nat. Genet.* 41 (3) (2009) 334–341.
- [40] G.Q. Shen, S. Rao, N. Martinelli, L. Li, O. Olivieri, R. Corrocher, K.G. Abdullah, S.L. Hazen, J. Smith, J. Barnard, E.F. Plow, D. Girelli, Q.K. Wang, Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population, *J. Hum. Genet.* 53 (2) (2008) 144–150.
- [41] T.L. Assimes, J.W. Knowles, A. Basu, C. Iribarren, A. Southwick, H. Tang, D. Absher, J. Li, J.M. Fair, G.D. Rubin, S. Sidney, S.P. Fortmann, A.S. Go, M.A. Hlatky, R.M. Myers, N. Risch, T. Quertermous, Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study, *Hum. Mol. Genet.* 17 (15) (2008) 2320–2328.
- [42] R. Do, C. Xie, X. Zhang, S. Mannisto, K. Harald, S. Islam, S.D. Bailey, S. Rangarajan, M.J. McQueen, R. Diaz, L. Lisheng, X. Wang, K. Silander, L. Peltonen, S. Yusuf, V. Salomaa, J.C. Engert, S.S. Anand, The effect of chromosome 9p21 variants on cardiovascular disease may be modified by dietary intake: evidence from a case/control and a prospective study, *PLoS Med.* 8 (10) (2011), e1001106.
- [43] KDOQI, Clinical practice guideline for hemodialysis adequacy: 2015 update, *Am. J. Kidney Dis.* 66 (5) (2015) 884–930.
- [44] R.M. Montero, A. Covic, L. Gnudi, D. Goldsmith, Diabetic nephropathy: what does the future hold? *Int. Urol. Nephrol.* 48 (1) (2016) 99–113.
- [45] The National Heart, Lung, and Blood Institute; The Juvenile Diabetes Foundation International; The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; and The American Heart Association (Ed.), Diabetes mellitus: a major risk factor for cardiovascular disease, *Circulation* 100 (10) (1999) 1132–1133 A joint editorial statement by the American Diabetes Association.
- [46] O. Jarinova, A.F. Stewart, R. Roberts, G. Wells, P. Lau, T. Naing, C. Buerki, B.W. McLean, R.C. Cook, J.S. Parker, R. McPherson, Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (10) (2009) 1671–1677.
- [47] F. Aguilo, M.M. Zhou, M.J. Walsh, Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression, *Cancer Res.* 71 (16) (2011) 5365–5369.



Corrigendum

Corrigendum to ‘Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients’ [Clinica Chimica Acta (2017) 61–67]



A. Arbiol-Roca^{a,d}, A. Padró-Miquel^a, M. Hueso^b, E. Navarro^c, P. Alía-Ramos^a,
M.T. González-Álvarez^b, I. Rama^b, J. Torras^b, J.M. Grinyó^b, J.M. Cruzado^b, N. Lloberas^{b,*}

^a Biochemistry Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^b Nephrology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^c Molecular Oncology Laboratory, Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain

^d PhD student at Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

The authors regret that the acknowledgements were incomplete in the original article. Full acknowledgements details are given below: Nuria Lloberas is a researcher from ISCIII Miguel Servet (CP06/00067) and REDinREN RD12/0021/003. Ariadna Arbiol-Roca enjoys a post residence grant from Fundació José Luis Castaño. The present work was performed as part of the Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine doctoral program of Ariadna Arbiol-Roca at Universitat

Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III and Ministerio de Sanidad y Consumo (PI12/01564 and PI15/00871), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) cofounded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF) a way to Build Europe.

The authors would like to apologise for any inconvenience caused.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.029>

* Corresponding author at: Nephrology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Lab Exp Nephrology 4122, Pab. Govern, 4a planta, UB, Feixa Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

E-mail address: nlloberas@ub.edu (N. Lloberas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.05.024>

Available online 24 May 2017

0009-8981/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



CAPÍTOL 2

Arbiol-Roca A, Padró-Miquel A, Vidal-Alabró A, Hueso M, Fontova P, Bestard O, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Alía-Ramos P, Cruzado JM, Lloberas N.



ANRIL as a genetic marker for ischemic stroke in renal transplant patients.

Transpl Int. 2018 [Epub ahead of print]



ORIGINAL ARTICLE

***ANRIL* as a genetic marker for cardiovascular events in renal transplant patients – an observational follow-up cohort study**

Ariadna Arbiol-Roca^{1,2}, Ariadna Padró-Miquel¹, Anna Vidal-Alabró³, Miquel Hueso³, Pere Fontova³, Oriol Bestard³ , Ines Rama³, Joan Torras³, Josep M. Grinyó³, Pedro Alía-Ramos¹, Josep Maria Cruzado³ & Nuria Lloberas³ 

1 Biochemistry Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain
 2 PhD student at Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain
 3 Nephrology and Transplantation group (2017 SGR189), Institut d'Investigació Biomèdica (IDIBELL), Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

Correspondence

Nuria Lloberas Pharm, PhD, Nephrology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Lab Exp Nephrology 4122, Pab. Govern, 4a planta, UB, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain.
 Tel./fax: +34-93-4035806;
 e-mail: nlloberas@ub.edu

SUMMARY

Cardiovascular disease is the leading cause of morbidity and mortality in kidney transplant recipients. Several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *ANRIL* gene pathway have been associated with cardiovascular events (CE). The main objective was to ascertain whether *ANRIL* (rs10757278) and *CARD8* (rs2043211) SNPs could mediate susceptibility to CE. This was an observational follow-up cohort study of renal transplant recipients at Bellvitge University Hospital (Barcelona) from 2000 to 2014. A total of 505 recipients were followed up until achievement of a CE. Patients who did not achieve the endpoint were followed up until graft loss, lost to follow-up or death. Survival analysis was used to ascertain association between genetic markers, clinical data, and outcome. Fifty-three patients suffered a CE after renal transplantation. Results showed a significant association between *ANRIL* SNP and CE. Homozygous GG for the risk allele showed higher risk for CE than A carriers for the protective allele [HR = 2.93(1.69–5.11), $P < 0.0001$]. This effect was maintained when it was analyzed in combination with *CARD8*, suggesting that *CARD8* SNP could play a role in the *ANRIL* mechanism. However, our study does not clarify the molecular mechanism for the *CARD8* SNP regulation by *ANRIL*. *ANRIL* SNP may predispose to the development of CE after successful kidney transplantation.

Transplant International 2018;

Key words

ANRIL gene, cardiovascular event, chronic kidney disease, renal transplant recipients, single-nucleotide polymorphism

Received: 31 October 2017; Revision requested: 18 December 2017; Accepted: 20 April 2018

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of morbidity and mortality in kidney transplant recipients [1]. Approximately, 40% of patients have a cardiovascular event 3 years after transplantation [2]. Conventional

risk factors for CVD, such as hypertension, diabetes mellitus, hyperlipidemia, obesity, and tobacco use, continue to be important in renal transplant recipients [3]. However, currently, it is accepted that the morbidity and mortality from CVD are not entirely considered by these conventional risk factors [3,4]. Time on dialysis,

uremia, serum creatinine, anemia, alterations in the calcium and phosphate metabolism or even immunosuppression, especially calcineurin inhibitors, exacerbate the probability of developing diabetes, graft dysfunction, dyslipidemia, and hypertension, all of which increase cardiovascular morbidity [5–7].

Worldwide, stroke is one of the main causes of morbidity and mortality of cardiovascular disease [8], and it is caused by both genetic and environmental factors. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at the 9p21 locus in chromosome 9 were found to be associated with both coronary artery diseases and ischemic stroke by genome-wide association studies (GWAS) [9,10]. The 9p21 locus contains a long noncoding RNA (LncRNAs), called *ANRIL* (Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus), which is believed to participate in gene regulation [11,12]. *ANRIL* SNPs have been associated with cardiovascular and all-cause mortality [13] and CVD morbidity in the general population. Different studies have described their participation in several pathologies such as myocardial infarction [14], coronary heart disease [15–17], ischemic stroke [18], or intracranial aneurysm susceptibility [19]. However, the information regarding chronic kidney disease (CKD) patients is limited. Until now, few studies have reported the role of *ANRIL* SNPs in CKD. Our previous work described, for the first time, a strong correlation between four *ANRIL* SNPs and major adverse cardiovascular events (MACE) in hemodialysis population [20]. Furthermore, the most representative polymorphism of the four *ANRIL* SNPs studied (rs10757278, rs4977574, rs10757274, and rs6475606) with the outcome analyzed in our population was *ANRIL* SNP rs10757278, corroborating the data described by Helgadottir *et al.* [14]. In the renal transplant field, only one study has confirmed the association of *ANRIL* SNPs with cardiovascular death [21].

Mechanisms by which *ANRIL* regulates downstream genes such as *CARD8* (caspase activation and recruitment domain 8) are not yet fully understood. However, it has been suggested that *ANRIL* SNP rs10757278 disrupts a binding site for the inhibitory transcriptional factor STAT1 [22]. The STAT1 signaling pathway mediates an inflammatory response through the stimulation of interferon gamma, and therefore, it has been suggested that *ANRIL* may play a role in inflammatory responses and atherosclerosis [23].

CARD8 encodes a component of innate immunity involved in the suppression of nuclear factor κB (NF-κB). This leads to the suppression of an immune response and inflammatory activity processes which

otherwise occur through the NLRP3 inflammasome relationship [24]. The SNP rs2043211 of *CARD8* changes cysteine to a premature termination codon, thus yielding a truncated protein, which influences the protein function [25,26]. Previous investigations have studied the relationship of the *CARD8* SNP with different inflammatory diseases including cardiovascular disease: myocardial infarction [27], coronary atherosclerosis [27,28] and also with ischemic stroke [23]. However, conclusions are confusing and renal transplant recipients have never been studied in this context.

In the present study, we hypothesize that *ANRIL* SNP rs10757278 and *CARD8* SNP rs2043211 could mediate susceptibility to cardiovascular events in renal transplant recipients.

Materials and methods

Patient population and study design

This is an observational follow-up cohort study focused on the incidence of cardiovascular events and its correlation with genetic markers in renal transplant recipients.

The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 2000 Helsinki Declaration and was approved by the Research Ethics Committee. All included patients gave written informed consent to take part in the study (PR 155/15). Furthermore, this study was conducted according to the “Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology” guidelines.

A total of 1466 patients had kidney transplantation from January 2000 to December 2014 at Bellvitge University Hospital (Barcelona). Exclusion criteria for this study included loss of functioning graft before 3 months posttransplantation, multi-organ transplantation, or re-transplantation. Patients eligible but not recruited were those whose DNA was not available or with and incomplete clinical database. Furthermore, some patients were not assessed for eligibility because they missed invitation to participate or they declined to be invited. Finally, the study population consisted of 505 renal recipients. Patient data were retrospectively collected from patients’ charts, and there were no missing data. All patients were treated with conventional immunosuppressive drug regimen consisting of oral tacrolimus, cyclosporine, or sirolimus in combination with mycophenolate mofetil. Induction therapy varied depending on the perceived immunological risk and

was also used for kidneys coming from extended criteria donors. Induction therapy, basiliximab, or daclizumab were used in the case of increased immunological risk. In addition, all patients received intra-operative glucocorticoids according to local protocol.

Definition of clinical variables

Demographic characteristics (age, gender, ethnicity, and body mass) of the patients were recorded the day of the renal transplant. The cause of end-stage renal disease (ESRD), dialysis status (predialysis, hemodialysis, or peritoneal dialysis), time on dialysis, hypertension, diabetes mellitus, smoking, pre-existence of cardiovascular disease, date of renal transplant, type of transplant (death donor or living donor), number of HLA-AB and HLA-DR mismatches, donor age and sex, cold ischemia time, and immunosuppressive treatment were also evaluated the day of the renal transplant.

Clinical outcome variables assessed as acute tubular necrosis, clinical acute rejection episodes, *de novo* diabetes mellitus, and graft loss were recorded after transplantation. Graft loss was defined as return to dialysis or re-transplantation. Furthermore, estimated glomerular filtration rate (eGFR) and cholesterol were recorded 3 months postrenal transplantation. eGFR was calculated using the CKD-EPI formula (Chronic Kidney Disease Epidemiology). Finally, proteinuria data (g/l) were collected a year after renal transplantation.

The endpoint of the study was defined as an occurrence of a cardiovascular event. For a deeper analysis, cardiovascular events were classified into two sub-types: ischemic stroke and myocardial event (comprising both myocardial infarction and unstable angina). A sub-study analyzing mortality as an endpoint was also developed. Mortality was classified as cardiovascular mortality and overall mortality.

All patients were followed up until the endpoint was achieved. The follow-up was stopped in case of graft loss, lost to follow-up, death, or the end of data collection, which was January 31, 2017.

SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood of patients using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Sydney, Australia) and was stored at -80°C .

Genotyping of the *ANRIL* SNP rs10757278 and *CARD8* SNP rs2043211 was carried out using TaqMan SNP Genotyping Assay (assays ID: C_11841860_10 and

C_11708080_1, respectively; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 384-well plates that included positive and negative controls. Real-time PCRs were carried out on the 7900HT Fast Real-time PCR System, Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following standard recommendations. Briefly, 0.5 μl assay mix was mixed with 5 μl iTaq Universal Probes Supermix (part no. 172-5130), 1 μl genomic DNA (10–20 ng/ μl), and 3.5 μl water (B. Braun, Barcelona, Spain). The resulting mixture was heated to 50°C for 2 min and 95°C for 10 min in the thermal cycler. This was then followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extending at 60°C for 1 min. Samples were genotyped in CCI^T (Centres Científics i Tecnològics) at University of Barcelona, Campus Bellvitge.

Statistical analysis

Descriptive analyses were performed to summarize the baseline data and the demographic characteristics for both transplant renal patients with and without a cardiovascular event.

Allele frequency distribution was tested for Hardy–Weinberg equilibrium. Linkage study between both SNPs (*ANRIL* rs10757278 and *CARD8* rs2043211) was performed using the Chi-square test.

Survival analyses consisted in a comparison by log-rank test of Kaplan–Meier survival curves stratified by genotypes. In addition, Cox's proportional hazard models were employed to analyze the relationship between SNPs and the time elapsed until each endpoint took place.

