

# Rassegne

## I geni di suscettibilità all'infarto: una revisione della letteratura

Benedetta Diamante Chiodini, Simona Barlera, Maria Grazia Franzosi, Gianni Tognoni

*Dipartimento di Ricerca Cardiovascolare, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano*

*Key words:*

**Epidemiology; Genes;  
Genetics;  
Ischemic heart disease;  
Risk factors.**

The investigation on the susceptibility genes of myocardial infarction has initiated substantially in the last 20 years. Most efforts have been mainly addressed to identify and evaluate genes involved in those systems already suspected to be implicated in the pathogenesis of coronary heart disease. Principal examples are lipid metabolism, coagulation and fibrinolytic systems, membrane receptors of platelets, levels of plasma homocysteine and vascular tone. Therefore up to now, the identification of the genetic factors of myocardial infarction has been carried out through case-control association studies employing a "candidate gene" approach. This method has often led to controversial results, usually difficult to compare. This is an attempt to provide a progress report on the principal susceptibility genes of coronary heart disease.

(Ital Heart J Suppl 2001; 2 (9): 935-944)

© 2001 CEPI Srl

Ricevuto il 19 giugno  
2001; accettato il 4 luglio  
2001.

*Per la corrispondenza:*

Dr.ssa Benedetta  
Diamante Chiodini

*Dipartimento di Ricerca  
Cardiovascolare  
Istituto di Ricerche  
Farmacologiche  
Mario Negri  
Via Eritrea, 62  
20157 Milano  
E-mail: chiodini@  
marionegri.it*

### Introduzione

È oramai acquisito come la genetica sia oggi tra i protagonisti della scena cardiologica in molti suoi ambiti, sia che si parli di epidemiologia eziologica, piuttosto che di terapia genica o di prognostica molecolare. Assume un ruolo di primo piano persino di fronte alle domande sulle priorità dell'assistenza, e non solo della ricerca. A fianco delle continue acquisizioni assolutamente straordinarie, si assiste a un periodo di profonda trasformazione culturale, che rende difficile comprendere a fondo la rilevanza e il grado di innovazione dei risultati al di là della novità del linguaggio. L'illusione di "certezze" che dà la conoscenza genetica rischia inoltre di affievolire il senso critico e di allentare le cautele metodologiche cui ci si è faticosamente abituati nello studio delle associazioni causali a livello epidemiologico ed ancor più a livello sperimentale. Anche il contesto italiano sta rapidamente passando dal tempo delle esperienze di singole persone o gruppi al coinvolgimento diretto della cardiologia clinico-assistenziale. E ciò non solo nell'ambito di progetti di ricerca che hanno la genetica come componente od obiettivo principale: basti pensare a quanti sottoprogetti genetici compaiono nell'ambito di sperimentazioni cliniche, spesso più come dichiarazioni di intenti che come protocolli veri.

Tra i segnali importanti di questa evoluzione è senz'altro da segnalare l'avvio di un progetto di epidemiologia genetica nel campo delle sindromi coronariche acute in una logica "GISSI" che, come noto, ha segnato una tappa significativa nello sviluppo della ricerca in cardiologia, non solo in Italia. Al di là degli obiettivi specifici e degli aspetti tecnico-scientifici, il progetto PROCARDIS, si rivela un'opportunità per acquisire competenze e familiarità con gli aspetti genetici attraverso la pratica e la partecipazione diretta dei clinici alla produzione di conoscenze.

I contributi che seguono si pongono in questa prospettiva, come un punto di partenza che si articola in due momenti successivi: prima di presentare il protocollo dello studio PROCARDIS, che fa uso degli approcci metodologici più attuali dell'epidemiologia genetica, si è ritenuto infatti opportuno affrontare un'analisi critica di quanto è stato prodotto ed è disponibile ad oggi in letteratura riguardo alla genetica della cardiopatia ischemica (CHD).

### Metodi

L'obiettivo principale di questa prima parte del lavoro è quello di rileggere quanto prodotto nelle aree che più hanno occupato l'attenzione della ricerca genetica clinico-epidemiologica, quali il metabolismo

lipidico, il sistema emostatico, il metabolismo dell'omocisteina, e il sistema renina-angiotensina, con un'attenzione specifica alle problematiche metodologiche, allo scopo di fare il punto sulle evidenze esistenti ad oggi riguardo al ruolo dei geni nella suscettibilità alla CHD.

