

Marcatori genetici di rischio cardiovascolare (Rassegna)

Maria Grazia Andreassi, Ilenia Foffa, Samantha Manfredi, Cristina Vassalle
Laboratorio di Genetica e Biologia Cellulare, CNR Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa

INTRODUZIONE

Il progresso della ricerca in campo genetico e la messa appunto di metodi rapidi e affidabili di analisi molecolare rappresentano certamente nuove prospettive per l'applicazione in campo diagnostico e terapeutico. Si può dire, infatti, con le parole del genetista Francis Collins *"che praticamente ogni malattia – a parte forse il trauma- ha una componente genetica, e la sua decodificazione costituisce una priorità della medicina moderna"*¹.

Nel corso degli ultimi anni, la ricerca genetica ha dato risultati per l'applicazione clinica soprattutto sulle malattie cosiddette semplici o mendeliane, che sono determinate dalla mutazione in un singolo gene (per esempio la fibrosi cistica, l'emofilia, la malattia di Huntington). Per i disturbi multifattoriali, la ricerca è più difficile e le applicazioni cliniche in questo settore sono ancora molto poche. A questa categoria appartengono le patologie più frequenti nel mondo occidentale come il cancro, il diabete, le malattie neurodegenerative e un gran numero di patologie del sistema cardiovascolare, inclusi l'infarto, l'aterosclerosi e l'ictus. Una caratteristica comune a tutte le malattie complesse è il fatto di presentare una marcata "familiarità" senza però poter riconoscere una tipologia di trasmissione mendeliana. Classicamente, infatti, in una famiglia di un paziente sono presenti spesso altri casi tra i parenti, senza però identificare caratteristiche riconducibili a una dominanza, o recessività o a un tratto legato al sesso. Un'altra caratteristica importante delle malattie complesse è che esse sono determinate dall'intricata interazione di più geni tra loro e di questi geni con fattori ambientali.²

L'identificazione della componente genetica delle malattie complesse viene unanimemente riconosciuta essere una delle principali sfide della medicina dei prossimi anni. La possibilità di avere test genetici che predicano la suscettibilità al cancro, all'infarto o al morbo di Alzheimer, avrebbe un enorme impatto in termini di salute pubblica. Un'altra delle applicazioni più interessanti delle scoperte di genetica e genomica riguarda la possibilità di identificare i legami tra la costituzione genetica di un individuo e la sua risposta a farmaci somministrati, sia in termini di efficacia sia in termini di tossicità³.

La prospettiva futura è quella di fornire prevenzione e diagnosi attraverso programmi individualizzati basati sul rischio personale (medicina predittiva) e trattamenti più mirati su base individuale (farmacogenetica). Con le parole di McKusick *"la terapia giusta per il paziente giusto"*⁴. La priorità della ricerca genetica è, pertanto, continuare ad investire in questo settore per definire meglio la componente genetica dei caratteri complessi. Uno degli obiettivi principali della ricerca genetica sarà la comprensione del significato della variabilità che si verifica naturalmente nelle sequenze geniche. In particolare, i polimorfismi genici costituiscono la manifestazione più comune della variabilità individuale. L'interpretazione del loro significato è di inte-

resse primario per le terapie farmacologiche e sarà uno dei principali obiettivi della ricerca nei prossimi anni⁵.

La genetica dei tratti complessi: i polimorfismi genetici

Quando si parla di malattie complesse, da un punto di vista genetico si passa dal concetto di mutazione a quello di polimorfismo genico. La mutazione è un evento raro che causa la malattia anche se con possibili variazioni nell'espressione del fenotipo, con frequenze nelle popolazioni inferiori allo 0,05%. Si definisce polimorfismo genico, invece, una variazione genetica con una frequenza superiore all'1% nella popolazione. I polimorfismi genetici possono essere presenti all'interno di regioni codificanti (esoni) o non codificanti (introni) e possono essere determinati da sostituzioni, delezioni o inserzioni di singole basi o di sequenze di DNA. Viene stimato che ogni 300 nucleotidi si manifesti un polimorfismo, il più comune dei quali è associato alla mutazione di un singolo nucleotide (SNP) e circa l'1% di questi non sia silente, ma si traduca in variazioni fenotipiche. In particolare, gli SNPs possono essere responsabili di una modificazione (qualitativa o quantitativa) di proteine con una funzione nota che, se alterata, può spiegare la suscettibilità individuale verso lo sviluppo di una data patologia.

