

LA GENETICA PER INDIVIDUARE IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE. POSSIAMO ANDARE OLTRE I FATTORI DI RISCHIO?

M.F. Notarangelo, F. Bontardelli*, P.A. Merlini°*

* Unità Operativa di Cardiologia,
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.
° Cardiologia IV, Dipartimento Cardiovascolare "A. De Gasperis",
A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano.

La cardiopatia ischemica, principale causa di mortalità e morbilità nei paesi industrializzati, è una patologia ad eziologia multifattoriale, derivante cioè dall'interazione tra fattori di rischio ambientali e genetici. Negli ultimi anni si è assistito a numerose innovazioni scientifiche e tecnologiche in campo genetico. In particolare, il completamento del progetto Genoma Umano e dell'International Hap Map Project ha consentito di ottenere una grande quantità di informazioni relative al DNA umano e alla variabilità tra individui^{1,2}. Inoltre, è divenuto possibile produrre, a costi contenuti, piattaforme in grado di analizzare contemporaneamente milioni di varianti genetiche provenienti da un singolo campione di DNA. In questo modo, per la prima volta nell'ambito delle patologie complesse, è stato possibile ottenere risultati, finalmente riproducibili, relativi alla componente genetica di tali patologie. Questi dati, sicuramente utili per una miglior comprensione della patogenesi di tali malattie, possono essere utilizzati anche per la stratificazione del rischio e la guida alla terapia più giusta per il singolo individuo, possedendo l'enorme potenziale di essere trasferibili dal laboratorio di ricerca al letto del malato.

La lunga strada della genetica cardiovascolare: dal gene candidato all'approccio genome-wide

Negli ultimi dieci anni sono stati effettuati numerosi tentativi volti ad identificare le varianti genetiche correlate alla cardiopatia ischemica e all'infarto miocardico in particolare.

Più di 5.000 studi, utilizzando l'approccio del gene candidato e le analisi di linkage, hanno analizzato la possibile associazione tra circa 300 varianti genetiche e il rischio di cardiopatia ischemica. Tuttavia, i risultati derivanti da questi studi sono stati di scarso rilievo clinico, in quanto le varianti genetiche

analizzate spiegavano solo una minima parte (<1%) dei casi di malattia e soprattutto non hanno prodotto risultati riproducibili³. In effetti, tale tipologia di studio è gravata da limiti potenziali che possono essere responsabili della scarsa applicabilità clinica dei risultati ottenuti. In primo luogo, la restrizione dell'analisi di associazione ad una singola o a pochissime varianti genetiche non consente l'identificazione di nuovi geni correlati alla patologia in studio, in quanto i risultati sono influenzati dalla scelta del ricercatore di testare determinate varianti ritenute causative. In secondo luogo, tali studi sono stati eseguiti solitamente su campioni di piccole dimensioni, con un conseguente elevato rischio di ottenere risultati falsamente positivi e, non da ultimo, va ricordato il possibile bias di pubblicazione relativo ai risultati positivi⁴.

In effetti, la patogenesi della cardiopatia ischemica è estremamente complessa da un punto di vista molecolare, essendo il risultato di multiple interazioni tra geni diversi e fattori di rischio ambientali, che creano un gradiente di suscettibilità genetica a tale patologia.

Recentemente, una nuova metodica di analisi genomica, chiamata "genome-wide association study" ha consentito di identificare una serie di loci genici associati al rischio di infarto miocardico in maniera significativa e riproducibile. Tale metodica, partendo dalla mappatura del genoma umano ed in particolare dalla mappa degli aplotipi (Haplotype Map), che individua le varianti genetiche (single nucleotide polymorphism, SNP) più frequentemente e stabilmente presenti nel genoma umano, utilizzando chip che permettono di analizzare sino ad 2.000.000 SNPs per ogni individuo, è in grado di individuare piccole regioni del DNA che massimamente si differenziano tra i sani ed i malati. Tuttavia, questi SNPs massimamente diversi tra sani e malati non necessariamente costituiscono essi stessi le sequenze genetiche che causano la malattia, ma, piuttosto, sono sequenze nucleotidiche ubicate in vicinanza o all'interno della regione genetica che determina la malattia.

Tale approccio di analisi genetica, inoltre, è indipendente da qualsiasi ipotesi aprioristica, consentendo l'identificazione di comuni varianti genetiche associate ad una determinata patologia la cui funzione non è ancora nota. In questo modo tali studi possono essere considerati un utile strumento per migliorare la conoscenza dei meccanismi patogenetici della malattia.