The covariance matrix estimates (VCE) were used to test for collinearity ($r > 0.4$). Finally, noncollinear covariates were kept to perform a backward stepwise analysis to build the final multivariate model.

On the other hand, the synergy of both SNPs was studied stratifying patients in three groups: carriers for the four risk alleles (GG *ANRIL* and AA *CARD8*), remaining carriers for both SNPs, and finally, all the other genotypes. Statistical calculations were performed with STATA 12.0 software. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Characteristics of the study population

A total of 505 adult renal transplant recipients from a deceased or a living kidney donor (mean age 51.9 ± 13.9 years) were included in the present study.

Characteristics of the population stratified by cardiovascular event are displayed in Table 1. Warm ischemia time was under 45 min in all cases. The majority of renal transplant patients (87%) had panel reactive antibodies (PRA) lower than 10%.

All patients were treated with conventional immunosuppressive drug regimen consisting of a calcineurin inhibitor (CNI) [tacrolimus (71%) or cyclosporine (17%)] or mTOR inhibitor [sirolimus (11%) or everolimus (5%)] in combination with mycophenolate mofetil (92%). Additional antibody induction therapy was used in 92% of the patients, which consisted of anti-thymocyte globulin (ATG) (34%), basiliximab (51%), or daclizumab (7%).

At the moment of the renal transplantation, 86 patients were diabetic and the diabetic nephropathy was the main cause of end-stage renal disease in 78% of these patients. At the end of the study, 61 new patients developed diabetes mellitus (15%).

Genotyping results

Allelic frequencies of the SNPs investigated in the 505 recipients are shown in Table 2. Frequencies observed in the present study were in accordance with reported allele frequencies in a Caucasian population. All patients were of Caucasian ethnicity.

All investigated variants were highly prevalent. The frequencies of the AA, AG, and GG *ANRIL* genotypes were 22.6%, 50.7%, and 26.7%, respectively. The AA, AT, and TT *CARD8* genotypes were observed in 43.3%, 45.5%, and 11.2% of patients, respectively. When combining both *ANRIL* and *CARD8* allelic statuses, the frequency of the GG *ANRIL* plus AA *CARD8* was 11.5%.

The genotyping data for *ANRIL* SNP rs10757278 and for *CARD8* SNP rs2043211 did not deviate from the Hardy–Weinberg equilibrium in our population (Table 2). A pairwise comparison using the exact test disequilibrium analysis yielded no indication of allelic dependence ($P = 0.59$) between our two SNPs in study.

ANRIL and *CARD8* SNPs and cardiovascular events

The follow-up period ranged from 3 months to 15.8 years, and the mean follow-up was 5.7 years. Throughout this period, 53 patients (10%) suffered a cardiovascular event (20 patients had an ischemic stroke and 33 patients had a myocardial event). The remaining patients ($n = 452$) were censored: 101 grafts were lost (44 returned to dialysis and 57 died with a functioning graft), seven patients dropped out, and 344 patients were cardiovascular event-free at the end of data

collection. The first cardiovascular event occurred at an average period of 4.5 years after renal transplant.

Kaplan–Meier survival curve for *ANRIL* polymorphism rs10757278 showed statistical significance in the log-rank test comparing carriers of the protective allele (AA or AG) versus homozygotes for the risk allele (GG) (Fig. 1). Patients with the GG genotype showed a significantly higher risk of cardiovascular events than AA or AG ($P = 0.0003$). Additionally, we carried out a stratified analysis by type of cardiovascular event: ischemic stroke or myocardial event (myocardial infarction and unstable angina) (Figs 2 and 3). We observed that even though GG patients were significantly associated with both types of cardiovascular events, ischemic stroke ($P = 0.0008$) showed a stronger association with the *ANRIL* polymorphism rs10757278.

Relationship between cardiovascular events and *ANRIL* polymorphism was evaluated by univariate Cox regression analysis [HR = 2.65 (1.54–4.58), $P < 0.001$]. We found collinearity between eGFR CKD-EPI and gender ($r = -0.7458$), and between renal recipient age and donor age at renal transplantation ($r = -0.6493$). eGFR CKD-EPI and renal recipient age were introduced in the multivariate model, together with the noncollinear covariates, according to its stronger association with cardiovascular events.

After adjustment for covariates, the *ANRIL* polymorphism showed a significant relationship with cardiovascular events [HR = 2.93 (1.69–5.11), $P_{\text{adj}} < 0.0001$] (Table 3). Patients homozygous for the risk allele (GG) showed a 2.93-fold higher risk of suffering a cardiovascular event than patients carrying the protective allele (AA or AG genotype).

When cardiovascular events were studied separately (ischemic stroke and myocardial event), univariate Cox also showed a stronger association between *ANRIL* SNP and ischemic stroke [HR = 4.09 (1.67–9.99), $P = 0.002$] than with a myocardial event [HR = 2.02 (0.99–4.10), $P = 0.053$]. After adjustment for the covariates in the multivariate Cox analysis (Table 3), ischemic stroke [HR = 4.43 (1.81–10.85), $P_{\text{adj}} = 0.001$] and myocardial events [HR = 2.27 (1.10–4.67), $P_{\text{adj}} = 0.026$] remained significant.

Regarding *CARD8* polymorphism, no association was observed between *CARD8* SNP rs2043211 and cardiovascular events either in Kaplan–Meier curves (P log-rank test = 0.324) or in Cox univariate survival analysis [HR = 1.32 (0.76–2.30), $P = 0.326$].

To study the synergistic effect of *ANRIL* and *CARD8* polymorphisms, risk alleles were combined. Patients carrying the four risk alleles—*ANRIL* (GG)/*CARD8* (AA)—have

Table 1. Demographic and clinical data of all patients, cardiovascular event and cardiovascular event-free transplant recipients.

	All patients <i>n</i> = 505	Cardiovascular event-free <i>n</i> = 452	Cardiovascular event <i>n</i> = 53	<i>P</i> value
Cause of ESRD (%)				
Diabetes	13	12	25	0.150
Glomerular	27	27	26	
Interstitial	12	13	8	
Polycystic kidney disease	13	13	8	
Vascular	9	9	8	
Other	26	26	26	
Recipient sex (male) (%)	66.1	65.7	69.8	0.55
Recipient age (years)	51.9 ± 13.9	51.1 ± 13.9	57.9 ± 12.2	0.0008
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 4.3	25.5 ± 4.1	26.7 ± 5.1	0.0536
Hypertension (%)	79.7	80.1	76.1	0.526
Smoke (%)				
Non	52	53	48	0.275
Yes	19	18	29	
Ex-smoker	29	30	23	
Diabetes mellitus pre-RT (%)	17.0	14.4	39.6	<0.0001
Dialysis time (years)	2.6 ± 3.0	2.5 ± 2.7	3.1 ± 4.4	0.2422
Dialysis status (%)				
Hemodialysis	81	79	94	0.240
Peritoneal	12	13	6	
Predialysis	7	8	0	
Cardiovascular disease pre-RT (%)	10.7	8.4	30.2	<0.0001
Donor sex (male) (%)	60.1	59.2	67.9	0.22
Donor age (years)	51.7 ± 16.5	51.8 ± 16.2	50.6 ± 18.7	0.5988
DD/LD	458/47	405/47	51/2	0.067
HLA-AB mismatches 0/1/2/3/4	20/27/161/206/91	16/24/146/185/81	4/3/15/21/10	0.5501
HLA-DR mismatches 0/1/2	107/325/73	97/290/65	10/35/8	0.6854
Cold ischemia time (min)	16.7 ± 7.8	16.5 ± 8.0	18.1 ± 5.1	0.1513
Acute tubular necrosis (%)	26.8	27.7	19.2	0.193
Clinical acute rejection (%)	17.7	17.5	19.6	0.73
eGFR CKD-EPI 3 months (ml/min/1.73 m ²)	48.5 ± 21.6	49.0 ± 22.0	44.3 ± 16.9	0.1318
Proteinuria one year (g/l)	0.45 ± 1.55	0.46 ± 1.62	0.42 ± 0.53	0.8921
Cholesterol 3 months (mmol/l)	4.35 ± 1.07	4.35 ± 1.09	4.30 ± 0.83	0.7636
Diabetes mellitus (%)	29.1	27.4	43.4	0.016

DD, deceased donor; ESRD, end-stage renal disease; LD, living donor; RT, renal transplant.

Continuous variables were expressed as mean ± SD (standard deviation). Categorical variables were expressed as percentages to the entire study patients. *P* values in bold were statistically significant in the Student *t* test or Chi-square test that compared cardiovascular event versus cardiovascular event-free cohort.

a 2.30-fold higher risk of suffering a cardiovascular event than patients carrying any other genotype combinations [HR = 2.30 (1.20–4.41), *P* = 0.012] as is shown in Fig. 4.

The stratified analysis showed a significant relationship only between *ANRIL/CARD8* SNPs and ischemic stroke [HR = 3.04 (1.17–7.91), *P* = 0.023]. Myocardial events did not achieve significance [HR = 1.85 (0.75–4.55), *P* = 0.180].

Moreover, the presence of the protective *CARD8* SNP rs2043211 T allele in the *ANRIL* SNP rs10757278 risk group (GG) seemed to counteract the effect of *ANRIL*

SNP rs10757278 itself [HR = 2.06 (0.99–4.29), *P* = 0.052]. On the contrary, when the protective T allele of *CARD8* SNP rs2043211 was not present, the risk genotype GG of *ANRIL* maintained its statistical significance [HR = 2.67 (1.35–5.27), *P* = 0.005] reinforcing the protective role of *CARD8* T allele.

ANRIL and *CARD8* SNPs and exitus

The follow-up period ranged from 3 months to 15.8 years, and the mean follow-up was 6.0 years.

Table 2. Genotype distributions of the polymorphisms (%) and *P* Hardy–Weinberg disequilibrium test.

	AA	AG	GG
ANRIL rs10757278 A/G			
All patients (<i>n</i> = 505)*	22.6	50.7	26.7
Cardiovascular event-free (<i>n</i> = 452)	22.8	52.9	24.3
Cardiovascular event (<i>n</i> = 53)	20.7	32.1	47.2
	AA	AT	TT
CARD8 rs2043211 A/T			
All patients (<i>n</i> = 505)**	43.3	45.5	11.2
Cardiovascular event-free (<i>n</i> = 452)	42.7	46.2	11.1
Cardiovascular event (<i>n</i> = 53)	49.1	39.6	11.3

P value for Fisher’s exact test (Hardy–Weinberg disequilibrium test): **P* = 0.94 and ***P* = 0.95.

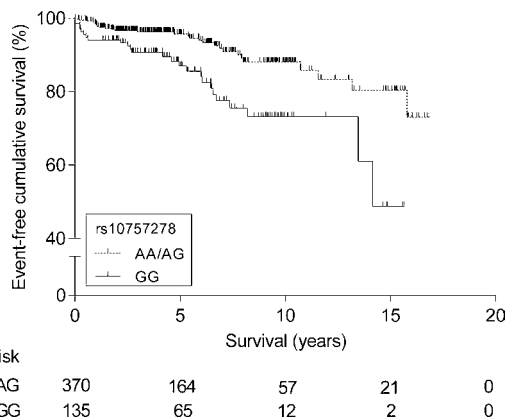


Figure 1 Kaplan–Meier survival curve for cardiovascular events for the *ANRIL* SNP rs10757278 AA/AG versus GG. Log-rank test, *P* = 0.0003.

Throughout this period, 82 deaths (16%) were recorded, of which only 21 (4%) took place as a consequence of cardiovascular disease. During the follow-up, seven patients dropped out and 416 patients finished the data collection.

In univariate Cox analysis, no significant association was found between *ANRIL* SNP rs10757278 and all-cause mortality (*P* = 0.139) nor with cardiovascular exitus (*P* = 0.761). Furthermore, no association was observed between the *CARD8* SNP rs2043211 and all-cause mortality (*P* = 0.155) nor cardiovascular exitus (*P* = 0.286).

Discussion

ANRIL SNP has been related with a higher risk of developing cardiovascular events. This study explores its

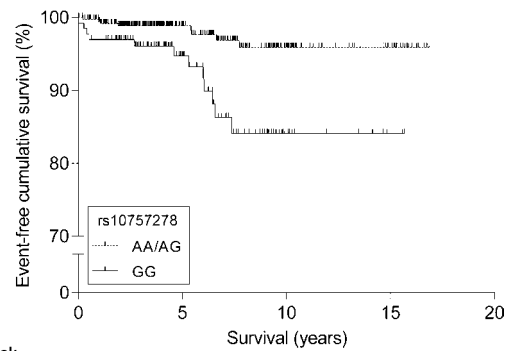


Figure 2 Kaplan–Meier survival curve for ischemic stroke for the *ANRIL* SNP rs10757278 AA/AG versus GG. Log-rank test, *P* = 0.0008.

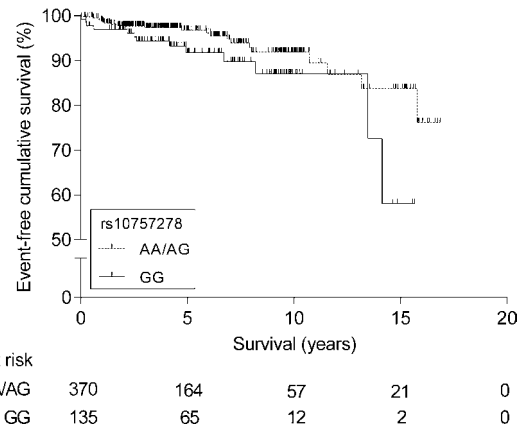


Figure 3 Kaplan–Meier survival curve for myocardial event for the *ANRIL* SNP rs10757278 AA/AG versus GG. Log-rank test, *P* = 0.048.

role in renal transplant patients. It analyzes the post-transplant incidence of cardiovascular events in a cohort of 505 renal transplant recipients, and it assesses the relationship between *ANRIL* and *CARD8* polymorphisms and the occurrence of a cardiovascular event. The incidence of cardiovascular events after renal transplant was 10% in our population. These results are in accordance with those of a previously published report by the US Renal Data System, where nearly 11–12% of a long cohort of patients had a cardiovascular event 3 years after transplantation [2]. Considering the fact that CVD is one of the major causes of death and disability in renal transplant patients, the identification of risk factors for CVD is crucial to prevent graft failure [4].