Nel corso degli ultimi anni, la conoscenza del genoma umano ha ampliato enormemente le informazioni sul corredo genetico individuale. Abbiamo appreso come ogni persona dimostri il 99.9% di identità genetica rispetto ad una qualsiasi altra. Il restante 0.1% del nostro DNA rappresenta la variabilità individuale, che è sostanzialmente dovuta alla presenza dei polimorfismi genetici (Fig. 1). Ad oggi, sono stati identificati circa 3 milioni di SNPs, ma si calcola che ve ne siano almeno 10 milioni. E' ormai riconosciuto che gruppi di queste piccole variazioni conferiscono una predisposizione o suscettibilità allo sviluppo della patologia, che, soprattutto, può manifestarsi in età precoce quando profili genetici a rischio "elevato" interagiscono con fattori ambientali o stili di vita considerati ad alto rischio (Fig. 2).

La componente genetica della malattia cardiovascolare

La malattia cardiovascolare, che rimane tuttora la principale causa di morte nei paesi occidentali⁶, è considerata essere una patologia multifattoriale nella quale intervengono influenze ambientali, alcune delle quali ancora sconosciute, e la predisposizione genetica. Il problema della componente genetica del rischio cardiovascolare è particolarmente complesso in quanto modelli sperimentali animali hanno identificato più di 100 geni, che sembrano essere coinvolti nella progressione della malattia⁷. D'altra parte sia i fattori di rischio maggiori, quali l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, il diabete mellito e l'obesità, che i nuovi fatto-

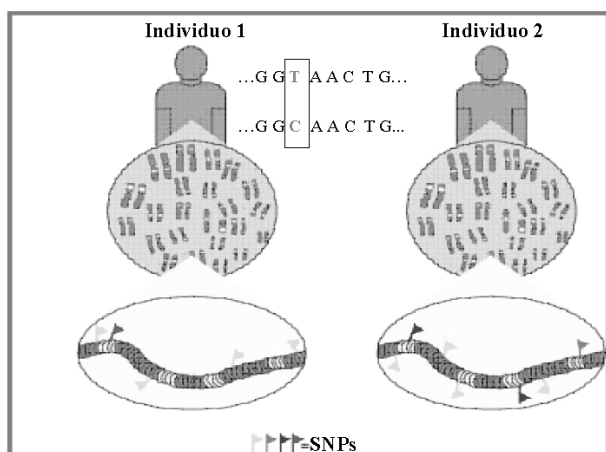


Figura 1
Rappresentazione schematica della variabilità individuale determinata dalla presenza di polimorfismi genetici

ri di rischio indipendenti, quale la proteina C reattiva, il fibrinogeno, l'omocisteina e la lipoproteina(a) hanno una forte componente genetica⁷. Vi è poi da considerare il fatto che i fattori di rischio genetico possono interagire tra loro, moltiplicando così il rischio globale e non semplicemente addizionandosi fra loro. Inoltre, la ricerca ha identificato alcuni sistemi enzimatici regolati geneticamente che possono interferire con il metabolismo dei farmaci⁸. Alcuni di questi interagiscono anche con le molecole utilizzate nel trattamento delle malattie cardiovascolari: i betabloccanti come il metoprololo, gli anticoagulanti come il warfarin, e gli antiipertensivi⁹. I sistemi più studiati sono quelli classicamente considerati coinvolti nella patogenesi della cardiopatia ischemica: metabolismo lipidico, funzione endoteliale, sistema emostatico, metabolismo dell'omocisteina e sistema renina-angiotensina¹⁰.