La regione genica 9p21.3

Nel 2007 quattro studi genome-wide, tra loro indipendenti, hanno documentato, pressoché contemporaneamente, l'associazione fra alcune varianti genetiche ubicate in linkage disequilibrium tra loro nella regione cromosomica 9p21.3 e lo sviluppo di cardiopatia ischemica⁵⁻⁸. Questi dati, per la prima volta in quest'ambito, sono stati replicati in varie coorti di differente origine etnica a conferma della solidità dei risultati ottenuti⁹⁻¹⁴. Inoltre, essi sono stati validati in una recente metanalisi, eseguita su 12.000 casi e 29.000 controlli, in cui viene riportato un rischio relativo per cardiopatia ischemica pari a 1.27 (95% CI 1.23-1.31; $p=1.62$)¹⁰⁻¹², per la presenza di ogni allele di rischio¹⁵. Ciò significa che gli individui omozigoti portatori di entrambi gli alleli di rischio presentano un incremento del rischio del 60%, se confrontati con gli individui wild type, che, invece, non sono portatori degli alleli di rischio¹⁶. Inoltre, le varianti genetiche localizzate nella regione cromosomica 9p21.3 sono molto

frequenti nella popolazione europea: è stato infatti riportato che circa il 75% di questa popolazione è portatrice di almeno un allele di rischio. Tenendo in considerazione questi dati, è facile intuire che queste varianti genetiche hanno quindi un'elevata probabilità di contribuire all'epidemiologia dell'infarto miocardico stesso ¹⁶.

Attualmente, non è noto il meccanismo con cui le varianti genetiche della regione cromosomica 9p21.3 influenzano il rischio di infarto miocardico e nessuno SNP è risultato essere associato ai tradizionali fattori di rischio. Dati indiretti suggeriscono che le varianti genetiche localizzate sul cromosoma 9 agiscono promuovendo lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi coronarica. Horne et al. ¹³, studiando l'incidenza di infarto miocardico in una coorte prospettica di pazienti con cardiopatia ischemica, non hanno rilevato alcuna associazione tra le suddette varianti genetiche e l'incidenza di trombosi acuta, suggerendo la possibilità che queste varianti influenzino piuttosto l'aterosclerosi coronarica e non gli eventi trombotici acuti o l'instabilizzazione di placca. Tali varianti sono risultate essere associate, inoltre, anche al calcium score, alla presenza di aterosclerosi prematura severa, alla prevalenza di coronaropatia valutata mediante angiografia coronarica e alla progressione dell'aterosclerosi carotidea ^{14,17-19}. Tali dati coincidono anche con i risultati dello "Studio Genetico Italiano nell'Infarto Miocardico Giovanile", condotto in circa 125 Unità Coronariche italiane, che ha dimostrato un'associazione significativa tra la variante genetica rs1333040, localizzata sul cromosoma 9p21, e la prevalenza di coronaropatia, valutata mediante esame angiografico eseguito al momento dell'ospedalizzazione per l'evento indice, in 1.508 pazienti con infarto miocardico giovanile, che si verifica cioè prima dei 45 anni di età ²⁰. Inoltre, questa variante ha mostrato un'influenza significativa sulla progressione dell'aterosclerosi nei pazienti che hanno ripetuto l'esame angiografico durante i 15 anni di follow-up. La variante rs1333040, infatti, è risultata associata significativamente al rischio di andare incontro a rivascolarizzazione miocardica durante il follow-up, ma non al rischio di re-infarto o di morte ²⁰. È plausibile ipotizzare, pertanto, che la regione cromosomica 9p21 sia coinvolta nei processi che regolano il rimodellamento delle pareti vasali, la proliferazione e la senescenza cellulare.

Ruolo dei marcatori genetici nella predizione del rischio cardiovascolare

Attualmente, sono più di trenta le regioni geniche risultate associate alla cardiopatia ischemica mediante gli studi genome-wide ^{8,21-23}. Sebbene i dati finora esposti siano rilevanti sul piano scientifico, è attualmente lecito domandarsi se questi abbiano anche un risvolto clinico e possano essere utilizzati per la predizione del rischio cardiovascolare.