The comparison between Kaplan–Meier survival curves according to the genotype of the *ANRIL* SNP rs10757278 showed that a genetic variation in the

Table 3. Multivariate Cox survival analysis of cardiovascular event, ischemic stroke and myocardial event in transplant recipients.

	HR (95% CI)	P value
Cardiovascular event		
ANRIL rs10757278 (GG)	2.93 (1.69–5.11)	<0.0001
Recipient age (years)	1.06 (1.03–1.09)	<0.0001
BMI (kg/m ²)	1.05 (0.99–1.13)	0.122
Ischemic stroke		
ANRIL rs10757278 (GG)	4.43 (1.81–10.85)	0.001
Recipient age (years)	1.07 (1.02–1.11)	0.002
Myocardial event		
ANRIL rs10757278 (GG)	2.27 (1.10–4.67)	0.026
Recipient age (years)	1.06 (1.02–1.09)	0.001
BMI (kg/m ²)	1.06 (0.97–1.15)	0.217

BMI, body mass index; CI, confidence interval; HR, hazard ratio.

ANRIL SNP was introduced in the model as homozygous for the non-protective allele (GG) compared with carriers for the protective allele. *P* values in bold were statistically significant.

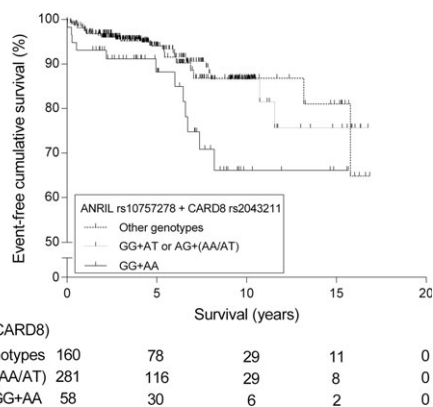


Figure 4 Kaplan–Meier survival curve for cardiovascular events for the synergy between *ANRIL* SNP rs10757278 and *CARD8* SNP rs2043211. Homozygous for both alleles (GG + AA), remaining carriers for the *ANRIL* SNP in combination with carriers for *CARD8* SNP (GG + AT, AG + AA/AT), and all other genotypes (GG+TT, AG + TT, AA + AA/AT/TT). Log-rank test, *P* = 0.0360.

ANRIL gene was associated with cardiovascular events in the whole cohort as well as in the general population [14–16]. Specifically, the variant GG allele in *ANRIL* polymorphism correlated with a high risk for a cardiovascular event to occur in renal transplant recipients. Among cardiovascular events, ischemic strokes showed the strongest association with *ANRIL* SNP rs10757278 in comparison with myocardial events. These results are supported by the univariate model for Cox regression where homozygous patients GG for *ANRIL* SNP

rs10757278 showed a higher risk of a cardiovascular event occurring than AA or AG patients, confirming the findings of studies focusing on the general population [14–16,29–35]. Moreover, the hazard ratio was higher (HR = 4.09) when only ischemic stroke was considered compared with both multiple event types (HR = 2.65).

There are several studies showing that *ANRIL* is associated with increased risk of coronary atherosclerosis, carotid arteriosclerosis, peripheral artery disease, and other vascular diseases [36–39]. *ANRIL* is expressed in cells that play a critical role in atherogenesis, and although the molecular mechanism is not well established, it has been described that platelet reactivity and bone marrow megakaryopoiesis can be increased. Platelet production and activation may predispose to arterial thrombosis, suggesting an explanation, for the association of *ANRIL* SNP and cardiovascular events [40]. However, as a long noncoding RNA, *ANRIL* may play its role in atherosclerotic processes by influencing the expression of other genes such as *CARD8* [23]. It seems that the risk allele of *ANRIL* SNP rs10757278 disrupts a binding site for transcription factor STAT1 [22] mediating inflammatory responses.

Several epidemiological studies have identified factors associated with an increase of cardiovascular disease after kidney transplantation [41–43]. These studies suggest that the cardiovascular risk factors for the general population (e.g., old age, prior cardiovascular disease, diabetes, smoking, blood pressure, BMI, and glomerular filtration rates estimated with the CKD-EPI) are predictive of events in the transplant population. Moreover, it is shown that the episodes of acute rejection during the first year after transplantation are associated with a major risk [41,42]. Particularly, diabetes mellitus has been recognized as a major risk factor for atherosclerosis with a complex pathogenesis involving multiple biological processes. Moreover, immunosuppressant treatments, especially tacrolimus and steroids, have been associated with an increased risk of posttransplantation diabetes mellitus [44,45]. At the end of our study, 15% of recipients developed *de novo* diabetes mellitus. New-onset diabetes mellitus after transplantation occurs primarily in the first 3–6 months posttransplant and increases the risk of cardiovascular events, graft rejection and lessens the probability of patient survival [46,47].

In the current study, these risk factors were analyzed as covariates associated with cardiovascular events in the multivariate Cox analysis to minimize bias. We found association between the *ANRIL* SNP rs10757278 and cardiovascular events, mainly due to ischemic

stroke rather than myocardial infarction. In this sense, our results concluded that homozygous GG patients showed a 4.43-fold higher risk of an ischemic stroke event than patients carrying the protective A allele. These results are in agreement with those reported in the literature where the role of *ANRIL* SNP in ischemic stroke is well described. Recent meta-analysis [48,49] demonstrated that the rs10757278 SNP in *ANRIL* gene was a risk factor for developing ischemic stroke, particularly large-vessel strokes but not small-vessel or cardioembolic strokes. Our findings and previously reported studies suggest that *ANRIL* variants may exert more general effects on arterial wall function, such as vascular remodeling and/or repair, which is common in coronary heart disease and large-vessel stroke. However, there are other studies that did not find any correlation between *ANRIL* SNP and ischemic stroke [50,51]. The current study is the first that has found an association between ischemic stroke and cardiovascular events with *ANRIL* SNP rs10757278 in renal transplant recipients.

Furthermore, *ANRIL* regulates the expression of multiple genes, including *CARD8* [23]. Bai *et al.* showed that knockdown of *ANRIL* expression decreased *CARD8* expression and, on the contrary, overexpression of *ANRIL* increased *CARD8* expression. Moreover, *CARD8* is the only *ANRIL* downstream gene which has been proven to increase in expression in atherosclerotic lesions from carotid artery plaque tissue in renal transplant donors with ischemic cerebrovascular events [27]. Thus, we aimed to identify the influence of *CARD8* SNP rs2043211 on *ANRIL* SNP rs10757278 and also assess the association between *CARD8* SNP rs2043211 and cardiovascular events, ischemic stroke, and myocardial events in our population.

CARD8 negatively regulates nuclear factor KB activation, caspase 1-dependent interleukin-1beta secretion, and apoptosis, finally reducing the inflammatory response [52]. The *CARD8* SNP rs2043211 results in an A to T transversion that changes codon 10 into a stop codon in *CARD8* mRNA (Cys10Stop). Previous studies showed that homozygotes for the stop codon T allele could reduce the expression of *CARD8* and could impair the nuclear factor KB-inhibiting property of *CARD8* [53]. Paramel *et al.* [27] also showed that the minor allele was associated with lower expression of *CARD8* in the plaques, suggesting that low levels of functional *CARD8* protein may promote inflammation. On the contrary, carriers of the minor T allele of the *CARD8* SNP rs2043211 also displayed lower circulating C-reactive protein and lower levels of the pro-atherosclerotic chemokine MCP-1 [27]. Despite the fact that

there are contradictory results regarding the risk allele [28] for the *CARD8* SNP rs2043211, our results are in concordance with other authors [23,27] reporting the T allele as the risk allele.

Regarding *CARD8* SNP, we did not find any association between the *CARD8* SNP rs2043211 and cardiovascular events, ischemic stroke, or myocardial events. These findings are not in concordance with Bai *et al.* [23] who demonstrate an association between the *CARD8* SNP rs2043211 and ischemic stroke in two independent Chinese Han populations. However, they did not find significant association with cardiovascular artery disease, in concordance with our results. On the other hand, Paramel *et al.* [27] did not find any significant association between the *CARD8* SNP rs2043211 and myocardial infarction in two independent cohorts. Moreover, in a Spanish cohort with rheumatoid arthritis, García-Bermúdez *et al.* [25] did not find any evidence for the role of *CARD8* SNP rs2043211 in the development of cardiovascular events.

Regarding the *ANRIL* SNP mechanism, considering that *ANRIL* and *CARD8* SNPs were not in linkage disequilibrium, the combined effect of *ANRIL* and *CARD8* SNPs was also studied. In this sense, patients carrying four risk alleles (*ANRIL* GG and *CARD8* AA) had a 2.30-fold higher risk of a cardiovascular event occurring than those patients who were carriers of any other genotype. In particular, the most important effect was found to be in relation to ischemic stroke (HR = 3.04). As *CARD8* alone did not show any relationship with cardiovascular events, it was expected that the combination of both SNPs would restrain the effect shown by *ANRIL* alone. However, the effect of the *ANRIL* SNP rs10757278 was maintained when *ANRIL* was analyzed in combination with *CARD8*, suggesting that *CARD8* SNP rs2043211 could play a role in the *ANRIL* SNP rs10757278 mechanism. This finding is in accordance with Bai *et al.* [23] who propose that *ANRIL* acts as an important modulator for expression of its downstream gene *CARD8*. The detailed mechanism by which *ANRIL* regulates *CARD8* expression remains to be identified but it has been suggested that long noncoding RNAs could have a novel role for Alu elements in epigenetic gene regulation [35]. This is the first study combining *ANRIL* and *CARD8* SNPs in renal transplant population. However, one potential limitation of our study is that it does not clarify the precise underlying molecular mechanism for the regulation of *CARD8* SNP by *ANRIL*. Furthermore, even though we do not suspect of any source of bias, our findings should be validated with an independent

cohort to confirm applicability to other renal transplant recipients' populations.

In summary, our findings suggest that the *ANRIL* SNP rs10757278 shows significant genotypic association with cardiovascular events, in particular with ischemic stroke, in renal transplant recipients. *ANRIL* could be used as a genetic marker to stratify patients according to their cardiovascular risk. These patients represent a high-risk group, and they should be followed carefully and probably treated more aggressively with statins and particularly with antiplatelet agents given the relationship between *ANRIL* and platelet reactivity in cardiovascular events complications. However, further studies are needed to demonstrate properly that such interventions can reduce the risk of cardiovascular events in patients carrying the *ANRIL* SNP rs10757278. An improved understanding of the pathogenesis of cardiovascular events would be beneficial for the management of cardiovascular risks in transplant recipients and for the potential clinical applications of these SNPs.

Authorship

AA-R, AP-M, MH, JMC and NL: designed research/study. AA-R, AP-M and PF: performed research/study. NL: contributed important reagents. AV-A, OB, IR, PA-R, JT, JMG and NL: collected data. AA-R, AP-M and NL:

analyzed data. AA-R, AP-M, JMC and NL: wrote the paper.

Funding

Nuria Lloberas is a researcher from ISCIII (CP06/00067) and REDinREN RD16/0009/003. This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III and Ministerio de Sanidad y Consumo (PI12/01564 and PI15/00871), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) cofounded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF) a way to build Europe.

Conflict of interest

All authors have no financial or personal conflict of interest in relation to this article.

Acknowledgements

The present work was performed as part of the Biochemistry, Molecular Biology, and Biomedicine doctoral program of Ariadna Arbiol-Roca at Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). We thank CERCA (Research Centers of Catalonia).

REFERENCES

- Kahwaji J, Bunnapradist S, Hsu JW, Idroos ML, Dudek R. Cause of death with graft function among renal transplant recipients in an integrated healthcare system. *Transplantation* 2011; **91**: 225.
- 2014 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2014.
- Kiberd B, Panek R. Cardiovascular outcomes in the outpatient kidney transplant clinic: the Framingham risk score revisited. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 822.
- Neale J, Smith AC. Cardiovascular risk factors following renal transplant. *World J Transplant* 2015; **5**: 183.
- Chapman JR, Nankivell BJ. Nephrotoxicity of ciclosporin A: short-term gain, long-term pain? *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 2060.
- Flechner SM, Kobashigawa J, Klintmalm G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant* 2008; **22**: 1.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004; **78**: 557.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, *et al.* Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012; **125**: e2.
- Amouyel P. From genes to stroke subtypes. *Lancet Neurol* 2012; **11**: 931.
- Consortium CAD, Deloukas P, Kanoni S, *et al.* Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2013; **45**: 25.
- Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 2011; **43**: 904.
- Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 2013; **193**: 651.
- Dutta A, Henley W, Lang IA, *et al.* The coronary artery disease-associated 9p21 variant and later life 20-year survival to cohort extinction. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; **4**: 542.
- Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, *et al.* A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007; **316**: 1491.
- McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, *et al.* A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007; **316**: 1488.
- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007; **357**: 443.
- Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; **447**: 661.
- Smith JG, Melander O, Lovkvist H, *et al.* Common genetic variants on chromosome 9p21 confers risk of