È stata effettuata una revisione della letteratura pubblicata tra il gennaio 1966 e il maggio 2001, ponendo particolare attenzione agli articoli comparsi sulle riviste di maggiore rilevanza scientifica. A questo scopo si è utilizzata la banca dati Medline.

## Risultati

**Metabolismo lipidico** (Tab. I)<sup>1-18</sup>. Nel 50-80% dei sopravvissuti ad infarto miocardico si sono riscontrate anomalie nel metabolismo lipidico, quali elevati livelli di colesterolo LDL, bassi livelli di HDL in associazione ad aumento dei trigliceridi, elevata concentrazione di una lipoproteina anomala [(lipoproteina(a)]. A partire dall'evidenza di questi fenotipi intermedi, e grazie all'isolamento, sequenziamento e mappaggio dei geni delle diverse proteine coinvolte nel metabolismo lipidico (iniziato nel 1982), la ricerca si è rivolta a tentare di definire le anomalie genetiche sottostanti ai disordini in questione ed il ruolo che queste svolgono nella suscettibilità alla CHD<sup>19</sup>.

Per quanto concerne l'incremento dei livelli di colesterolo LDL, le varianti genetiche delle apolipoproteine (apo)-B, del recettore delle LDL e delle apo-E sono sta-

te le più indagate come potenzialmente responsabili. Nel primo caso, la relazione tra livelli elevati di apo-B (fenotipo intermedio) e insorgenza di CHD (fenotipo ultimo) è stata ampiamente dimostrata. Gli studi, che hanno investigato le relazioni tra alcuni polimorfismi comuni del gene delle apo-B (XbaI, EcoRI, SpID, MspI), assetto lipidico e rischio di CHD si possono definire discretamente concordi nel riscontrare l'associazione riguardo alle varianti alleliche E- di EcoRI e D di SpID<sup>1-6</sup>, laddove le relazioni con le varianti X- di XbaI e I di MspI appaiono invece più controverse<sup>1,2,4</sup>. In ogni modo, date le dimensioni per lo più modeste degli studi, spesso inoltre difficilmente confrontabili in quanto condotti su popolazioni etnicamente disomogenee, il discorso sulla relazione tra varianti genetiche comuni del gene dell'apo-B e rischio di CHD rimane a tutt'oggi aperto.

Riguardo al recettore delle LDL, sono note da tempo mutazioni a carico del gene in questione, rare nella popolazione generale e alla base di forme di ipercolesterolemia familiare e coronaropatia precoce, mentre sono pochi gli studi che hanno esaminato l'influenza di una variante comune (PvuII) del gene del recettore delle LDL sui livelli basali di lipoproteine<sup>20</sup> e sul rischio di CHD<sup>7</sup>.

Tra i geni coinvolti nel metabolismo lipidico, e probabilmente nell'ambito di tutti i geni ritenuti "candidati" nella suscettibilità alla CHD, il polimorfismo ε4 del locus dell'apo-E è quello attorno al quale si è raccolto finora il maggior consenso. La sostanziale unanimità di evidenze riguarda sia la relazione tra genotipo e fenotipo intermedio, sia quella tra genotipo e fenotipo ultimo.

**Tabella I.** Livello di concordanza tra i principali studi di associazione sulla relazione tra comuni polimorfismi dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico e rischio di cardiopatia ischemica.

Autore	N. pazienti	Gene	Polimorfismi considerati	Rischio di CHD	Concordanza tra gli studi
Heng et al. <sup>1</sup> , 1999	474	Apo-B	EcoRI*, SpID/XbaI*, MspI*	↑	Discreta/scarsa
Saha et al. <sup>2</sup> , 1992	292				
Bohn et al. <sup>3</sup> , 1993	859				
De Padua Mansur et al. <sup>4</sup> , 2000	388				
Marshall et al. <sup>5</sup> , 1994	848				
Gardemann et al. <sup>6</sup> , 1998	2259				
Salazar et al. <sup>7</sup> , 2000	228				
Frikke-Schmidt et al. <sup>8</sup> , 2000	10 181	Apo-E	Apo ε2/Apo ε4	↓/↑	Scarsa/molto buona
Wilson et al. <sup>9</sup> , 1994	1950				
Tiret et al. <sup>10</sup> , 1994	1894				
Wilson et al. <sup>11</sup> , 1996	6355 M				
Ou et al. <sup>12</sup> , 1998	524				
Serrato e Marian <sup>13</sup> , 1995	470	PONA	B	↑	Scarsa
Ruiz et al. <sup>14</sup> , 1995	434				
Sen-Banerjee et al. <sup>15</sup> , 2000	1010				
Herrmann et al. <sup>16</sup> , 1996	1343				
Aubo et al. <sup>17</sup> , 2000	466				
Sanghera et al. <sup>18</sup> , 1997	1034				