Comunque, ancora oggi non sono completamente conosciuti i geni che determinano un aumentato rischio di malattia cardiaca ed è ancora indispensabile acquisire ulteriori informazioni prima di ottenere strumenti utilizzabili nella prassi clinica¹¹. Tuttavia, alcuni test genetici di rischio cardiovascolare sono già disponibili in molti laboratori di analisi. Questi servizi sono talvolta forniti senza tener conto di una corretta informazione per i pazienti e, spesso, il loro uso è del tutto inappropriato perché il test è da considerarsi ancora nell'ambito della ricerca o l'esame genetico è consigliabile solo in determinate condizioni^{12,13}. In questo campo, di particolare interesse sono le recenti conoscenze acquisite relative alle mutazioni protrombotiche del Fattore V di Leiden, del fattore II della coagulazione o protrombina e del gene della metilenetetraidrofolato reductasi (MTHFR). Di seguito vengono discusse le conoscenze e le informazioni genetiche acquisite rispetto all'impiego di questi marcatori genetici per la definizione del rischio trombotico.

La valutazione del rischio trombotico

La patologia trombotica, sia arteriosa che venosa, è la più importante causa di malattia e di morte nei paesi occidentali attraverso le sue manifestazioni cliniche di trombosi venosa profonda, embolia polmonare, infarto, ictus e

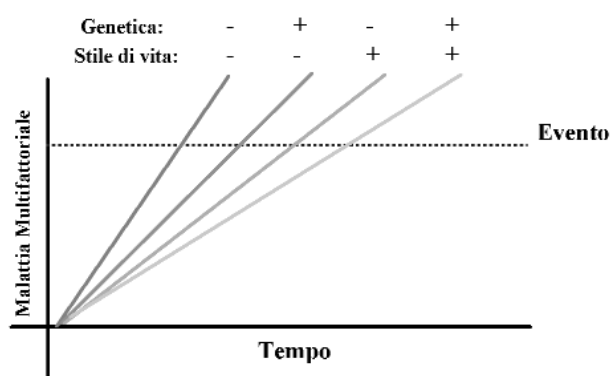


Figura 2
Interazione gene-ambiente nell'insorgenza precoce dell'evento clinico:
- Fattore negativo
+ Fattore positivo

arteriopatia periferica. Lo screening genetico può essere uno strumento diagnostico utile per l'individuazione dei soggetti a rischio e per la prevenzione dei quadri clinici.

Trombosi venosa

La malattia tromboembolica è un processo con eziologia multifactoriale dalla patogenesi complessa che dimostra la tendenza a recidivare. La malattia comprende l'embolia polmonare e la trombosi venosa profonda e nella maggior parte dei casi i pazienti presentano difetti o alterazioni genetiche di uno o più fattori della coagulazione del sangue.

Le prime cause di trombofilia ereditaria identificate sono rappresentate dal deficit congenito di antitrombina III, proteina C e proteina S, che sono i principali fattori anticoagulanti naturali. Comunque, i deficit congeniti di queste proteine anticoagulanti sono condizioni genetiche molto rare e notevolmente eterogenee. Come tali, l'analisi molecolare di antitrombina III, proteina C e proteina S è tecnicamente molto difficile e raramente eseguita nei laboratori clinici, che invece, eseguono di routine la loro misura con metodi immunologici (Tab. 1).

Negli ultimi anni, sono stati identificati alcuni specifici polimorfismi genetici che, invece, sono ben conservati, molto più frequenti nella popolazione generale e la cui analisi può essere utile nella definizione del rischio trombotico (Tab. 2). I geni in considerazione sono quelli relativi al fattore V di Leiden, al fattore II della coagulazione o protrombina ed il gene della MTHFR.

La variante Leiden del Fattore V (G1691A)

Il fattore V attivato è un cofattore essenziale per l'attivazione della protrombina (fattore II) a trombina. Il suo effetto pro-coagulante è normalmente inibito dalla Proteina C attivata, che taglia il fattore V in tre parti.