- ischemic stroke: a large-scale genetic association study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; **2**: 159.
19. Foroud T, Koller DL, Lai D, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysms confirms role of ANRIL and SOX17 in disease risk. *Stroke* 2012; **43**: 2846.
 20. Arbiol-Roca A, Padro-Miquel A, Hueso M, et al. Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta* 2017; **466**: 61.
 21. Melk A, Schildhorn C, Homme M, et al. Association of single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21.3 with cardiovascular death in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2013; **95**: 928.
 22. Harismendy O, Notani D, Song X, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature* 2011; **470**: 264.
 23. Bai Y, Nie S, Jiang G, et al. Regulation of CARD8 expression by ANRIL and association of CARD8 single nucleotide polymorphism rs2043211 (p. C10X) with ischemic stroke. *Stroke* 2014; **45**: 383.
 24. Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, et al. CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. *J Biol Chem* 2001; **276**: 44069.
 25. Garcia-Bermudez M, Lopez-Mejias R, Gonzalez-Juanatey C, et al. CARD8 rs2043211 (p. C10X) polymorphism is not associated with disease susceptibility or cardiovascular events in Spanish rheumatoid arthritis patients. *DNA Cell Biol* 2013; **32**: 28.
 26. Vasseur F, Sendid B, Broly F, et al. The CARD8 p. C10X mutation associates with a low anti-glycans antibody response in patients with Crohn's disease. *BMC Med Genet* 2013; **14**: 35.
 27. Paramel GV, Folkersen L, Strawbridge RJ, et al. CARD8 gene encoding a protein of innate immunity is expressed in human atherosclerosis and associated with markers of inflammation. *Clin Sci* 2013; **125**: 401.
 28. Zhang K, Song W, Li D, et al. The association between polymorphism of CARD8 rs2043211 and susceptibility to arteriosclerosis obliterans in Chinese Han Male population. *Cell Physiol Biochem* 2017; **41**: 173.
 29. Assimes TL, Knowles JW, Basu A, et al. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 2320.
 30. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 806.
 31. Chen G, Fu X, Wang G, Liu G, Bai X. Genetic Variant rs10757278 on Chromosome 9p21 Contributes to Myocardial Infarction Susceptibility. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 11678.
 32. Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression. *PLoS Genet* 2010; **6**: e1000899.
 33. Shen GQ, Rao S, Martinelli N, et al. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *J Hum Genet* 2008; **53**: 144.
 34. Szpakowicz A, Kiliszek M, Pepinski W, et al. Polymorphism of 9p21.3 locus is associated with 5-year survival in high-risk patients with myocardial infarction. *PLoS One* 2014; **9**: e104635.
 35. Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, et al. Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *PLoS Genet* 2013; **9**: e1003588.
 36. Chen HH, Almontashiri NA, Antoine D, Stewart AF. Functional genomics of the 9p21.3 locus for atherosclerosis: clarity or confusion? *Curr Cardiol Rep* 2014; **16**: 502.
 37. Congrains A, Kamide K, Oguro R, et al. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* 2012; **220**: 449.
 38. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**: 620.
 39. Tsai PC, Liao YC, Lin TH, Hsi E, Yang YH, Juo SH. Additive effect of ANRIL and BRAP polymorphisms on ankle-brachial index in a Taiwanese population. *Circ J* 2012; **76**: 446.
 40. Wang W, Oh S, Koester M, et al. Enhanced megakaryopoiesis and platelet activity in hypercholesterolemic, B6-Ldlr^{-/-}, Cdkn2a-deficient mice. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; **9**: 213.
 41. Jardine AG, Fellstrom B, Logan JO, et al. Cardiovascular risk and renal transplantation: post hoc analyses of the Assessment of Lescol in Renal Transplantation (ALERT) Study. *Am J Kidney Dis* 2005; **46**: 529.
 42. Kasiske BL. Epidemiology of cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001; **72**(6 Suppl.): S5.
 43. Weiner DE, Carpenter MA, Levey AS, et al. Kidney function and risk of cardiovascular disease and mortality in kidney transplant recipients: the FAVORIT trial. *Am J Transplant* 2012; **12**: 2437.
 44. Rostaing L, Cantarovich D, Mourad G, et al. Corticosteroid-free immunosuppression with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and daclizumab induction in renal transplantation. *Transplantation* 2005; **79**: 807.
 45. Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, et al. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant* 2007; **7**: 1506.
 46. Ghisdal L, Van Laecke S, Abramowicz MJ, Vanholder R, Abramowicz D. New-onset diabetes after renal transplantation: risk assessment and management. *Diabetes Care* 2012; **35**: 181.
 47. Wauters RP, Cosio FG, Suarez Fernandez ML, Kudva Y, Shah P, Torres VE. Cardiovascular consequences of new-onset hyperglycemia after kidney transplantation. *Transplantation* 2012; **94**: 377.
 48. Anderson CD, Biffi A, Rost NS, Cortellini L, Furie KL, Rosand J. Chromosome 9p21 in ischemic stroke: population structure and meta-analysis. *Stroke* 2010; **41**: 1123.
 49. Ni X, Zhang J. Association between 9p21 genomic markers and ischemic stroke risk: evidence based on 21 studies. *PLoS One* 2014; **9**: e90255.
 50. Ding H, Xu Y, Wang X, et al. 9p21 is a shared susceptibility locus strongly for coronary artery disease and weakly for ischemic stroke in Chinese Han population. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; **2**: 338.
 51. Lemmens R, Abboud S, Robberecht W, et al. Variant on 9p21 strongly associates with coronary heart disease, but lacks association with common stroke. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 1287.
 52. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 13952.
 53. Bagnall RD, Roberts RG, Mirza MM, Torigoe T, Prescott NJ, Mathew CG. Novel isoforms of the CARD8 (TUCAN) gene evade a nonsense mutation. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**: 619.



V. DISCUSSION





V. DISCUSSIÓ

En aquest apartat es durà a terme una discussió general del contingut d'aquesta tesi. Recull els resultats de dos estudis realitzats de forma seqüencial a fi i efecte d'assolir l'objectiu principal de la tesi, és a dir, trobar associació entre diferents polimorfismes del gen *ANRIL* i la susceptibilitat de patir un episodi cardiovascular en pacients amb malaltia renal crònica ja siguin en hemodiàlisi o bé receptors d'un trasplantament de ronyó.

D'acord amb la hipòtesi de partida, els pacients amb malaltia renal crònica *per se* tenen major susceptibilitat a patir un episodi cardiovascular al llarg de la seva vida. La mortalitat cardiovascular en pacients amb insuficiència renal terminal es troba entre 10 i 30 vegades augmentada respecte a la població general i en particular, la població en hemodiàlisi està considerada un grup de pacients d'alt risc (138, 139). És cert que una vegada el ronyó del malalt ha estat trasplantat, la taxa de mortalitat decau però la mortalitat cardiovascular segueix sent la primera causa de mort, generant al voltant del 50 % dels èxits, seguida dels processos infecciosos i les neoplàsies (15, 18).

A més a més dels factors convencionals que predisposen a patir malaltia cardiovascular, estudis d'agregació familiar han demostrat que la genètica té un paper important i cada cop més, estan emergint biomarcadors genètics que podrien predir o identificar els pacients de major risc (84).

Ençà l'any 2007, s'han realitzat diferents estudis GWAS que han demostrat diverses associacions entre polimorfismes i malaltia cardiovascular (95-98). Una de les regions del genoma amb un interès emergent correspon al gen *ANRIL*, un "Long non-coding RNA" que no es tradueix a proteïna i que s'ha identificat com el locus més fortament relacionat amb malaltia cardiovascular (96, 98, 140, 141). Hi ha diversos estudis que han demostrat que *ANRIL* està associat amb el risc d'aterosclerosi i arteriosclerosi coronària, malaltia vascular perifèrica i altres malalties vasculares (100, 142-144). Tot i que el mecanisme d'acció encara no és conegut, s'ha demostrat que *ANRIL* es troba expressat en cèl·lules que tenen un paper crític en l'aterogènesi, influint en l'expressió d'altres gens que sí que es tradueixen, com ara *CARD8* (135).

Més enllà dels grans estudis d'associació, diferents polimorfismes del gen *ANRIL* també s'han estudiat en cohorts més reduïdes per tal de validar-ne els resultats. Els estudis publicats fins al moment estan realitzats majoritàriament en població general sana (96, 98). Actualment, en el camp de la malaltia renal crònica, només l'estudi de Melk *et al.* (137) ha investigat l'associació

entre polimorfismes del gen *ANRIL* i mortalitat cardiovascular en pacients receptors d'un trasplantament de ronyó, mentre que la població en hemodiàlisi no ha estat mai estudiada fins ara.

ESTUDI 1: INFLUÈNCIA GENÈTICA SOBRE EL RISC DE PATIR UN EPISODI CARDIOVASCULAR EN PACIENTS AMB MALALTIA RENAL CRÒNICA EN HEMODIÀLISI

Per a la primera part d'aquesta tesi es van incloure 284 pacients amb insuficiència renal terminal en hemodiàlisi. És un estudi de seguiment retrospectiu on els pacients es van seguir des del dia d'entrada a hemodiàlisi fins l'episodi cardiovascular.

Es va considerar esdeveniment cardiovascular: angina de pit, infart agut de miocardi o ictus isquèmic. No es va tenir en compte la malaltia arterial perifèrica pel seu difícil i subjectiu diagnòstic (31).

En base al que estava descrit a la literatura, es van seleccionar els polimorfismes rs10757278, rs4977574, rs10757274 i rs6475606 del gen *ANRIL* (95-98). Els genotips s'agruparen segons si eren portadors de l'al·lel protector o homozigots per l'al·lel de risc basant-nos en les tendències observades en les diferents corbes de supervivència Kaplan-Meier i en les significacions estadístiques obtingudes de les regressions individuals. En el cas dels polimorfismes: rs10757278, rs4977574 i rs10757274, com que l'al·lel protector porta una adenina a la posició d'estudi, els pacients portadors amb genotips AA o AG es varen comparar amb els pacients homozigots per l'al·lel de risc G (genotip GG). Per altra banda, pel polimorfisme rs6475606, l'al·lel protector està constituït per una citosina, per tant, els pacients portadors amb genotip CC o CT es varen comparar amb els pacients homozigots per l'al·lel de risc T (genotip TT). Aquesta classificació, també anomenada a la bibliografia com a model recessiu, ha estat descrita en altres estudis (96, 140).

Els resultats obtinguts en el nostre primer article de la tesi doctoral confirmen les dades descrites a la literatura dels polimorfismes del gen *ANRIL* i la seva relació amb malaltia cardiovascular (106, 114, 145). La troballa més important del nostre estudi és que aquestes conclusions s'han demostrat, per primer cop, en població d'alt risc com és el pacient en hemodiàlisi, en la qual l'SNP roman com a important factor de risc cardiovascular independentment dels altres factors que es consideren habitualment a la pràctica clínica. Pels quatre polimorfismes estudiats (rs10757278, rs4977574, rs10757274 i rs6475606) els portadors de l'al·lel protector tenen menor susceptibilitat a patir un episodi cardiovascular

durant l'hemodiàlisi respecte als pacients homozigots per a l'al·lel de risc. Els resultats varen mostrar una relació significativa entre: rs10757278 (GG) (*HR*: 2.15 (1.14-4.01), *P*=0.018), rs4977574 (GG) (*HR*: 1.95 (1.04-3.66), *P*=0.036) i rs10757274 (GG) (*HR*: 1.88 (1.00-3.55), *P*=0.050) amb la incidència d'episodis cardiovasculars, mentre que el polimorfisme rs6475606 (TT) no va arribar a assolir la significació estadística (*P*=0.092). Per tant, vam poder concloure que els pacients homozigots per l'al·lel de risc tenien el doble de susceptibilitat de patir un episodi cardiovascular durant l'hemodiàlisi respecte als pacients portadors de l'al·lel protector. La magnitud del risc trobada en el nostre estudi és del mateix ordre que la descrita prèviament a la bibliografia en pacients sense malaltia renal crònica (96, 140).

Controlar per variables de confusió és molt útil en estudis retrospectius, quan la població en estudi pot no estar homogèniament distribuïda respecte a aquestes mateixes variables. És una manera d'assegurar la falsa adjudicació d'un efecte a un polimorfisme degut a que una tercera variable –la que provoca realment l'efecte– estigui més representada en un genotip que en un altre de manera casual. En el present estudi, a més a més dels factors genètics, també s'han considerat altres possibles factors de risc de malaltia cardiovascular en pacients en hemodiàlisi (146) discutits àmpliament a la introducció d'aquesta tesi doctoral. L'edat a l'inici d'hemodiàlisi, el sexe, la hipertensió arterial, la diabetis mellitus i la història d'antecedents de malaltia cardiovascular (1, 50, 51). També s'han recollit les dades relatives a la concentració d'hemoglobina A1c, com a marcador del control de la concentració de glucosa plasmàtica en els pacients diabètics (1); el colesterol, com a marcador de dislipèmia (53, 59); la creatinina o la velocitat de filtració glomerular; l'albumina en sèrum, com a marcador de l'estat nutricional del pacient (146); l'hemoglobina en sang i la ferritina en sèrum, com a marcadors d'anèmia (146); i per últim, el calci, el fòsfor i la paratirina en sèrum, com a marcadors d'alteracions del metabolisme fosfo-càlcic (75).

A les regressions univariants de Cox, les variables de control estadísticament significatives han estat: l'edat a l'inici de l'hemodiàlisi, el sexe, la hipertensió, la història d'antecedents de malaltia cardiovascular, la diabetis mellitus, el trasplantament renal i la concentració d'albumina inicial.

Cal destacar que les variables edat, història personal d'antecedents de malaltia cardiovascular i trasplantament renal estan correlacionades amb la presència de diabetis. L'edat és un important contribuïdor a desenvolupar diabetis mellitus tipus 2 i aquesta és una variable de comorbiditat i que pot acabar desenvolupant malaltia cardiovascular. A més a més, la diabetis en alguns pacients és un factor determinant per a no ser candidats a trasplantament renal

(66). Com a conseqüència d'aquests fets, l'única variable de les correlacionades que vàrem incloure al model de regressió múltiple va ser la diabetis mellitus perquè considerem que és la variable inicial causal tant de la història personal d'antecedents de malaltia cardiovascular com del biaix en rebre un trasplantament renal.

En les regressions multivariants de Cox, el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* va mostrar associació significativa amb patir un episodi cardiovascular un cop ajustat per les variables de control (*HR*: 1.91 (1.02-3.61), $P_{adj}=0.045$). Els pacients amb genotip GG tenen un 1.91 vegades més risc de patir un episodi cardiovascular durant l'hemodiàlisi respecte als pacients portadors de l'al·lel protector A. Aquests resultats estan d'acord amb un treball d'Assimes *et al.* (114), on van trobar una forta associació entre aquest polimorfisme i la malaltia de les artèries coronàries, i amb l'estudi de Do R *et al.* (145) que relacionaren el polimorfisme amb l'infart agut de miocardi.

Els nostres resultats reforcen l'únic estudi realitzat en pacients amb malaltia renal crònica. Melk *et al.* (137) descriuen que els pacients GG tenen el doble de risc de mortalitat cardiovascular post trasplantament renal comparant amb el pacients portadors de l'al·lel protector A.