Apo = apolipoproteina; CHD = cardiopatia ischemica; LDL = lipoproteine a bassa densità; M = metanalisi; PONA = gene dell'enzima paraoxonasi/arilesterasi; ↑ = aumento; ↓ = diminuzione; ≡ = associazione non significativa. \* mutazioni che identificano i polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione; \*\* concordanza non valutabile per carenza di studi in proposito.

Se paragonate all'allele più frequente e probabilmente originario  $\epsilon 3$ , le varianti genetiche  $\epsilon 2$  ed  $\epsilon 4$  si accompagnano infatti sempre a livelli rispettivamente più bassi e più alti di apo-B e di colesterolo totale e LDL. Inoltre, l'associazione tra presenza dell'allele  $\epsilon 4$  e rischio di CHD, in entrambi i sessi ed indipendentemente dai livelli di colesterolo LDL, è stata messa in luce da tutti gli studi, di dimensioni più e meno grandi condotti su popolazioni anche molto diverse<sup>8</sup>. Nonostante questa buona concordanza di base tra gli studi, l'entità ed i livelli di significatività dei rischi riscontrati non si mostrano altrettanto omogenei<sup>9,10</sup>, e infatti gli odds ratio (OR) stimati variano dall'1.26 di una metanalisi<sup>11</sup> su 6355 individui, al 2.74 di uno studio giapponese<sup>12</sup> di dimensioni relativamente modeste.

Per quanto riguarda l'ereditarietà dei livelli di colesterolo HDL, studi su famiglie e gemelli hanno stimato il contributo della genetica in un valore del 35-50%, e hanno riscontrato una relazione tra familiarità per bassi valori di colesterolo HDL e suscettibilità familiare alla CHD precoce.

Le ultime ricerche riguardo al ruolo delle HDL hanno ipotizzato un loro effetto antiossidante e si sono concentrate su una glicoproteina costituente, l'enzima paraoxonasi/ariesterasi (PONA), che sembra giocare il ruolo di inibitore delle modificazioni di tipo ossidativo delle LDL, e la cui attività è spesso ridotta in soggetti affetti da CHD o ipercolesterolemia familiare. Più di uno studio<sup>13-15</sup> ha messo in luce un'associazione tra rischio di sviluppare CHD e presenza di un comune polimorfismo PONA (allele B), che comporta una sostituzione aminoacidica (Gln  $\rightarrow$  Arg) e che è forte determinante dei livelli di attività enzimatica. Tuttavia, altre indagini<sup>16,17</sup> non hanno confermato tale osservazione, e comunque sia l'associazione è stata riscontrata solo nelle popolazioni con antenati di razza bianca. Particolarmente interessanti in questo senso sono i risultati di uno studio che ha indagato la relazione tra allele B del gene PONA, lipidi plasmatici e CHD in due gruppi razziali, indiani asiatici e cinesi provenienti da Singapore, e che ha rilevato una forte associazione con la CHD negli indiani, ma non nei cinesi. Queste osservazioni suggeriscono che molto probabilmente il polimorfismo in questione non è un fattore di rischio indipendente per CHD, e che potrebbero essere implicati altri fattori fino ad oggi oscuri (interazione gene-gene, interazione gene-ambiente, "linkage disequilibrium", ecc.)<sup>18</sup>. I risultati ottenuti ad oggi sono controversi e non conclusivi sia riguardo al preciso ruolo di questa variante genetica, sia riguardo alla sua relazione con la suscettibilità alla CHD.