Diversi studi sono stati condotti per valutare il contributo incrementale delle varianti genetiche localizzate nella regione cromosomica 9p21 alla predizione del rischio cardiovascolare rispetto ai soli fattori di rischio tradizionali ²⁴⁻²⁶. Tuttavia, sebbene questo locus genico risulti consistentemente associato al rischio di cardiopatia ischemica in tutte le popolazioni studiate, l'integrazione delle informazioni genetiche con i fattori di rischio tradizionali non è riuscita a migliorare significativamente la predizione del rischio. L'utilizzo di un singolo marker genetico è risultato quindi poco utile nella pratica clinica.

Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che la cardiopatia ischemica, in quanto malattia multifattoriale, è causata da interazioni multiple di numerose varianti genetiche relativamente comuni, ognuna con un effetto fenotipico modesto, che, interagendo tra loro e con fattori ambientali di rischio, creano un gradiente di suscettibilità genetica alla patologia. Inoltre, è chiaramente emerso che le varianti genetiche identificate mediante gli studi di associazione genome-wide, pur essendo molto comuni, se considerate singolarmente hanno solo un debole effetto sul rischio di sviluppare malattia e riescono a spiegare solo una modesta frazione dell'ereditabilità totale ^{27,28}.

È stato quindi ipotizzato che l'aggregazione di numerosi polimorfismi genetici in un singolo score di rischio, combinando il relativamente debole effetto di ogni variante, potesse essere utile per incrementare la probabilità di predire il rischio di cardiopatia ischemica e infarto miocardico.

Sebbene finora siano stati effettuati numerosi sforzi tesi a costruire score di rischio genetici per la predizione del rischio cardiovascolare, i risultati ottenuti non sono stati univoci e hanno ancora scarso impatto clinico ^{21,29-32}. Infatti, Kathiresan et al. ²⁹ in uno studio hanno riportato che uno score genetico, costituito da nove polimorfismi associati ai livelli di colesterolo, è risultato significativamente associato al rischio di eventi cardiovascolari. Anche se questo score è risultato associato al rischio di malattie cardiovascolari anche dopo l'aggiustamento con i fattori di rischio standard, la sua aggiunta ad un modello di predizione del rischio comprensivo dei fattori di rischio tradizionali non ha incrementato, però, la capacità di predizione. Lo score genetico ha tuttavia consentito la riclassificazione del 26% dei pazienti considerati a rischio cardiovascolare intermedio mediante l'ATP III panel in pazienti a basso o elevato rischio cardiovascolare.

I ricercatori del MIGen Consortium hanno raggruppato nove polimorfismi a singolo nucleotide associati all'infarto miocardico giovanile in uno score di rischio genetico e hanno dimostrato, mediante un'analisi trasversale di tipo caso-controllo, che gli individui collocati nel quintile più alto dello score di rischio genetico presentavano un rischio cardiovascolare due volte superiore rispetto a quelli collocati nel quintile più basso ²¹. Questi risultati devono tuttavia essere considerati preliminari perché tale osservazione non è stata validata in coorti prospettiche di pazienti con infarto miocardico o nel contesto di modelli tradizionali di predizione del rischio. Inoltre, nonostante il contributo cumulativo dei nove polimorfismi considerati, lo score genetico ha giustificato solo il 2.8% della variabilità di rischio interindividuale ²¹.

Il limite potenziale di questo approccio potrebbe essere quello di utilizzare, per la costruzione degli score genetici, polimorfismi che agiscono influenzando i fattori di rischio classici. È stato ipotizzato che le varianti genetiche che non agiscono sui fattori di rischio tradizionali abbiano un impatto clinico maggiore, se utilizzate per la costruzione di uno score di rischio. Tuttavia l'uso di uno score costituito da più di 100 varianti, molte delle quali indipendenti dai fattori di rischio classici, non ha migliorato la predizione del rischio cardiovascolare nella coorte prospettica del Women's Menome Health Study ³².

Come già accennato, un punto molto importante nella valutazione dei marker genetici è la loro valutazione in studi prospettici. Recentemente, Ripatti et al. ³³ hanno esaminato l'associazione tra uno score di rischio genetico multilocus (basato su 13 SNPs associati a malattia coronarica) e il rischio di

cardiopatía ischemica su una coorte prospettica composta da piú di 30.000 individui che non hanno mai avuto infarto del miocardio. Anche se lo score di rischio genetico è risultato associato ad un primo evento, non ha migliorato la previsione del rischio rispetto ai fattori di rischio tradizionali e alla storia familiare, né ha avuto un effetto significativo nel migliorare la riclassificazione.