La hipòtesi del mecanisme mitjançant el qual actua aquesta variant genètica es basa en que l'al·lel de risc G del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* interromp un lloc d'unió del factor de transcripció *STAT1*, a la vegada altera els llocs d'unió d'*ANRIL* amb els factors de transcripció *PRC1* i *PRC2* i provoca canvis en l'expressió de *CDKN2A/B* que contribueixen al desenvolupament i progressió de la resposta inflamatòria (115).

Pel que fa als resultats obtinguts respecte als polimorfismes rs4977574 i rs10757274 del gen *ANRIL*, un cop ajustats per les variables de control, varen perdre la significació estadística ($P_{adj}=0.11$ i $P_{adj}=0.17$, respectivament). Diferents estudis mostren associació entre els polimorfismes rs4977574, rs10757274 i rs6475606 i malaltia cardiovascular. És l'exemple de dos estudis que troben associació entre rs4977574 i IAM (119, 120), Foroud *et al.* (102) que troba associació entre rs6475606 del gen *ANRIL* i aneurismes intracraneals i Ro Do *et al.* (145) que troba associació entre rs10757274 i infart agut de miocardi. Els resultats del nostre treball mostren les mateixes tendències. Probablement l'efecte d'aquests SNPs no és tan marcat com l'rs10757278 i es necessita un major nombre de pacients per tal que la relació amb els episodis cardiovasculars sigui estadísticament significativa a la població de pacients amb MRC en hemodiàlisi del present estudi.

Relació entre ANRIL i la diabetis mellitus en l'estimació del risc cardiovascular

L'estudi de la diabetis mellitus té un especial interès ja que és la variable més fortament associada amb patir un episodi cardiovascular durant l'hemodiàlisi, segons els *hazard ratios* i la seva significació estadística en els models de regressió multivariant de Cox. Els pacients diabètics en hemodiàlisi tenen 6 vegades major risc de desenvolupar un episodi cardiovascular respecte als no diabètics. De fet, la diabetis mellitus ha estat reconeguda des dels inicis com el factor de major risc d'aterosclerosi degut a la seva complexa contribució en la patogènesi de múltiples processos biològics involucrats en aquesta malaltia (147).

Per aquest motiu, vam voler comprendre millor el paper que podien tenir els polimorfismes del gen *ANRIL*, en concret el rs10757278, en la susceptibilitat a patir un episodi cardiovascular en pacients amb diabetis mellitus. Es va estudiar l'estratificació del risc cardiovascular d'aquests pacients segons les variables diabetis mellitus i el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL*. Mitjançant regressió de Cox, es va concloure que el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* manté el seu rol i permet categoritzar als pacients segons el seu risc fins i tot dins del grup de pacients diabètics. En primer lloc, la diabetis és la variable que més fortament explica el risc, però entre els pacients diabètics, els que són homozigots per l'al·lel de risc GG tenen major susceptibilitat de patir malaltia cardiovascular durant l'hemodiàlisi, respecte als diabètics portadors de l'al·lel protector A. Per tant, l'estratificació de major a menor risc a patir un episodi cardiovascular és la següent: pacients homozigots GG i diabètics, pacients portadors de l'al·lel protector A i diabètics, pacients homozigots GG i no-diabètics, i per últim, pacients portadors de l'al·lel protector A i no-diabètics. D'aquesta manera, ens permet demostrar que la variant genètica manté el seu rol en l'estratificació del risc de patir un episodi cardiovascular de forma additiva a la diabetis mellitus. Aquests resultats corroboren el treball de Melk *et al.* (137) en pacients trasplantats de ronyó on troben que la diabetis mellitus és una variable modificadora de l'efecte dels polimorfismes del gen *ANRIL*.

Aquest treball és el primer que estudia l'associació entre polimorfismes del gen *ANRIL* i la susceptibilitat de patir un episodi cardiovascular en pacients d'alt risc, com són els malalts en tractament renal substitutiu.

Estudi de desequilibri de lligament dels polimorfismes del gen ANRIL en pacients en hemodiàlisi

El segon article d'aquesta tesi (Annex 1) és un treball que completa el primer estudi on es va voler comprovar el desequilibri de lligament de les quatre variants genètiques estudiades en la

nostra població amb malaltia renal crònica en hemodiàlisi ja que a la literatura Broadbent *et al.* (103) posen de manifest la presència d'un haplotip de risc cardiovascular de 53 Kb en el cromosoma 9p21.3 del gen *ANRIL* en població europea.

Es van genotipar els 284 pacients pels 4 polimorfismes del gen *ANRIL*: rs10757278, rs4977574, rs10757274 i rs6475606. Les freqüències al·lèliques trobades pels 4 polimorfismes estudiats es troben en equilibri de Hardy-Weinberg i són comparables amb les descrites a la bibliografia (96, 98, 141, 148). L'estudi en la nostra població en hemodiàlisi va mostrar un fort desequilibri de lligament entre els 4 polimorfismes (amb r^2 entre 0,65 i 0,96 i $p < 0,0001$ per a totes les combinacions), és a dir, es va corroborar l'existència d'un haplotip que s'hereta de forma conjunta. A més a més, es va identificar el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* com a polimorfisme representatiu dels 4 amb l'esdeveniment estudiat, corroborant els resultats obtinguts per Helgadottir *et al.* (95).

ESTUDI 2: INFLUÈNCIA GENÈTICA SOBRE EL RISC DE PATIR UN EPISODI CARDIOVASCULAR EN PACIENTS RECEPTORS D'UN TRASPLANTAMENT DE RONYÓ

El segon estudi d'aquesta tesi doctoral es troba recollit en el tercer article que completa el compendi que conforma aquesta tesi.

La disfunció renal i l'augment del risc cardiovascular són alguns dels factors que tenen un impacte negatiu en la supervivència de l'empelt i del pacient a llarg termini, en els receptors d'un trasplantament de ronyó. A més a més dels factors tradicionalment coneguts, volíem estudiar si els polimorfismes del gen *ANRIL* mantenien el seu paper explicatiu del risc en el desenvolupament de malaltia cardiovascular, ja demostrat per nosaltres mateixos en la població en hemodiàlisi. Com ja hem comentat, la gran majoria d'estudis s'han realitzat en població general (96, 98) tot i que hi ha un únic estudi liderat per Melk *et al.* (137) i mencionat àmpliament en aquesta tesi que s'ha dut a terme en població receptora d'un trasplantament de ronyó.

Al segon apartat d'aquesta tesi, ens vàrem plantejar l'estudi de la susceptibilitat genètica que confereix el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* a patir un episodi cardiovascular en pacients trasplantats de ronyó. Per aquest segon estudi, es varen incloure 505 pacients receptors d'un trasplantament de ronyó entre gener de l'any 2000 i desembre de l'any 2014 a l'Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona). És un estudi de seguiment retrospectiu on els pacients es van seguir des del dia del trasplantament de ronyó fins l'episodi cardiovascular.

De la mateixa manera que en el primer estudi d'aquesta tesi, s'ha considerat esdeveniment cardiovascular: angina de pit, infart agut de miocardi o ictus isquèmic. A més a més, també s'han estudiat com a *endpoints* la mortalitat global i la mortalitat cardiovascular.

La incidència d'episodis cardiovasculars en la nostra població d'estudi ha estat del 10 %, 53 dels 505 pacients van patir un episodi cardiovascular durant l'estudi de seguiment. En concret, 20 pacients van patir un ictus isquèmic i 33 un infart agut de miocardi. Aquests esdeveniments cardiovasculars van debutar, com a mitjana, als 4.5 anys després del trasplantament de ronyó. Aquests resultats s'aproximen molt al que hi ha descrit a la bibliografia que cita un 11-12 % d'accidents cardiovasculars abans dels tres primers anys post trasplantament (149).

Per fer l'estudi es va seleccionar el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* ja que en la primera part d'aquesta tesi doctoral vam concloure que era el polimorfisme més fortament associat amb patir un episodi cardiovascular durant l'hemodiàlisi i a més a més, és representatiu d'un haplotip de polimorfismes del gen *ANRIL* que s'hereten de forma conjunta. Per tant, un dels nostres objectius en aquesta segona part de la tesi ha estat validar els resultats obtinguts en població en hemodiàlisi a població receptora d'un trasplantament de ronyó.

Tal i com havíem realitzat en el primer estudi, es va seguir l'agrupament de genotips segons el model recessiu: portadors de l'al·lel protector (AA o AG) i homozigots per l'al·lel de risc (GG). Els resultats obtinguts en aquest segon estudi varen confirmar i validar els resultats de la primera part d'aquesta tesi doctoral i són coherents amb la bibliografia en població general (14-16). El polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* s'associa de manera estadísticament significativa amb patir un episodi cardiovascular en receptors d'un trasplantament de ronyó. Les corbes de supervivència Kaplan-Meier pel polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* varen mostrar de forma significativa l'associació del genotip GG amb un elevat risc de patir un episodi cardiovascular en pacients post trasplantament. Un cop vàrem trobar aquesta associació, ens vam plantejar estratificar els episodis cardiovasculars en: ictus isquèmic i infart agut de miocardi. Les corbes de supervivència mostraren una major associació entre el polimorfisme del gen *ANRIL* i els ictus isquèmics ($P=0.0008$) a diferència de l'infart agut de miocardi ($P=0.048$) tot i aquest ser estadísticament significatiu.

D'altra banda, aquests resultats foren corroborats en els models de regressió univariants de Cox. Els homozigots GG pel polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* mostraren major risc de patir un episodi cardiovascular ($HR: 2.65 (1.54-4.58)$, $P<0.001$) que no pas els pacients

portadors de l'al·lel protector A (AA o AG) confirmant les troballes descrites a la bibliografia en població general (93, 95, 96, 98, 103, 106, 114, 120, 150, 151). A més a més, quan els episodis cardiovasculars es varen classificar, es va trobar una major associació entre el polimorfisme i ictus isquèmic (*HR*: 4.09 (1.67-9.99), *P*=0.002) que no pas amb infart agut de miocardi (*P*=0.053) que no va arribar a assolir la significació estadística. Per tant, els pacients homozigots per l'al·lel de risc GG tenen 2.65 vegades major risc de patir un episodi cardiovascular, concretament 4.09 vegades major risc de presentar un ictus isquèmic, després del trasplantament de ronyó respecte als pacients portadors de l'al·lel protector A (AA o AG). Pel que fa a mortalitat global i cardiovascular, no es va trobar cap diferència estadísticament significativa entre els pacients homozigots per l'al·lel de risc del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* i els portadors de l'al·lel protector.

Tal i com vàrem realitzar en la primera part d'aquesta tesi doctoral, calia estudiar les possibles variables de confusió. A part dels factors de risc clàssics de MCV, també es van tenir en compte altres factors de risc intrínsecs dels pacients trasplantats de ronyó ja que el propi context clínic del trasplantament fa augmentar notablement el risc de malaltia cardiovascular (82, 83, 152). Seguint les recomanacions de la bibliografia actual s'han recollit variables de control com el sexe, l'edat del receptor i del donant, l'índex de massa corporal com a marcador d'obesitat, la hipertensió, el consum de tabac, la història personal d'antecedents de malaltia cardiovascular, el filtrat glomerular post trasplantament (62), el perfil lipídic, la proteïnúria, el temps en diàlisi, el tipus de diàlisi, el tipus de donant: viu o de cadàver, complicacions del post TR: la necrosi tubular aguda i el rebuig clínic agut de l'empelt, entre d'altres.

Cal destacar la diabetis mellitus *de novo* post trasplantament (NODAT) ja que el tractament immunosupressor, especialment tacrolimus i els esteroides, estan associats amb el desenvolupament i debut de la diabetis post TR (153, 154). En el nostre estudi, un 15 % dels pacients han debutat amb aquesta malaltia. L'aparició de NODAT acostuma a ser durant els 3-6 mesos post trasplantament i augmenta el risc de patir episodis cardiovasculars, rebuig de l'empelt i disminueix la supervivència del pacient (67, 68).

Les variables que varen resultar estadísticament significatives amb l'esdeveniment d'un episodi cardiovascular en els model univariants de Cox foren: l'edat del pacient, l'índex de massa corporal, la història personal d'antecedents de malaltia cardiovascular i la diabetis mellitus (veure Annex 2: Models de regressió univariants de Cox). Per tal de minimitzar el biaix en el model final de regressió multivariant de Cox s'ha ajustat el model amb les variables de control citades. En el model de regressió de Cox final es va observar com el polimorfisme

rs10757278 del gen *ANRIL* mantenia l'associació amb els episodis cardiovasculars (*HR*: 2.93 (1.69-5.11), $P_{aj}<0.0001$) d'una forma molt significativa. De la mateixa manera com es va observar en les corbes de supervivència i en les regressions univariants de Cox, l'associació amb ictus isquèmic va ser més forta (*HR*: 4.43 (1.81-10.85), $P_{aj}=0.001$) que en el cas d'infart agut de miocardi (*HR*: 2.27 (1.10-4.67), $P_{aj}=0.026$). Per tant, els pacients homozigots GG tenien 4.43 vegades major risc de patir un ictus isquèmic respecte als pacients portadors de l'al·lel protector A (AA o AG). Aquests resultats es confirmen en la literatura: meta-anàlisis recents (110, 111) mostren que el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* és un factor de risc de desenvolupar un ictus isquèmic, en particular, accidents cerebrovasculars de grans vasos en població de raça blanca. Els nostres resultats suggereixen que el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* té un major efecte sobre la funció de la paret arterial, com per exemple en la remodelació i/o reparació vascular, ja que són comuns en la malaltia coronària i en l'ictus isquèmic. Tot i així, hi ha estudis on no han trobat associació entre polimorfismes del gen *ANRIL* i l'ictus isquèmic (112, 113). El nostre estudi mostra per primer cop associació entre polimorfismes del gen *ANRIL* i ictus isquèmic en pacients trasplantats de ronyó ja que l'article publicat per Melk *et al.* (137) descriuen l'associació amb mortalitat cardiovascular sense discriminar el subtipus d'accident vascular.

Relació entre els polimorfismes dels gens *ANRIL* i *CARD8*

Finalment, per completar el segon estudi, ens vam plantejar aprofundir més en el paper del gen *ANRIL*. Com ja hem citat anteriorment, *ANRIL* és un gen que es transcriu però que no es tradueix a proteïna i que sembla ser que té un paper regulador de l'expressió gènica de múltiples gens *downstream*. Un d'aquests gens és *CARD8* tot i que, encara es troba per identificar el mecanisme detallat pel qual *ANRIL* regula l'expressió d'aquest gen. *CARD8* és una molècula adaptadora que s'uneix a NLRP3 i participa en la formació de l'inflamasoma. Inactiva Caspasa-1, disminueix IL-1 β , disminueix NF κ β , activa l'apoptosi i finalment redueix la resposta inflamatòria.