Nel 1994 è stata identificata una mutazione puntiforme (nucleotide G1691A) nel gene che codifica per il fattore V, che determina una sostituzione aminoacidica (sostituzione dell'aminoacido arginina con una glutammina) in uno dei siti proteolitici su cui agisce la proteina C attivata¹⁴. Tale

Tabella 1

Le indagini di laboratorio per la valutazione della trombosi venosa

Condizione trombofilica	Indagini di laboratorio	Metodo
<i>APC resistance</i> / Fattore V di Leiden	Rapporto APC resistance	Tempo di coagulazione (con e senza APC)
<i>APC resistance</i> / Fattore V di Leiden	Fattore V di Leiden	Test mutazionale su DNA
Mutazione G20210A nel gene della protrombina	Mutazione G20210A del gene della protrombina	Test mutazionale su DNA
Iperomocisteinemia	Omocisteina	HPLC, ELISA
Mutazione MTHFR	Mutazione MTHFR	Test mutazionale su DNA
Deficit della proteina C	Attività della proteina C	Test immunologici
Deficit della proteina S	Attività della proteina S	Test immunologici
Deficit della antitrombina III	Attività dell'antitrombina III	Test immunologici

Tabella 2

Alterazioni genetiche nella trombosi venosa

Fattore	Prevalenza nella popolazione trombofilica, (%)	Prevalenza nella popolazione generale (%)	Rischio relativo	Alterazioni genetiche
Deficit di antitrombina III	~1	0,02-0,04	~20-50	Eterogenee
Deficit di proteina C	~2-5	0,2-0,5	7-10	Eterogenee
Deficit di proteina S	~1-3	0,1-1	~2	Eterogenee
APC resistance / Fattore V di Leiden (G1691A)	~20	2-3 (omozigoti)	~3-7 (eterozigoti)	Singola mutazione
Mutazione G20210A nel gene della protrombina	3-8	~2-3 (omozigoti)	50-100 (omozigoti) ~2-5 (eterozigoti)	Singola mutazione
Iperomocisteinemia (mutazione MTHFR)	15-27	5-18 (omozigoti)	2-3	Singola mutazione

variante proteica determina la resistenza alla degradazione del fattore V da parte della Proteina C attivata (*APC resistance*). L'inattivazione del fattore V induce uno stato di ipercoagulabilità, che predispone alla trombosi. La prevalenza della mutazione G1691A, definita variante di Leiden (località in cui fu scoperta), nella popolazione caucasica non è molto elevata, con una frequenza di portatori in eterozigosi in Italia pari al 2-3% e del 17-20% in pazienti selezionati con storia di trombosi venosa¹⁵. Gli eterozigoti hanno un rischio di sviluppare una trombosi venosa di 3-7 volte superiore rispetto ai non portatori, mentre per gli omozigoti il rischio è pari a 50-100 volte (Tab. 2).

Tale evento trombotico è favorito in presenza di altre condizioni predisponenti, quali la gravidanza, l'assunzione di contraccettivi orali e gli interventi chirurgici. I soggetti che presentano variante di Leiden dovrebbero, pertanto, sottoporsi a profilassi anticoagulativa in corso di gravidanza o in vista di interventi chirurgici e le donne dovrebbero evitare l'assunzione di contraccettivi orali.

La variante protrombina (G20210A)

Una mutazione a carico del gene della protrombina o fattore II è un'altra importante causa ereditaria di malattia tromboembolica. È stata descritta nel 1996 ed è determinata da una sostituzione di una guanina con una adenina alla posizione 20210 (G20210A) in una regione non trascritta del gene dalla parte del 3' che è sicuramente coinvolta nella regolazione genica post-trascrizionale, quale la stabilità dell'RNA messaggero¹⁶.

La variante G20210A si associa ad un aumento dei livelli plasmatici del fattore II con conseguente aumentato rischio di trombosi. La frequenza genica della variante è bassa con una percentuale di eterozigoti del 2-3% nella popolazione generale e fino al 20% nella popolazione trombofilica^{17,18}. Diversi studi clinici hanno evidenziato che gli eterozigoti hanno un rischio aumentato di 3-5 volte di sviluppare una trombosi venosa e la doppia eterozigosità con il fattore di Leiden può incrementarlo^{17,18}.

La variante termolabile della MTHFR

Tra le cause sicure di malattia tromboembolica va, infine, considerata l'iperomocisteinemia moderata o intermedia (omocisteina totale pari a 15-100 $\mu\text{mol/l}$) che può derivare sia da fattori nutrizionali che genetici. Le carenze di vitamina B12, vitamina B6 e folato, cofattori essenziali degli enzimi che regolano il metabolismo dell'aminoacido, sono le cause più comuni di una moderata iperomocisteinemia¹⁹.