Risultati ancor più deludenti si sono ottenuti riguardo alle relazioni tra presenza di determinate varianti del gene notevolmente polimorfico dell'apo(a), incremento di concentrazione di lipoproteina(a) e rischio di CHD. Sono stati ipotizzati differenti possibili effetti della lipoproteina(a), composta da una forma LDL alterata (ad esempio antifibrinolitico), e l'associazione tra i livelli di lipoproteina(a) e CHD è stata evidenziata

dalla maggioranza degli studi retrospettivi, ma non da quelli prospettici. Nonostante alcuni studi su famiglie e gemelli abbiano rilevato un'alta ereditarietà dei livelli di lipoproteina(a), non ci sono sostanziali evidenze riguardo a due polimorfismi del gene dell'apo(a) (uno nella regione regolatrice ed uno relativo a ripetizioni pentanucleotidiche), inizialmente sospettati di giocare un ruolo sui livelli di lipoproteina circolante e sul rischio di CHD<sup>21,22</sup>.

**Sistema emostatico** (Tab. II)<sup>23-53</sup>. È noto che il sistema emostatico è in grado di modulare il rischio di trombosi, e che alterazioni della funzione piastrinica e dei sistemi emocoagulativo e fibrinolitico, in parte geneticamente determinate, possono influenzare questo genere di attività<sup>54</sup>.

Tuttavia rimangono ad oggi molti dubbi riguardo all'effetto che comportano variazioni genetiche relative alle piastrine sulla suscettibilità alla CHD. La glicoproteina di membrana GPIb/IX, che media il processo di adesione piastrinica alla parete danneggiata, pare sia coinvolta nella patogenesi dell'occlusione coronarica. Murata et al.<sup>23,24</sup>, in uno studio di modeste dimensioni, riscontrarono una consistente associazione tra due delle numerose varianti del gene GPIba (un dimorfismo nucleotidico C/T in posizione -5 e un polimorfismo di ripetizioni nucleotidiche variabili tandem di 39 coppie di basi) ed insorgenza di CHD in età relativamente giovane ( $\leq 60$  anni). Studi successivi, su popolazioni sia simili<sup>25</sup> sia differenti<sup>26,27</sup>, su campioni più ampi, anche se non molto estesi, non hanno confermato tale osservazione. Pertanto si può ritenere confutata l'ipotesi iniziale di un ruolo di queste varianti del gene GPIba quali fattori di rischio indipendenti per la CHD.

Allo stesso modo si può ritenere confutata l'ipotesi di una relazione tra presenza del polimorfismo PI<sup>A2</sup> del gene per la GPIIIa, parte di un'altra glicoproteina di membrana (GPIIb/IIIa) implicata nell'ultima fase della formazione del trombo, e rischio aumentato di sviluppare infarto del miocardio. Weiss et al.<sup>28</sup> misero in luce, all'interno di un campione decisamente piccolo, una forte associazione tra tale variante genetica ed insorgenza di trombosi coronarica acuta in particolar modo in età  $< 60$  anni. Tale osservazione è stata poi, con poche eccezioni<sup>26</sup>, smentita<sup>29,30</sup>, e risultati conclusivi pervengono da una recente metanalisi<sup>31</sup> di 23 studi su un totale di 10 638 soggetti.

Il frequente riscontro di valori basali elevati di attività del sistema emocoagulativo in soggetti affetti da CHD ha portato a supporre che alterazioni in questo sistema possano influenzare l'insorgenza del primo evento e della recidiva. Tra tutti i fattori indagati, il fibrinogeno, il fattore VII, il fattore V, l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI)-1 sono parsi i più potenzialmente implicati. È noto come il fibrinogeno, contribuendo con buona probabilità ad incrementare la coagulabilità del sangue, la viscosità plasmatica e l'aggre-

**Tabella II.** Livello di concordanza tra i principali studi di associazione sulla relazione tra comuni polimorfismi dei geni coinvolti nel sistema emostatico e rischio di cardiopatia ischemica.