A la literatura, només trobem un treball que relacioni *ANRIL* i *CARD8*, on mostra que cèl·lules *knockdown* pel gen *ANRIL* tenen una disminució de l'expressió de *CARD8* i pel contrari, cèl·lules amb una sobreexpressió del gen *ANRIL*, fan augmentar l'expressió de *CARD8* (135). D'altra banda, *CARD8* és l'únic gen *downstream* descrit en el qual s'ha observat que la seva expressió augmenta a l'artèria caròtida en presència de plaques ateroscleròtiques, per tal de reduir la resposta inflamatòria, en comparació amb vasos arterials de donants de teixit (133). Per

aquests motius ens vam plantejar estudiar el paper que pot tenir aquest polimorfisme del gen *CARD8* en els episodis cardiovasculars en la nostra població.

Pel que fa al polimorfisme rs2043211 del gen *CARD8*, no vàrem trobar resultats significatius amb la incidència d'episodis cardiovasculars i tampoc amb la mortalitat. A l'estudi de Paramel *et al.* (133) tampoc varen trobar cap associació entre el polimorfisme i infart agut de miocardi en dos cohorts diferents. García-Bermúdez *et al.* (128), en una cohort amb artritis reumatoïde espanyola, tampoc trobaren evidència entre el polimorfisme i els episodis cardiovasculars. I per últim, a l'estudi realitzat per Zhou *et al.* (155) l'any 2016, no varen trobar associació entre el polimorfisme de *CARD8* i el risc de patir un episodi cardiovascular en població xinesa. En canvi, Bai *et al.* (135) varen poder demostrar associació entre aquest polimorfisme i ictus isquèmic en dues poblacions xineses independents però no amb malaltia cardiovascular.

Els resultats d'aquest treball, tot i no ser estadísticament significatius, mostraren que l'al·lel A és el de risc. S'agruparen els genotips segons el model recessiu i de la mateixa manera com ho vàrem fer amb els polimorfismes del gen *ANRIL*: portadors de l'al·lel protector T (TT o AT) i homozigots per l'al·lel de risc AA. Llegint la bibliografia s'observa controvèrsia entre el que es considera al·lel de risc i el protector per aquest polimorfisme. Estudis inicials mostraren que l'homozigosi pel codó stop (TT) reduïa l'expressió de *CARD8* funcional perquè es sintetitza un proteïna *CARD8* truncada i per tant, la inhibició de la Caspasa-1 i de NFκβ no és tant efectiva provocant un augment de la resposta inflamatòria (127). No obstant, Paramel *et al.* (133) l'any 2013 afirmaven que l'al·lel minoritari T està associat amb una menor expressió de *CARD8* però varen trobar que estava relacionat amb concentracions de proteïna C reactiva i de la proteïna MCP-1 menors, que són dues proteïnes de resposta inflamatòria, suggerint que els pacients TT, amb baixes concentracions de *CARD8*, poden no presentar inflamació. De la mateixa manera, Bai *et al.* (135) en el seu estudi troben que l'al·lel minoritari T és el protector i que els pacients TT tenen menor risc de patir un ictus isquèmic. A la vegada i en el camp de malalties autoimmunes, Roberts *et al.* (92) mostren que l'al·lel minoritari T és protector front a malaltia de Crohn.

Per últim, al no trobar associació entre el polimorfisme rs2043211 del gen *CARD8* i els episodis cardiovasculars i per tal d'explorar en major profunditat les tendències observades a les corbes de supervivència, es va estudiar la sinergia amb el polimorfisme del gen *ANRIL* rs10757278. Els pacients s'agruparen per portadors dels 4 al·lells de risc (*ANRIL* GG i *CARD8* AA) front a la resta de genotips. Els pacients portadors d'aquests 4 al·lells de risc tenien 2.30 vegades major risc de

patir un episodi cardiovascular (HR: 2.30 (1.20-4.41), $P=0.012$). En concret, 3.04 vegades major risc de patir un ictus isquèmic que la resta de pacients portadors de qualsevol dels altres genotips (HR: 3.04 (1.17-7.91), $P=0.023$). Per contra, l'al·lel protector T del polimorfisme del *CARD8* contrarestava l'efecte de l'al·lel de risc cardiovascular del polimorfisme del gen *ANRIL*.

Per tant, podem concloure que el polimorfisme rs2043211 del gen *CARD8* manté l'efecte que té el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* independentment i que per tant, semblaria que *CARD8* podria tenir algun paper en el mecanisme d'acció del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL*. Aquesta troballa està recolzada pel treball realitzat per Bai *et al.* (135) on proposen que *ANRIL* actua com a un important modulador de l'expressió de gens *downstream*, com és *CARD8* tot i que el mecanisme detallat encara manca per identificar.

Aquest és el primer estudi publicat on es combinen polimorfismes del gen *ANRIL* i del gen *CARD8* en pacients trasplantats de ronyó. Veient la importància potencial que pot tenir l'estudi d'aquest polimorfisme a la pràctica clínica diària, és necessari avançar en la investigació bàsica per tal de descobrir els mecanismes reguladors d'aquesta via transcripcional i el seu rol molecular amb l'ateroesclerosi.

Com a conclusions d'aquest segon estudi de la tesi podem afirmar que el polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* s'associa amb la presència d'episodis cardiovasculars, particularment, amb ictus isquèmics en pacients receptors d'un trasplantament renal. Aquest polimorfisme es podria utilitzar com a possible biomarcador per tal d'identificar i poder estratificar els pacients trasplantats segons el seu risc de patir un episodi cardiovascular, conjuntament amb els altres factors de risc. Aquests pacients representen un grup d'elevat risc cardiovascular i cal que estiguin identificats, controlats per tal de poder beneficiar-se de tractaments més intensius d'antiplaquetars i/o estatines. Tot i així, calen més estudis per demostrar que aquest major control i aquestes majors intervencions poden reduir el risc de presentar un episodi cardiovascular en aquests pacients homozigots per l'al·lel de risc del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL*. Una millora del coneixement de la patogènesis dels episodis cardiovasculars ajudaria a millorar el maneig dels pacients trasplantats amb major risc cardiovascular i la potencial aplicació clínica del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL*.

VI. CONCLUSIONS



VI. CONCLUSIONS

Estudi 1: Influència genètica sobre el risc de patir un episodi cardiovascular en pacients amb malaltia renal crònica en hemodiàlisi

1. Els pacients homozigots per l'al·lel de risc (GG) dels polimorfismes rs10757278, rs4977574 i rs10757274 del gen *ANRIL* tenen el doble de susceptibilitat de patir un episodi cardiovascular en hemodiàlisi que els portadors de l'al·lel protector.
2. El polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* manté la seva associació amb la incidència d'episodis cardiovasculars en hemodiàlisi després de l'ajustament per les variables de control també relacionades amb malaltia cardiovascular en el models univariants (*HR*: 1.91 (1.02-3.61), $P_{aj}=0.045$).
3. El polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* permet estratificar els pacients diabètics segons el grau de risc de patir un episodi cardiovascular.

Estudi de desequilibri de lligament dels polimorfismes del gen *ANRIL* en pacients en hemodiàlisi

4. Existeix un fort desequilibri de lligament entre els polimorfismes rs10757278, rs4977574, rs10757274 i rs6475606 del gen *ANRIL* en la nostra població en hemodiàlisi.
5. El polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* es pot utilitzar com a polimorfisme representatiu dels quatre estudiats.

Estudi 2: Influència genètica sobre el risc de patir un episodi cardiovascular en pacients receptors d'un trasplantament de ronyó

6. Els pacients homozigots per l'al·lel de risc (GG) del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* tenen 2.93 vegades major risc de patir un episodi cardiovascular i 4.09 vegades major risc de patir un ictus isquèmic en receptors d'un trasplantament de ronyó, respecte als portadors de l'al·lel protector.

7. L'associació més forta del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* és amb ictus isquèmic en pacients trasplantats de ronyó després de l'ajustament per les variables de control també associades amb malaltia cardiovascular en els models univariants (*HR*: 4.43 (1.81-10.85), $P_{adj}=0.001$)
8. El polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* no mostra associació amb mortalitat global o cardiovascular en pacients trasplantats.
9. El polimorfisme rs2043211 del gen *CARD8* no mostra associacions significatives amb patir un episodi cardiovascular o amb mortalitat en receptors d'un trasplantament de ronyó.
10. Els pacients portadors dels quatre polimorfismes de risc (GG *ANRIL* + AA *CARD8*) presenten 2.30 vegades major de risc de patir un episodi cardiovascular (*HR*: 2.30 (1.20-4.41), $P=0.012$) i 3.04 vegades major risc de patir un ictus isquèmic que la resta de pacients portadors de qualsevol dels altres genotips (*HR*: 3.04 (1.17-7.91), $P=0.023$).
11. L'estudi de la sinergia dels polimorfismes dels gens *CARD8* i *ANRIL* mostra com l'efecte independent del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL* es manté, demostrant que *CARD8* podria tenir algun paper en el mecanisme d'acció del polimorfisme rs10757278 del gen *ANRIL*.



VII. BIBLIOGRAFIA





VII. BIBLIOGRAFIA

1. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int (Suppl)* 2013;3(1):1-150.
2. Registre de Malalts Renals de Catalunya. Informe estadístic 2015.
3. Gorostidi M, Santamaria R, Alcazar R, Fernandez-Fresnedo G, Galceran JM, Goicoechea M, et al. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2014;34(3):302-16.
4. SENEPRO: Sociedad Española de Nefrología. <http://www.senefro.org>. (Accés 2018-07-18).
5. Donació i trasplantament. <http://trasplantaments.gencat.cat/>. (Accés 2018-07-18).
6. Ibeas J, Roca-Tey R, Vallespin J, Moreno T, Monux G, Marti-Monros A, et al. Spanish Clinical Guidelines on Vascular Access for Haemodialysis. *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2017;37 Suppl 1:1-191.
7. Cohen DJ, St Martin L, Christensen LL, Bloom RD, Sung RS. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1995-2004. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(5 Pt 2):1153-69.
8. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *The New England journal of medicine*. 1963;268:1315-23.
9. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, et al. Kidney. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2016;16 Suppl 2:11-46.
10. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *The New England journal of medicine*. 1999;341(23):1725-30.
11. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007;116(1):85-97.
12. Weiner DE, Tighiouart H, Stark PC, Amin MG, MacLeod B, Griffith JL, et al. Kidney disease as a risk factor for recurrent cardiovascular disease and mortality. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2004;44(2):198-206.
13. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the

American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003;108(17):2154-69.

14. Collado S, Coll E, Deulofeu R, Guerrero L, Pons M, Cruzado JM, et al. [Prevalence of cardiovascular disease in uraemia and relevance of cardiovascular risk factors]. *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2010;30(3):342-8.

15. Foley RN. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Journal of renal care*. 2010;36 Suppl 1:4-8.

16. Kasiske BL, Guijarro C, Massy ZA, Wiederkehr MR, Ma JZ. Cardiovascular disease after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 1996;7(1):158-65.

17. Rigatto C. Clinical epidemiology of cardiac disease in renal transplant recipients. *Seminars in dialysis*. 2003;16(2):106-10.

18. Vanrenterghem YF, Claes K, Montagnino G, Fieuws S, Maes B, Villa M, et al. Risk factors for cardiovascular events after successful renal transplantation. *Transplantation*. 2008;85(2):209-16.

19. Israni AK, Snyder JJ, Skeans MA, Peng Y, Maclean JR, Weinhandl ED, et al. Predicting coronary heart disease after kidney transplantation: Patient Outcomes in Renal Transplantation (PORT) Study. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(2):338-53.

20. Rutsch F, Nitschke Y, Terkeltaub R. Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circulation research*. 2011;109(5):578-92.

21. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003;18(9):1731-40.

22. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.

23. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20.

24. Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link? *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2001;16(10):1968-71.

25. Mark PB, Murphy K, Mohammed AS, Morris ST, Jardine AG. Endothelial dysfunction in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings*. 2005;37(9):3805-7.

26. Shah PK. Plaque disruption and thrombosis. Potential role of inflammation and infection. *Cardiology clinics*. 1999;17(2):271-81.
27. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2002;17 Suppl 8:33-8; discussion 40.
28. Bakri RS, Afzali B, Covic A, Sriskantharan R, Bharna-Ariza P, Park WH, et al. Cardiovascular disease in renal allograft recipients is associated with elevated sialic acid or markers of inflammation. *Clinical transplantation*. 2004;18(2):201-4.
29. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *European heart journal*. 2012;33(20):2551-67.
30. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*. 2010;376(9735):112-23.
31. Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, et al. Management of patients with peripheral artery disease (compilation of 2005 and 2011 ACCF/AHA guideline recommendations): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013;127(13):1425-43.
32. Zoccali C. Cardiovascular risk in uraemic patients-is it fully explained by classical risk factors? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2000;15(4):454-7.
33. Shah DS, Polkinghorne KR, Pellicano R, Kerr PG. Are traditional risk factors valid for assessing cardiovascular risk in end-stage renal failure patients? *Nephrology*. 2008;13(8):667-71.
34. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. The Framingham predictive instrument in chronic kidney disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(3):217-24.
35. Chade AR, Lerman A, Lerman LO. Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension*. 2005;45(6):1042-9.
36. Stenvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Seminars in dialysis*. 2002;15(5):329-37.
37. Zoccali C. Cardiorenal risk as a new frontier of nephrology: research needs and areas for intervention. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2002;17 Suppl 11:50-4.