Ulteriori studi saranno quindi necessari per identificare la combinazione di polimorfismi da inserire in uno score genetico in grado di migliorare la predizione e la stratificazione del rischio rispetto ai fattori di rischio tradizionali. Tali studi dovrebbero essere condotti in popolazioni in cui il peso della componente genetica ed il rischio di eventi siano maggiori, come ad esempio i pazienti con infarto miocardico giovanile o pazienti in prevenzione secondaria.

Solo in questo modo la conoscenza della base genetica dell'infarto miocardico potrà condurre all'ambizioso obiettivo della medicina personalizzata, vale a dire la medicina modulata sulle specifiche caratteristiche biologiche del singolo individuo.

Prospettive future

Negli ultimi anni la ricerca genetica in ambito cardiovascolare ha prodotto risultati sempre piú concreti ed entusiasmanti. Tuttavia, per trasformare le informazioni ottenute in strumenti clinici utili per la predizione del rischio, la prevenzione e la terapia dei pazienti, è necessario investire ulteriori energie al fine di completare lo studio dell'ereditarietà della cardiopatía ischemica.

In effetti, gli studi genome-wide hanno delle limitazioni insite negli assunti di base della stessa metodica. Essa consente di identificare polimorfismi genetici comuni fortemente associati alla patologia in studio, ubicati in vicinanza o all'interno della regione genetica che determina la malattia, ma che non necessariamente causano direttamente la malattia. Poi, proprio perché indipendenti da qualsiasi ipotesi aprioristica, questi studi hanno consentito l'identificazione di varianti genetiche la cui funzione tuttavia non è ancora nota. L'ultimo, e forse piú importante, limite della metodica genome-wide è quello di aver individuato varianti genetiche che riescono a spiegare solo una piccola parte dell'ereditarietà delle patologie complesse. Resta ancora una quota di ereditarietà non spiegata, definita "missing heritability", su cui sarà necessario concentrarsi nei prossimi anni. Anche questo limite è insito negli assunti che sono alla base della metodica di analisi genome-wide. Infatti, essa consente di individuare polimorfismi genetici comuni, ovvero con una frequenza allelica (Minor Allele Frequency, MAF) maggiore del 5%, in quanto è stato ipotizzato che le varianti genetiche associate alle patologie comuni, sebbene singolarmente abbiano un debole effetto sul rischio di malattia, siano anch'esse frequenti nella popolazione. È possibile, tuttavia, che la quota di ereditarietà mancante, derivi da mutazioni di tipo strutturale o da varianti genetiche piú rare, con frequenza allelica minore del 5%, ma dotate di un effetto fenotipico intermedio rispetto a quello delle varianti genetiche mendeliane da una parte e delle varianti genetiche comuni dall'altra³⁴. In ultima analisi, gli studi genome-wide probabilmente rimarranno un efficiente strumento per la ricerca dell'ereditarietà delle patologie complesse, utili per individuare le regioni in cui le varianti piú rare o le varianti strutturali sono raggruppate. Tuttavia, questi dovranno essere completati dal sequenziamento diretto delle regioni che hanno

mostrato una forte associazione con le varianti comuni o dal sequenziamento diretto in popolazioni con fenotipo estremo. Solo in questo modo potranno essere identificate le varianti che realmente causano le patologie complesse e potrà essere definitivamente compresa anche l'ereditarietà alla base della cardiopatia ischemica.

Sulla base di queste considerazioni, è attualmente in corso un progetto di ricerca volto ad identificare nuove varianti genetiche più rare, ma con un impatto clinico più elevato, associate all'infarto miocardico. Nella coorte italiana di 2.000 pazienti con infarto miocardico giovanile e 2.000 controlli, infatti, si utilizzerà una nuova metodica di analisi genetica chiamata "exome chip analysis" che utilizza piattaforme di genotipizzazione in grado di incorporare 250.000 varianti geniche con frequenza allelica compresa tra il 5% e l'1% e quindi più rare di quelle utilizzate nelle analisi genome-wide, per identificare nuove varianti genetiche associate all'infarto miocardico. Tali dati saranno utilizzati per costruire uno score di rischio genetico che sarà validato prospetticamente in popolazioni più ampie al fine di dimostrare che esso può avere un valore incrementale nella predizione del rischio rispetto ai fattori di rischio tradizionali.