Autore	N. pazienti	Gene	Polimorfismi considerati	Rischio di CHD	Concordanza tra gli studi				
Murata et al. <sup>23,24</sup> , 1997,1998	196	GPIb $\alpha$	-5 C/T, VNTR	$\equiv$	Buona				
Ito et al. <sup>25</sup> , 1999	327								
Ardissino et al. <sup>26</sup> , 1999	400								
Croft et al. <sup>27</sup> , 2000	1037								
Weiss et al. <sup>28</sup> , 1996	139	GPIIIa	PIA <sup>2</sup>	$\equiv$	Buona				
Ardissino et al. <sup>26</sup> , 1999	400								
Herrmann et al. <sup>29</sup> , 1997	1320								
Ridker et al. <sup>30</sup> , 1997	1078								
Zhu et al. <sup>31</sup> , 2000	10 638 M								
Behague et al. <sup>32</sup> , 1996	1233	$\beta$ -fibrinogeno	HindIII*, HaeIII/2*, $\beta$ BcII/2*	$\equiv$	Buona				
Wang et al. <sup>33</sup> , 1997	545								
Gardemann et al. <sup>34</sup> , 1997	923								
Carter et al. <sup>35</sup> , 1997	619								
Zito et al. <sup>36</sup> , 1997	275								
Iacoviello et al. <sup>37</sup> , 1998	390					Fattore VII	Arg353	$\equiv$	Buona
Ardissino et al. <sup>26</sup> , 1999	400								
Tamaki et al. <sup>38</sup> , 1999	493								
Doggen et al. <sup>39</sup> , 1998	1204								
Lane et al. <sup>40</sup> , 1996	1079								
Ridker et al. <sup>41</sup> , 1995	1078	Fattore V	G1691A	$\uparrow$	Molto scarsa				
Dunn et al. <sup>42</sup> , 1998	850								
Junker et al. <sup>43</sup> , 1998	420								
Gardemann et al. <sup>44</sup> , 1999	2210								
Rosendaal et al. <sup>45</sup> , 1997	472								
Doggen et al. <sup>46</sup> , 1998	1206								
Van der Bom et al. <sup>47</sup> , 1997	371					t-PA	Alu I	$\equiv$	Buona
Ridker et al. <sup>48</sup> , 1997	738								
Steeds et al. <sup>49</sup> , 1998	1054								
Ye et al. <sup>50</sup> , 1995	1077	PAI-1	4G/5G	$\uparrow$	Scarsa				
Ossei-Gerning et al. <sup>51</sup> , 1997	453								
Ardissino et al. <sup>26</sup> , 1999	400								
Doggen et al. <sup>52</sup> , 1999	633								
Junker et al. <sup>43</sup> , 1998	420								
Iacoviello et al. <sup>53</sup> , 1998	3641 M								

GP = glicoproteina; PAI-1 = inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1; TM = trombomodulina; t-PA = attivatore tissutale del plasminogeno; VNTR = numero variabile di ripetizioni in tandem;  $\uparrow$  = aumento;  $\equiv$  = associazione non significativa. Altre abbreviazioni come in tabella I. \* mutazioni che identificano i polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione.

gabilità piastrinica, rappresenti un fattore di rischio acquisito ed importante per lo sviluppo della CHD. Nonostante il consenso non sia unanime, molte indagini hanno riscontrato un'associazione tra determinati (in particolare tre) polimorfismi del gene del fibrinogeno e fenotipo intermedio (valori plasmatici della molecola); tuttavia la maggioranza degli studi<sup>32-35</sup> che hanno valutato l'eventuale associazione tra le tre varianti genetiche del  $\beta$ -fibrinogeno ed il rischio assoluto di CHD (fenotipo ultimo) hanno riportato risultati negativi. Fa eccezione uno studio italiano<sup>36</sup> che ha ottenuto OR significativi relativamente al polimorfismo  $\beta$ BcII. Ad ogni modo, le evidenze ad oggi raccolte riguardo alle varianti genetiche del fibrinogeno, sono tali da portarci ad escludere anche questi polimorfismi dalla lista dei geni di suscettibilità alla CHD.