38. Kiberd B, Panek R. Cardiovascular outcomes in the outpatient kidney transplant clinic: the Framingham risk score revisited. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(3):822-8.
39. Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC, Holdaas H. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet*. 2011;378(9800):1419-27.
40. Kasiske BL, Klinger D. Cigarette smoking in renal transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2000;11(4):753-9.
41. Orth SR. Smoking and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2002;13(6):1663-72.
42. Chow FY, Polkinghorne KR, Chadban SJ, Atkins RC, Kerr PG. Cardiovascular risk in dialysis patients: a comparison of risk factors and cardioprotective therapy between 1996 and 2001. *Nephrology*. 2003;8(4):177-83.
43. Foley RN, Herzog CA, Collins AJ. Smoking and cardiovascular outcomes in dialysis patients: the United States Renal Data System Wave 2 study. *Kidney international*. 2003;63(4):1462-7.
44. Biesenbach G, Zazgornik J. Influence of smoking on the survival rate of diabetic patients requiring hemodialysis. *Diabetes care*. 1996;19(6):625-8.
45. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, Adda H, Pannier B. Inflammation, arteriosclerosis, and cardiovascular therapy in hemodialysis patients. *Kidney international Supplement*. 2003(84):S88-93.
46. Stack AG, Saran R. Clinical correlates and mortality impact of left ventricular hypertrophy among new ESRD patients in the United States. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2002;40(6):1202-10.
47. Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Predicting coronary heart disease in renal transplant recipients: a prospective study. *Kidney international*. 2004;66(1):441-7.
48. Cosio FG, Alamir A, Yim S, Pesavento TE, Falkenhain ME, Henry ML, et al. Patient survival after renal transplantation: I. The impact of dialysis pre-transplant. *Kidney international*. 1998;53(3):767-72.
49. Hegeman RL, Hunsicker LG. Chronic rejection in renal allografts: importance of cardiovascular risk factors. *Clinical transplantation*. 1995;9(2):135-9.
50. Jardine AG, McLaughlin K. Cardiovascular complications of renal disease. *Heart*. 2001;86(4):459-66.

51. Zager PG, Nikolic J, Brown RH, Campbell MA, Hunt WC, Peterson D, et al. "U" curve association of blood pressure and mortality in hemodialysis patients. *Medical Directors of Dialysis Clinic, Inc. Kidney international*. 1998;54(2):561-9.
52. Paul LC. Treatment of posttransplant hypertension: too little, too late? *Transplantation*. 2003;76(11):1645-6.
53. Miller LW. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002;2(9):807-18.
54. First MR, Neylan JF, Rocher LL, Tejani A. Hypertension after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 1994;4(8 Suppl):S30-6.
55. Kasiske BL, Anjum S, Shah R, Skogen J, Kandaswamy C, Danielson B, et al. Hypertension after kidney transplantation. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2004;43(6):1071-81.
56. Radermacher J, Meiners M, Bramlage C, Kliem V, Behrend M, Schlitt HJ, et al. Pronounced renal vasoconstriction and systemic hypertension in renal transplant patients treated with cyclosporin A versus FK 506. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1998;11(1):3-10.
57. Kasiske BL. Hyperlipidemia in patients with chronic renal disease. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 1998;32(5 Suppl 3):S142-56.
58. Prichard SS. Impact of dyslipidemia in end-stage renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2003;14(9 Suppl 4):S315-20.
59. Fernandez Fresnedo G, Rodrigo E, Escallada R, Cotorruelo JG, Ruiz JC, Zubimendi JA, et al. [Cardiovascular risk factors in renal transplantation: clinical markers]. *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2002;22 Suppl 4:27-34.
60. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney international*. 2001;59(1):3-16.
61. Smak Gregoor PJ, de Sevaux RG, Ligtenberg G, Hoitsma AJ, Hene RJ, Weimar W, et al. Withdrawal of cyclosporine or prednisone six months after kidney transplantation in patients on triple drug therapy: a randomized, prospective, multicenter study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(5):1365-73.
62. Holdaas H, Fellstrom B, Jardine AG, Group AS. Clinical practice guidelines for managing dyslipidemias in kidney transplant patients: lessons to be learnt from the assessment of Lescol in renal transplantation (ALERT) trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(6):1574-5.

63. Massy ZA, Kasiske BL. Post-transplant hyperlipidemia: mechanisms and management. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 1996;7(7):971-7.
64. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. *Transplantation*. 2002;73(1):70-4.
65. Meier-Kriesche HU, Vaghela M, Thambuganipalle R, Friedman G, Jacobs M, Kaplan B. The effect of body mass index on long-term renal allograft survival. *Transplantation*. 1999;68(9):1294-7.
66. Montero RM, Covic A, Gnudi L, Goldsmith D. Diabetic nephropathy: What does the future hold? *International urology and nephrology*. 2016;48(1):99-113.
67. Ghisdal L, Van Laecke S, Abramowicz MJ, Vanholder R, Abramowicz D. New-onset diabetes after renal transplantation: risk assessment and management. *Diabetes care*. 2012;35(1):181-8.
68. Wauters RP, Cosio FG, Suarez Fernandez ML, Kudva Y, Shah P, Torres VE. Cardiovascular consequences of new-onset hyperglycemia after kidney transplantation. *Transplantation*. 2012;94(4):377-82.
69. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine*. 1999;341(15):1097-105.
70. Whaley-Connell A, Sowers JR. Obesity and kidney disease: from population to basic science and the search for new therapeutic targets. *Kidney international*. 2017;92(2):313-23.
71. Garofalo C, Borrelli S, Minutolo R, Chiodini P, De Nicola L, Conte G. A systematic review and meta-analysis suggests obesity predicts onset of chronic kidney disease in the general population. *Kidney international*. 2017;91(5):1224-35.
72. Metivier F, Marchais SJ, Guerin AP, Pannier B, London GM. Pathophysiology of anaemia: focus on the heart and blood vessels. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2000;15 Suppl 3:14-8.
73. Fellner SK, Lang RM, Neumann A, Korcarz C, Borow KM. Cardiovascular consequences of correction of the anemia of renal failure with erythropoietin. *Kidney international*. 1993;44(6):1309-15.
74. Jones H, Talwar M, Nogueira JM, Ugarte R, Cangro C, Rasheed H, et al. Anemia after kidney transplantation; its prevalence, risk factors, and independent association with graft and patient survival: a time-varying analysis. *Transplantation*. 2012;93(9):923-8.
75. Rostand SG, Drueke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney international*. 1999;56(2):383-92.

76. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney international Supplement*. 2009(113):S1-130.
77. Leinig CE, Moraes T, Ribeiro S, Riella MC, Olandoski M, Martins C, et al. Predictive value of malnutrition markers for mortality in peritoneal dialysis patients. *Journal of renal nutrition: the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2011;21(2):176-83.
78. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD. Relative contributions of nutrition and inflammation to clinical outcome in dialysis patients. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2001;38(6):1343-50.
79. Roodnat JJ, Mulder PG, Rischen-Vos J, van Riemsdijk IC, van Gelder T, Zietse R, et al. Proteinuria after renal transplantation affects not only graft survival but also patient survival. *Transplantation*. 2001;72(3):438-44.
80. Bradbury BD, Fissell RB, Albert JM, Anthony MS, Critchlow CW, Pisoni RL, et al. Predictors of early mortality among incident US hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*. 2007;2(1):89-99.
81. Weinhandl ED, Gilbertson DT, Collins AJ. Mortality, Hospitalization, and Technique Failure in Daily Home Hemodialysis and Matched Peritoneal Dialysis Patients: A Matched Cohort Study. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2016;67(1):98-110.
82. Jardine AG, Fellstrom B, Logan JO, Cole E, Nyberg G, Gronhagen-Riska C, et al. Cardiovascular risk and renal transplantation: post hoc analyses of the Assessment of Lescol in Renal Transplantation (ALERT) Study. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2005;46(3):529-36.
83. Kasiske BL. Epidemiology of cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplantation*. 2001;72(6 Suppl):S5-8.
84. Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB, Sr., Levy D, Murabito JM, Wang TJ, et al. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *Jama*. 2004;291(18):2204-11.
85. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, et al. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney international*. 2000;58(1):353-62.
86. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A, et al. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2002;13(7):1918-27.

87. Roberts MA, Hare DL, Ratnaik S, Ierino FL. Cardiovascular biomarkers in CKD: pathophysiology and implications for clinical management of cardiac disease. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2006;48(3):341-60.
88. Holdt LM, Teupser D. From genotype to phenotype in human atherosclerosis--recent findings. *Current opinion in lipidology*. 2013;24(5):410-8.
89. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(3):155-9.
90. Congrains A, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H. ANRIL: molecular mechanisms and implications in human health. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(1):1278-92.
91. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet JL, Geddes BJ, DiStefano PS, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(16):13952-8.
92. Roberts RL, Topless RK, Phipps-Green AJ, Geary RB, Barclay ML, Merriman TR. Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. *Genes and immunity*. 2010;11(4):351-6.
93. Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. *PLoS genetics*. 2010;6(4):e1000899.
94. Holdt LM, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(2):196-206.
95. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316(5830):1491-3.
96. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316(5830):1488-91.
97. Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
98. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2007;357(5):443-53.
99. Dutta A, Henley W, Lang IA, Murray A, Guralnik J, Wallace RB, et al. The coronary artery disease-associated 9p21 variant and later life 20-year survival to cohort extinction. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2011;4(5):542-8.

100. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gabel G, Bergert H, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(3):620-7.
101. Smith JG, Melander O, Lovkvist H, Hedblad B, Engstrom G, Nilsson P, et al. Common genetic variants on chromosome 9p21 confers risk of ischemic stroke: a large-scale genetic association study. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2009;2(2):159-64.
102. Foroud T, Koller DL, Lai D, Sauerbeck L, Anderson C, Ko N, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysms confirms role of Anril and SOX17 in disease risk. *Stroke*. 2012;43(11):2846-52.
103. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Human molecular genetics*. 2008;17(6):806-14.
104. IGSR: The International Genome Sample Resource. <http://www.internationalgenome.org/>. (Accès: 2018-07-18).
105. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdóttir S, Steinthorsdóttir V, Manolescu A, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nature genetics*. 2008;40(2):217-24.
106. Shen GQ, Rao S, Martinelli N, Li L, Olivieri O, Corrocher R, et al. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *Journal of human genetics*. 2008;53(2):144-50.
107. Koch W, Turk S, Erl A, Hoppmann P, Pfeufer A, King L, et al. The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population. *Atherosclerosis*. 2011;217(1):220-6.
108. Shen GQ, Li L, Rao S, Abdullah KG, Ban JM, Lee BS, et al. Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for development of coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(2):360-5.
109. Abdullah KG, Li L, Shen GQ, Hu Y, Yang Y, MacKinlay KG, et al. Four SNPs on chromosome 9p21 confer risk to premature, familial CAD and MI in an American Caucasian population (GeneQuest). *Annals of human genetics*. 2008;72(Pt 5):654-7.
110. Anderson CD, Biffi A, Rost NS, Cortellini L, Furie KL, Rosand J. Chromosome 9p21 in ischemic stroke: population structure and meta-analysis. *Stroke*. 2010;41(6):1123-31.
111. Ni X, Zhang J. Association between 9p21 genomic markers and ischemic stroke risk: evidence based on 21 studies. *PloS one*. 2014;9(3):e90255.

112. Lemmens R, Abboud S, Robberecht W, Vanhees L, Pandolfo M, Thijs V, et al. Variant on 9p21 strongly associates with coronary heart disease, but lacks association with common stroke. *European journal of human genetics: EJHG*. 2009;17(10):1287-93.
113. Ding H, Xu Y, Wang X, Wang Q, Zhang L, Tu Y, et al. 9p21 is a shared susceptibility locus strongly for coronary artery disease and weakly for ischemic stroke in Chinese Han population. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2009;2(4):338-46.
114. Assimes TL, Knowles JW, Basu A, Iribarren C, Southwick A, Tang H, et al. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Human molecular genetics*. 2008;17(15):2320-8.
115. Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature*. 2011;470(7333):264-8.
116. McLaren JE, Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20(2):125-35.
117. Coccia EM, Del Russo N, Stellacci E, Testa U, Marziali G, Battistini A. STAT1 activation during monocyte to macrophage maturation: role of adhesion molecules. *International immunology*. 1999;11(7):1075-83.
118. Myocardial Infarction Genetics C, Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*. 2009;41(3):334-41.
119. Qi L, Ma J, Qi Q, Hartiala J, Allayee H, Campos H. Genetic risk score and risk of myocardial infarction in Hispanics. *Circulation*. 2011;123(4):374-80.
120. Szpakowicz A, Kiliszek M, Pepinski W, Waszkiewicz E, Franaszczyk M, Skawronska M, et al. Polymorphism of 9p21.3 locus is associated with 5-year survival in high-risk patients with myocardial infarction. *PloS one*. 2014;9(8):e104635.
121. Lovkvist H, Sjogren M, Hoggund P, Engstrom G, Jern C, Olsson S, et al. Are 25 SNPs from the CARDIoGRAM study associated with ischaemic stroke? *European journal of neurology*. 2013;20(9):1284-91.
122. Vargas JD, Manichaikul A, Wang XQ, Rich SS, Rotter JI, Post WS, et al. Common genetic variants and subclinical atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2016;245:230-6.
123. Paynter NP, Chasman DI, Buring JE, Shiffman D, Cook NR, Ridker PM. Cardiovascular disease risk prediction with and without knowledge of genetic variation at chromosome 9p21.3. *Annals of internal medicine*. 2009;150(2):65-72.