Tra le alterazioni genetiche c'è un difetto genetico individuato nel 1995 e riscontrato con una frequenza piuttosto elevata nella popolazione generale. Si tratta di una mutazione puntiforme presente nel gene della MTHFR, un enzima che gioca un ruolo molto importante nel metabolismo dell'omocisteina²⁰. Questo comune polimorfismo genetico, dovuto alla sostituzione di una citosina con timina al nucleotide 677, causa una sostituzione di una alanina con valina nella proteina finale ed una riduzione dell'attività enzimatica della MTHFR pari al 50% (variante termolabi-

le) con conseguente aumento di livelli di omocisteina. La mutazione C677T MTHFR è presente in omozigosi con una frequenza pari al 5-18% nella popolazione generale e sembra associarsi ad un rischio aumentato di circa 3 volte di sviluppare una trombosi venosa¹⁸. Le condizioni di eterozigosi doppia, specie con la variante Leiden del fattore V o della variante 20210 della protrombina, possono aumentare questo rischio relativo, già alto per la presenza dell'altra variante¹⁸.

Aterotrombosi

L'aterotrombosi è caratterizzata da un'improvvisa erosione o rottura di una placca aterosclerotica, che provoca un'attivazione delle piastrine e formazione del trombo. I fattori dell'emostasi e della coagulazione, la cui attivazione/alterazione è alla base del processo trombotico, potrebbero essere particolarmente importanti come mediatori del rischio ischemico aterotrombotico. Comunque, mentre l'associazione tra i polimorfismi di questi fattori e la trombosi venosa si considera piuttosto forte, il loro coinvolgimento nella patogenesi della trombosi arteriosa sembra conferire un rischio relativo abbastanza modesto. Una metanalisi recente ha, infatti, riportato, un rischio di circa 1,2-1,3 volte di sviluppare un evento aterotrombotico per pazienti portatori dei polimorfismi genetici del fattore V e della protrombina²¹. Comunque, un'associazione leggermente più alta (rischio di 1,4-1,8) tra le varianti genetiche del fattore V e della protrombina e la malattia è stata osservata per gli individui che manifestano l'evento clinico in età precoce (al di sotto dei 55 anni) e nelle donne^{22,23}.

Come e quando effettuare le analisi genetiche di laboratorio

L'analisi genetica può essere eseguita mediante l'impiego di nuovi test commerciali che permettono una rilevazione simultanea dei difetti genetici del fattore V Leiden, della protrombina e della MTHFR. In particolare, i kit commerciali che consentono l'amplificazione multipla dei geni mediante PCR in una singola provetta ed un'ibridazione allele-specifica a sonde oligonucleotidiche legate su una membrana (*allele specific amplification PCR, ASA-PCR*), rappresentano una valida e rapida (5-8 ore) alternativa alle tecniche molecolari standard che utilizzavano l'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione (*restriction fragment length polymorphism, RFLP*) o le complesse tecniche di sequenziamento (Fig. 3).

Come già accennato, molti dei difetti genetici sopra descritti sono frequenti nella popolazione generale, il test genetico di predittività trombotica è, quindi, inappropriato per lo screening dei soggetti sani della popolazione generale. L'analisi molecolare dovrebbe essere eseguita soltanto in soggetti potenzialmente a rischio di sviluppare eventi trombotici (Fig. 4). Ad esempio, l'indagine di laboratorio può essere ristretta ai soggetti che hanno avuto un episodio di trombosi venosa in età giovanile (meno di 55 anni), in particolare se con familiarità positiva.