L'attività plasmatica del fattore VII, primo proenzima coinvolto nella via estrinseca della cascata coagulativa, è considerata un altro importante fattore di rischio per l'insorgenza di trombosi e di eventi coronarici, ed è condizionata dall'interazione di fattori ambientali (dieta ad alto contenuto lipidico, peso corporeo, assunzione di contraccettivi orali, fumo) e genetici. I risultati di uno studio inglese multietnico<sup>55</sup> hanno mostrato l'esistenza di una correlazione tra presenza di uno dei tre polimorfismi identificati per il gene del fattore VII, determinante una sostituzione aminoacidica in posizione 353, e livelli circolanti della molecola in forma attiva (fenotipo intermedio). Mentre l'associazione tra genotipo ed attività coagulante è stata avvalorata dai dati di altri studi, quella tra variante genetica ed evento infartuale ha avuto un riscontro non altrettanto unanime. Se

infatti uno studio italiano<sup>37</sup> su circa 400 soggetti ha riportato un rischio di infarto miocardico ridotto nei soggetti che possiedono la forma allelica selvaggia (wild-type), due studi di simili dimensioni (Ardissino et al.<sup>26</sup>, Tamaki et al.<sup>38</sup>) non hanno riscontrato variazioni del rischio. Inoltre risultati non statisticamente significativi sono stati osservati da più ampi studi casi-controllo<sup>39</sup>, tra i quali lo studio ECTIM<sup>40</sup>, che riducono la probabilità che vi sia associazione tra la variante genetica del fattore VII e rischio di CHD.

Il fattore V è un altro fattore della coagulazione, la cui attività è modulata da uno dei principali regolatori della cascata coagulativa, il sistema proteina C/proteina S. È stato dimostrato che alterazioni a livello di questo naturale complesso inibitore conducono ad un aumentato rischio di trombosi venosa, laddove la relazione esistente rispetto all'interessamento arterioso è ancora oggetto di dibattito. Il fattore V Leiden, variante genetica caratterizzata da una mutazione "missense" che determina una sostituzione aminoacidica in uno dei siti proteolitici da parte della proteina C attivata, è forse il difetto ereditario del sistema della coagulazione più conosciuto, e si associa per l'appunto ad una certa resistenza alla degradazione del fattore V da parte della proteina C attiva. Se la correlazione tra questo polimorfismo e l'insorgenza di trombosi venosa si rivela piuttosto forte, la maggioranza degli studi<sup>41-44</sup> più o meno ampi e recenti non ha evidenziato alcuna associazione tra infarto miocardico e fattore V Leiden. Inoltre i pochissimi studi<sup>45,46</sup> che hanno riportato OR positivi e significativi li hanno riscontrati solo in presenza di altri fattori di rischio (ad esempio il fumo). Pertanto, la teoria che appare oggi più sostenibile è che questo polimorfismo non aumenti di per sé il rischio di sviluppare CHD, ma che giochi un ruolo nella suscettibilità a questa quando in interazione con altri fattori di rischio ambientali e/o genetici.

L'incremento in circolo di t-PA, preminente enzima profibrinolitico endogeno, così come del PAI-1, è stato messo in relazione all'insorgenza di eventi trombotici acuti. Tuttavia, per quanto concerne il gene del t-PA, l'originaria associazione che era stata evidenziata dallo studio di Rotterdam<sup>47</sup> su circa 400 soggetti tra presenza

del polimorfismo Alu I (caratterizzato dall'inserzione di una sequenza che contiene un sito di restrizione per l'enzima Alu I) e rischio di infarto del miocardio, non è stata confermata da studi di maggiori dimensioni<sup>48,49</sup>. I dati disponibili sull'argomento, quantunque siano scarsi, non ci inducono dunque a supporre alcun particolare ruolo della variante genetica del t-PA sulla suscettibilità alla CHD.

Riguardo all'effetto delle varianti genetiche del PAI-1, ed in particolare della variante meglio indagata 4G per una guanina nella regione del promotore, sulla suscettibilità alla CHD si osservano risultati piuttosto controversi e non esaustivi. Infatti, se da un lato i dati di un ampio studio quale l'ECTIM<sup>50</sup> inducono a concludere che il polimorfismo 4G possa essere associato all'attività plasmatica del PAI-1, ma certamente non al rischio di infarto miocardico, dall'altro, nell'ambito di quattro studi<sup>26,43,51,52</sup> tutti di dimensioni più esigue, due<sup>26,51</sup> hanno riportato risultati positivi anche in relazione al fenotipo ultimo. Inoltre, una recente metanalisi italiana<sup>53</sup> ha riscontrato un lieve ma significativo aumento del rischio di infarto miocardico nei soggetti omozigoti 4G/4G. In questo caso, la mancanza di uniformità tra le indagini può essere almeno in parte spiegata dall'esistenza di un'interazione tra il sito polimorfico 4G/5G e i livelli di trigliceridi e di alcune lipoproteine (ad esempio VLDL), data anche la stretta vicinanza tra il gene del PAI-1 e quello della paraoxonasi<sup>56</sup>.