124. Zhang Q, Wang XF, Cheng SS, Wan XH, Cao FF, Li L, et al. Three SNPs on chromosome 9p21 confer increased risk of myocardial infarction in Chinese subjects. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):26-8.
125. Chen Y, Li G, Fan H, Guo S, Li R, Yin J, et al. CDKN2BAS gene polymorphisms and the risk of intracranial aneurysm in the Chinese population. *BMC neurology*. 2017;17(1):214.
126. Liu KY, Muehlschlegel JD, Perry TE, Fox AA, Collard CD, Body SC, et al. Common genetic variants on chromosome 9p21 predict perioperative myocardial injury after coronary artery bypass graft surgery. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2010;139(2):483-8, 8 e1-2.
127. Bagnall RD, Roberts RG, Mirza MM, Torigoe T, Prescott NJ, Mathew CG. Novel isoforms of the CARD8 (TUCAN) gene evade a nonsense mutation. *European journal of human genetics: EJHG*. 2008;16(5):619-25.
128. Garcia-Bermudez M, Lopez-Mejias R, Gonzalez-Juanatey C, Corrales A, Castaneda S, Ortiz AM, et al. CARD8 rs2043211 (p.C10X) polymorphism is not associated with disease susceptibility or cardiovascular events in Spanish rheumatoid arthritis patients. *DNA and cell biology*. 2013;32(1):28-33.
129. Vasseur F, Sendid B, Broly F, Gower-Rousseau C, Sarazin A, Standaert-Vitse A, et al. The CARD8 p.C10X mutation associates with a low anti-glycans antibody response in patients with Crohn's disease. *BMC medical genetics*. 2013;14:35.
130. Yang SK, Kim H, Hong M, Lim J, Choi E, Ye BD, et al. Association of CARD8 with inflammatory bowel disease in Koreans. *Journal of human genetics*. 2011;56(3):217-23.
131. Kastbom A, Johansson M, Verma D, Soderkvist P, Rantapaa-Dahlqvist S. CARD8 p.C10X polymorphism is associated with inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(4):723-6.
132. Fontalba A, Gutierrez O, Llorca J, Mateo I, Berciano J, Fernandez-Luna JL, et al. Deficiency of CARD8 is associated with increased Alzheimer's disease risk in women. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2008;26(3):247-50.
133. Paramel GV, Folkersen L, Strawbridge RJ, Elmabsout AA, Sarndahl E, Lundman P, et al. CARD8 gene encoding a protein of innate immunity is expressed in human atherosclerosis and associated with markers of inflammation. *Clinical science*. 2013;125(8):401-7.
134. Zhang K, Song W, Li D, Yan J, Chen Y, Qi H, et al. The Association between Polymorphism of CARD8 rs2043211 and Susceptibility to Arteriosclerosis Obliterans in Chinese Han Male Population. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2017;41(1):173-80.
135. Bai Y, Nie S, Jiang G, Zhou Y, Zhou M, Zhao Y, et al. Regulation of CARD8 expression by ANRIL and association of CARD8 single nucleotide polymorphism rs2043211 (p.C10X) with ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45(2):383-8.

136. Roberts RL, Van Rij AM, Phillips LV, Young S, McCormick SP, Merriman TR, et al. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2011;218(1):123-6.
137. Melk A, Schildhorn C, Homme M, Knoch M, Schmidt BM, Serth J, et al. Association of single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21.3 with cardiovascular death in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2013;95(7):928-32.
138. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
139. Tonelli M, Wiebe N, Culeton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):2034-47.
140. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316(5830):1491-3.
141. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
142. Chen HH, Almontashiri NA, Antoine D, Stewart AF. Functional genomics of the 9p21.3 locus for atherosclerosis: clarity or confusion? *Current cardiology reports*. 2014;16(7):502.
143. Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, et al. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):449-55.
144. Tsai PC, Liao YC, Lin TH, Hsi E, Yang YH, Juo SH. Additive effect of ANRIL and BRAP polymorphisms on ankle-brachial index in a Taiwanese population. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2012;76(2):446-52.
145. Do R, Xie C, Zhang X, Mannisto S, Harald K, Islam S, et al. The effect of chromosome 9p21 variants on cardiovascular disease may be modified by dietary intake: evidence from a case/control and a prospective study. *PLoS medicine*. 2011;8(10):e1001106.
146. National Kidney F. KDOQI Clinical Practice Guideline for Hemodialysis Adequacy: 2015 update. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2015;66(5):884-930.
147. Diabetes mellitus: a major risk factor for cardiovascular disease. A joint editorial statement by the American Diabetes Association; The National Heart, Lung, and Blood Institute; The Juvenile Diabetes Foundation International; The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; and The American Heart Association. *Circulation*. 1999;100(10):1132-3.

148. Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet.* 2009;41(3):334-41.
149. 2014 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2014.
150. Chen G, Fu X, Wang G, Liu G, Bai X. Genetic Variant rs10757278 on Chromosome 9p21 Contributes to Myocardial Infarction Susceptibility. *International journal of molecular sciences.* 2015;16(5):11678-88.
151. Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, et al. Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *PLoS genetics.* 2013;9(7):e1003588.
152. Weiner DE, Carpenter MA, Levey AS, Ivanova A, Cole EH, Hunsicker L, et al. Kidney function and risk of cardiovascular disease and mortality in kidney transplant recipients: the FAVORIT trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2012;12(9):2437-45.
153. Rostaing L, Cantarovich D, Mourad G, Budde K, Rigotti P, Mariat C, et al. Corticosteroid-free immunosuppression with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and daclizumab induction in renal transplantation. *Transplantation.* 2005;79(7):807-14.
154. Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, et al. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2007;7(6):1506-14.
155. Zhou D, Wang X, Chen T, Wen W, Liu Y, Wu Y, et al. The NLRP3 rs10754558 Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Prognosis of Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population. *BioMed research international.* 2016;2016:3185397.





VIII. ANNEX





ANNEX 1

Arbiol-Roca A, Padró-Miquel A, Hueso M, Navarro E, Alía-Ramos P, González-Álvarez MT, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM, Lloberas N.

Data on genotypic distribution and linkage disequilibrium of several *ANRIL* polymorphisms in hemodialysis patients.

Data Brief. 2017;11:221-4.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib

Data Article

Data on genotypic distribution and linkage disequilibrium of several ANRIL polymorphisms in hemodialysis patients



A. Arbiol-Roca^a, A. Padró-Miquel^a, M. Hueso^b, E. Navarro^c,
 P. Alía-Ramos^a, M.T. González-Álvarez^b, I. Rama^b, J. Torras^b,
 J.M. Grinyó^b, J.M. Cruzado^b, N. Lloberas^{b,*}

^a Biochemistry Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^b Nephrology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^c Molecular Oncology Laboratory, IDIBELL, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2016

Received in revised form

20 January 2017

Accepted 6 February 2017

Available online 12 February 2017

Keywords:

ANRIL

Polymorphisms

Linkage disequilibrium

Hemodialysis

ABSTRACT

A long non-coding RNA called ANRIL located on chromosome 9p21.3 has been identified as a novel genetic factor associated with cardiovascular disease. Investigation of several single nucleotide polymorphisms (SNPs) of Noncoding Antisense RNA in the INK4 Locus (ANRIL) gene are of particular interest. This article reports data related to the research article entitled: "Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients" (Arbiol-Roca et al. [1]). Data presented show the genotypic distribution of four selected ANRIL SNPs: rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606 in a cohort constituted by 284 hemodialysis patients. This article analyzes the Hardy-Weinberg disequilibrium of each studied SNP, and the linkage disequilibrium between them.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.029>

* Corresponding author.

E-mail address: nlloberas@ub.edu (N. Lloberas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2017.02.011>

2352-3409/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Specifications Table

Subject area	Genetics
More specific subject area	Molecular genetics, hemodialysis research
Type of data	Tables and figure
How data was acquired	7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems (ThermoFisher, USA)), SDS 2.3 software (Applied Biosystems, ThermoFisher, USA), STATA 12.0 software and Haploview software (Broad Institute, USA)
Data format	Analyzed
Experimental factors	Genomic DNA was extracted from whole blood samples
Experimental features	Genotyping of four SNPs was carried out using real time PCR with TaqMan validated probes (Foster City, CA)
Data source location	Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
Data accessibility	The data is available within this article

Value of the data

- This dataset provides several ANRIL SNPs frequencies in an hemodialysis cohort of patients.
- The selected SNPs rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606 follow the Hardy-Weinberg equilibrium and are in linkage disequilibrium.
- rs10757278 ANRIL SNP can be a representative SNP of a strong linkage disequilibrium block that showed significant genotypic association with major adverse cardiovascular events in patients on hemodialysis [1].
- Our data can provide some insight into ANRIL haplotype patterns.

1. Data

Table 1 describes genotypic frequencies regarding several ANRIL SNPs in an hemodialysis cohort of patients together with the corresponding Hardy-Weinberg p-values.

Table 2 summarizes the main statistical parameters in the linkage disequilibrium analysis and Fig. 1 illustrates the Haploview linkage disequilibrium plot.

2. Experimental design, materials and methods

2.1. Sample collection and genomic DNA extraction

This research was designed to be an observational follow-up study. Two hundred and eighty four chronic kidney patients that started on hemodialysis were collected from Bellvitge University Hospital. The study protocol was approved by the local Ethics Committee and informed written consent was obtained from all recruited subjects. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of patients using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Sydney, Australia) and was stored at -80°C until analysis

2.2. DNA genotyping

Genotyping of the SNPs (rs10757278, rs4977574, rs10757274 and rs6475606) was carried out with real-time PCR using TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in

Table 1
Genotype distributions of the polymorphisms (%) and *P* Hardy-Weinberg disequilibrium test.

			<i>P</i> Hardy-Weinberg
rs10757278 A/G			
AA	AG	GG	0.64
23	53	24	
rs4977574 A/G			
AA	AG	GG	0.85
24	48	28	
rs10757274 A/G			
AA	AG	GG	0.98
24	49	27	
rs6475606 C/T			
CC	CT	TT	0.97
20	49	31	

P value for Fisher's exact test (Hardy-Weinberg disequilibrium test).

Table 2
Linkage disequilibrium of investigated SNPs.

SNP1	SNP2	<i>D'</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>
rs10757278	rs4977574	0,94	0,82	< 0,0001
rs10757278	rs10757274	0,91	0,79	< 0,0001
rs10757278	rs6475606	0,89	0,65	< 0,0001
rs4977574	rs10757274	0,99	0,96	< 0,0001
rs4977574	rs6475606	0,96	0,79	< 0,0001
rs10757274	rs6475606	0,96	0,79	< 0,0001

SNP: single nucleotide polymorphism, *D'* coefficient of linkage disequilibrium normalized, *r*² correlation coefficient, *P* value pairwise comparison test.

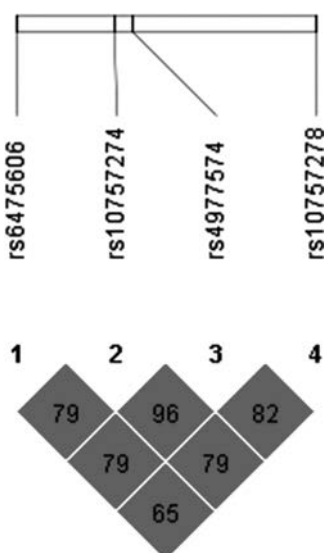


Fig. 1. Linkage disequilibrium plot generated by Haploview software showing *r*² values within diamonds for selected ANRIL SNPs examined in hemodialysis patients. Significant combined *P* values are highlighted in dark grey.

384-well plates that included positive and negative controls. TaqMan PCR and genotyping analyses were carried out on the 7900HT Fast Real-time PCR System, Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. The SDS 2.3 software (Applied Biosystems, ThermoFisher, USA) was used for allelic discrimination.

Allele frequency distribution was tested for Hardy-Weinberg equilibrium (Table 1) using *P* value of the Fisher's exact test:

Haploview software was used to verify the linkage disequilibrium pattern and for deducing the haplotype [2] (Table 2 and Fig. 1).

Acknowledgements

Nuria Lloberas is a researcher from ISCIII Miguel Servet (CP06/00067) and REDinREN RD12/0021/003. Ariadna Arbiol enjoys a post residence grant from Fundación José Luis Castaño. This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III and Ministerio de Sanidad y Consumo (PI12/01564 and PI15/00871), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Transparency document. Supporting information

Transparency data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2017.02.011>.

References

- [1] A. Arbiol-Roca, A. Padró-Miquel, M. Hueso, E. Navarro, P. Alía-Ramos, M.T. González-Álvarez, I. Rama, J. Torras, J.M. Grinyó, J.M. Cruzado, N. Lloberas, Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients, *Clin. Chim. Acta* (2017 2), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.029>.
- [2] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, et al., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, *Bioinformatics* 21 (2005) 263–265.



ANNEX 2

Models de regressió univariants de Cox d'episodis cardiovasculars en pacients trasplantats

	<i>HR</i>	(95 % IC)	<i>P</i>
<i>ANRIL</i> rs10757278 (GG)	2.65	(1.54-4.58)	<0.0001
<i>CARD8</i> rs2043211 (AA)	1.32	(0.76-2.30)	0.326
Sexe receptor (home vs dona)	0.85	(0.47-1.53)	0.596
Edat receptor (anys)	1.06	(1.03-1.09)	<0.0001
IMC (kg/m ²)	1.10	(1.03-1.17)	0.004
Hipertensió (0: no; 1: sí)	0.99	(0.50-1.96)	0.978
Tabaquisme (0: no; 1: sí)	1.01	(0.67-1.51)	0.981
Temps en diàlisi (years)	1.07	(1.00-1.15)	0.061
Diàlisi (0: no; 1: sí)	0.36	(0.13-1.02)	0.055
Malaltia cardiovascular pre TR (0: no; 1: sí)	6.53	(3.55-12.0)	<0.0001
Sexe donant (home)	0.85	(0.47-1.51)	0.574
Edat donant (anys)	1.01	(1.00-1.03)	0.136
DD/LD	0.59	(0.26-1.35)	0.209
HLA-AB mismatches	1.00	(0.76-1.32)	0.987
HLA-DR mismatches	1.43	(0.89-2.30)	0.139
Temps isquèmia freda (min)	1.01	(0.97-1.05)	0.591
Necrosi tubular aguda (0: no; 1: sí)	0.79	(0.39-1.58)	0.502
Rebuig agut (0: no; 1: sí)	0.89	(0.43-1.85)	0.748
Colesterol (mmol/L)	0.97	(0.74-1.28)	0.850
VFG CKD-EPI als 3 mesos (mL/min/1.73 m ²)	0.98	(0.97-1.00)	0.022
Proteïnúria 1r any (g/L)	1.06	(0.87-1.29)	0.581
Diabetis Mellitus (0: no; 1: sí)	2.97	(1.69-5.24)	<0.0001

El SNP ha estat introduït en el model com homozigot per l'al·lel de risc (GG) i comparat amb els portadors de l'al·lel protector (AA o AG). Valors

de *P* estadísticament significatius es troben en negreta.

DD, donant mort; HLA, *Human Leukocyte Antigen*; HR, *hazard ratio*; IC, interval de confiança; IMC, índex massa corporal; LD, donant viu; TR, trasplantament de ronyó; VFG, velocitat filtrat glomerular; .