L'analisi molecolare può anche essere eseguita in donne che hanno una storia personale o familiare di tromboembolismo e che intendono assumere contraccettivi orali o terapia sostitutiva ormonale. L'analisi genetica è, comunque, fortemente raccomandata nei famigliari anche asintomatici di pazienti già diagnosticati, perchè possono

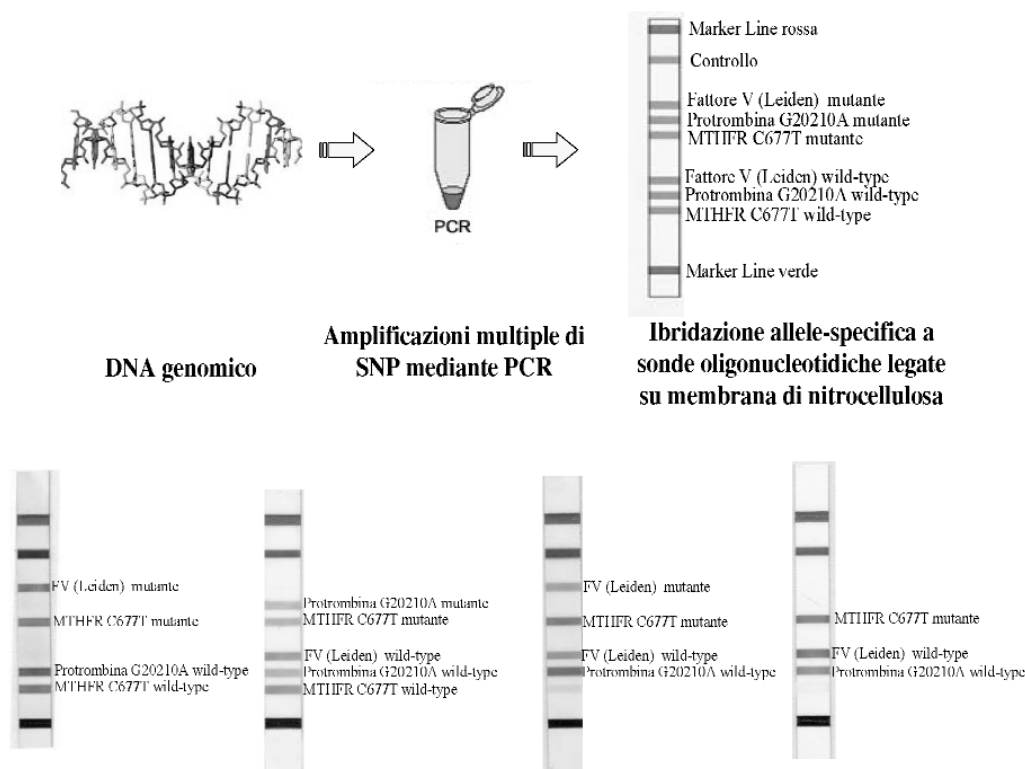


Figura 3
Analisi genetica su striscia del fattore V di Leiden, della protrombina G20210A e della MTHFR C677T

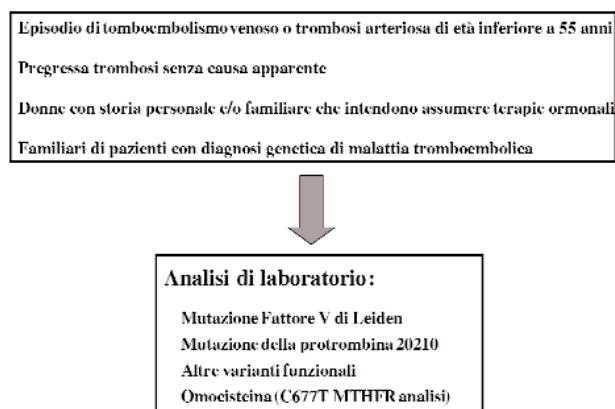


Figura 4
Casi in cui è utile effettuare lo screening trombofilico

beneficiare di un approccio terapeutico di profilassi anti-trombotica, particolarmente utile in occasione di esposizione a rischi contingenti di trombosi.

Per quanto riguarda il rischio aterotrombotico, l'analisi di routine per il fattore V, la protrombina G20210A e la MTHFR C677T in pazienti con infarto del miocardio, ictus o arteriopatia periferica è probabilmente non necessaria. Lo screening molecolare in questi pazienti dovrebbe essere considerato in pazienti che manifestano episodi in età giovanile senza causa apparente o con forte storia familiare.