BIBLIOGRAFIA

- 1) *A haplotype map of the human genome*. Nature Oct 27 2005; 437(7063):1299-1320
- 2) *Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, et al*. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature Oct 18 2007; 449(7164):851-861
- 3) *Morgan TM, Krumholz HM, Lipton RP, Spertus JA*. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. JAMA Apr 11 2007; 297(14):1551-61
- 4) *Cohen JC*. Genetic Approaches to Coronary Heart Disease. JACC 2006; 48(9s1): A10-A14
- 5) *Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al*. Genomewide association analysis of coronary artery disease. N Engl J Med Aug 2 2007; 357(5):443-453
- 6) *Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al*. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. Science Jun 8 2007; 316(5830):1491-93
- 7) *McPherson R, Pertsemidis A, Kavaslar N, et al*. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. Science Jun 8 2007; 316(5830):1488-91
- 8) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature Jun 7 2007; 447(7145):661-678
- 9) *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(2):144-150
- 10) *Shen GQ, Li L, Rao S, 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. Arterioscler Thromb Vasc Biol Feb 2008; 28(2):360-365
- 11) *Schunkert H, Gotz A, Braund P, et al*. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. Circulation Apr 1 2008; 117(13):1675-84
- 12) *Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, et al*. Replication of the association

- between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J Hum Genet* 2008; 53(4):357-359
- 13) *Horne BD, Carlquist JF, Muhlestein JB, Bair TL, Anderson JL.* Association of variation in the chromosome 9p21 locus with myocardial infarction versus chronic coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* Dec 2008; 1(2):85-92
 - 14) *Assimes TL, Knowles JW, Basu A, et al.* Susceptibility locus for clinical and sub-clinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet* Aug 1 2008; 17(15):2320-28
 - 15) *Palomaki GE, Melillo S, Bradley LA.* Association between 9p21 genomic markers and heart disease: a meta-analysis. *JAMA* Feb 17 2010; 303(7):648-656
 - 16) *Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ.* Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J* Apr 2010; 31(8):918-925
 - 17) *Anderson JL, Horne BD, Kolek MJ, et al.* Genetic variation at the 9p21 locus predicts angiographic coronary artery disease prevalence but not extent and has clinical utility. *Am Heart J* Dec 2008; 156(6):1155-62 e1152
 - 18) *Ye S, Willert J, Kronenberg F, Xu Q, Kiechl S.* Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study. *J Am Coll Cardiol* Jul 29 2008; 52(5):378-384
 - 19) *Muendlein A, Saely CH, Rhomberg S, et al.* Evaluation of the association of genetic variants on the chromosomal loci 9p21.3, 6q25.1, and 2q36.3 with angiographically characterized coronary artery disease. *Atherosclerosis* Jul 2009; 205(1):174-180
 - 20) *Ardissino D, Berzuini C, Merlini PA, et al.* Influence of 9p21.3 genetic variants on clinical and angiographic outcomes in early-onset myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* Jul 19 2011; 58(4):426-434
 - 21) *Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, et al.* Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* Mar 2009; 41(3):334-341
 - 22) *Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, et al.* New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet* Mar 2009; 41(3):280-282
 - 23) *Tregouet DA, König IR, Erdmann J, et al.* Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat Genet* Mar 2009; 41(3):283-285
 - 24) *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. *Ann Intern Med* Jan 20 2009; 150(2):65-72
 - 25) *Brautbar A, Ballantyne CM, Lawson K, et al.* Impact of adding a single allele in the 9p21 locus to traditional risk factors on reclassification of coronary heart disease risk and implications for lipid-modifying therapy in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circ Cardiovasc Genet* Jun 2009; 2(3):279-285
 - 26) *Talmud PJ, Cooper JA, Palmen J, et al.* Chromosome 9p21.3 coronary heart disease locus genotype and prospective risk of CHD in healthy middle-aged men. *Clin Chem* Mar 2008; 54(3):467-474
 - 27) *Manolio TA.* Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *New Engl J Med* 2010; 363(2):166-176
 - 28) *Humphries SE, Drenos F, Ken-Dror G, Talmud PJ.* Coronary heart disease risk prediction in the era of genome-wide association studies: current status and what the future holds. *Circulation* May 25 2010; 121(20):2235-48
 - 29) *Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al.* Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med* Mar 20 2008; 358(12):1240-49
 - 30) *Morrison AC, Bare LA, Chambless LE, et al.* Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* Jul 1 2007; 166(1):28-35

- 31) *Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, et al.* Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* Jan 2009; 41(1):47-55
- 32) *Paynter NP, Chasman DI, Pare G, et al.* Association between a literature-based genetic risk score and cardiovascular events in women. *JAMA* Feb 17 2010; 303(7):631-637
- 33) *Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, et al.* A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet* Oct 23 2010; 376(9750):1393-1400
- 34) *Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* Oct 8 2009; 461(7265):747-753