CONCLUSIONI

Le recenti acquisizioni nel campo della ricerca genetica hanno determinato il progressivo espandersi del numero dei test genetici di rischio trombotico in molti laboratori di analisi. Tuttavia, un atteggiamento responsabile induce a limitare l'impiego di questi marcatori genetici ai casi in cui esiste un forte rischio di eventi trombotici e/o quando l'applicazione del test diagnostico può migliorare la diagnosi e la cura della malattia. Soltanto la capacità del medico e del laboratorista di comprendere appieno le implicazioni dei test genetici e di interpretarne i risultati nel quadro clinico complessivo consentirà di fornire al paziente informazioni adeguate, giocando un ruolo fondamentale per un corretto uso di questi nuovi strumenti.

BIBLIOGRAFIA

1. **Collins FS.** Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat Genet* 1995; 9:347-50
2. **Cooke GE.** Pharmacogenetics of multigenic disease: heart disease as an example. *Vascul Pharmacol* 2006; 44:66-74.
3. **Housman D, Ledley FD.** Why pharmacogenomics? Why now?. *Nat Biotechnol* 1998;16:492-3
4. **McKusick VA.** The anatomy of the human genome. A neo-vesalian basis for medicine in the 21st century. *JAMA* 2001; 286:2289-95
5. **Mayeux R.** Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest* 2005;115:1404-7.
6. **2004 Heart and Stroke Statistical Update.** American Heart Association. Sito Web disponibile all'indirizzo: <http://www.americanheart.org>.
7. **Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC.** Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 2004 28;110: 1868-73
8. **Pillans PI.** Increasing relevance of pharmacogenetics of drug metabolism in clinical practice. *Intern Med J* 2001; 31:476-8.
9. **Mango R, Vecchione L, Raso B, et al.** Pharmacogenomics in cardiovascular disease: the role of single nucleotide polymorphisms in improving drug therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 2565-76.
10. **Tang Z, Tracy RP.** Candidate genes and confirmed genetic polymorphisms associated with cardiovascular diseases: a tabular assessment. *J Thromb Thrombolysis* 2001; 11:49-81.
11. **Humphries SE, Ridker PM, Talmud PJ.** Genetic testing for cardiovascular disease susceptibility: a useful clinical management tool or possible misinformation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:628-36.
12. **Federici C, Gianetti J, Andreassi MG.** Genomic medicine and thrombotic risk: who, when, how and why? *Int J Cardiol* 2006;106 :3-9.
13. **Andreassi MG, Botto N, Maffei S. Factor V Leiden, prothrombin G20210A substitution and hormone therapy: indications for molecular screening.** *Clin Chem Lab Med* 2006;44:514-21
14. **Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al.** Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994 ; 369: 64-7.
15. **Tripodi A, Mannucci PM.** Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001; 47: 1597-606.
16. **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al.** A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
17. **De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, et al.** The risk of recurrent deep venous thrombosis among

- heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341:801-6.
18. **De Stefano V, Zappacosta B, Persichilli S, et al.** Prevalence of mild hyperhomocysteinaemia and association with thrombophilic genotypes (factor V Leiden and prothrombin G20210A) in Italian patients with venous thromboembolic disease. *Br J Haematol* 1999;106:564-8.
19. **Haynes WG.** Hyperhomocysteinemia, vascular function and atherosclerosis: effects of vitamins. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:391-9
20. **Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
21. **Ye Z, Liu EH, Higgins JP, et al.** Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006;367:651-8.
22. **Kim RJ, Becker RC.** Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003;146:948-57.
23. **Burzotta F, Paciaroni K, De Stefano V, et al.** Increased prevalence of the G20210A prothrombin gene variant in acute coronary syndromes without metabolic or acquired risk factors or with limited extent of disease. *Eur Heart J* 2002;23:26-30.

Per corrispondenza:

Dr.ssa Maria Grazia Andreassi
Laboratorio di Genetica e Biologia Cellulare, IFC-CNR
Ospedale G. Pasquinucci, 54100 Massa
Tel +39 0585-493644 - Fax: +39 0585- 493601
e-mail: andreas@ifc.cnr.it