**Metabolismo dell'omocisteina** (Tab. III)<sup>57-63</sup>. Nonostante esistano evidenze significative di una relazione tra concentrazione plasmatica di omocisteina, aminoacido metabolita della metionina con potenziali effetti citotossici sia sul sistema emostatico sia sul processo aterosclerotico, e rischio cardiovascolare, finora l'esatto meccanismo patogenetico non è noto. Si sa che i livelli circolanti dell'aminoacido dipendono da svariati fattori e che una situazione di iperomocisteinemia si associa sia a condizioni di malnutrizione (ad esempio diete ricche di metionina, basso introito di vitamina B e folati), sia a stati di insufficienza renale, sia a difetti genetici degli enzimi chiave del metabolismo dell'o-

**Tabella III.** Livello di concordanza tra i principali studi di associazione sulla relazione tra i comuni polimorfismi del gene che influenza il livello di omocisteina circolante e rischio di cardiopatia ischemica.

Autore	N. pazienti	Gene	Polimorfismi considerati	Rischio di CHD	Concordanza tra gli studi
Gallagher et al. <sup>57</sup> , 1996	216	MTHFR	C677T (TT)	≡	Buona
Schmitz et al. <sup>58</sup> , 1996	378				
Ma et al. <sup>59</sup> , 1996	583				
Van Bockxmeer et al. <sup>60</sup> , 1997	698				
Verhoef et al. <sup>61</sup> , 1998	1000				
Gardemann et al. <sup>62</sup> , 1999	2453				
Kluijtmans et al. <sup>63</sup> , 1997	4957	M			

MTHFR = metilene tetraidrofolato reductasi; ≡ = associazione non significativa. Altre abbreviazioni come in tabella I.

mocisteina. Per quanto riguarda la componente genetica, nella popolazione generale è stata messa in luce una variante termolabile piuttosto frequente di un enzima detto metilene tetraidrofolato reductasi (MTHFR), rilevante nell'ambito del metabolismo dell'omocisteina perché responsabile della rimetilazione da questa alla metionina. Il polimorfismo (C677T) è rappresentato da una mutazione "missense" in posizione 677, nella regione codificante per il sito di legame dell'enzima MTHFR, ed i soggetti omozigoti per questa variante genetica (TT) presentano livelli di omocisteina circolante indubbiamente elevati rispetto agli eterozigoti o agli omozigoti della variante originaria (wild-type)<sup>54</sup>. Tuttavia, l'ipotesi di una forte associazione tra polimorfismo C677T di MTHFR e insorgenza di CHD, originata da uno studio caso-controllo del 1996 su 216 individui<sup>57</sup>, si può ritenere in buona sostanza superata dalle evidenze di studi sia contemporanei di dimensioni analoghe a quello<sup>58,59</sup>, sia successivi e maggiori<sup>60-62</sup> e ciò nonostante una metanalisi<sup>63</sup> olandese, condotta su un campione totale di circa 5000 soggetti, abbia riportato un risultato seppur modestamente significativo.

**Sistema renina-angiotensina** (Tab. IV)<sup>64-77</sup>. Recentemente sono stati condotti parecchi studi caso-controllo relativi ai geni candidati per il sistema renina-angiotensina, implicato nella patogenesi di più disordini, tra cui la CHD, a causa della sua azione a diversi livelli quali la regolazione della resistenza vascolare e dell'omeostasi idrosalina, la promozione della crescita vascolare e la patobiologia delle malattie dei vasi. I componenti più indagati sono stati l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), l'angiotensinogeno e il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (AT<sub>1</sub>R)<sup>54,56</sup>. Anche in questo

caso ci troviamo di fronte ad una sostanziale mancanza di evidenze positive, tanto che ad oggi l'unica certezza che abbiamo riguarda la complessità della relazione esistente tra le varianti genetiche del sistema renina-angiotensina e il rischio di CHD. Da studi di aggregazione familiare è nata l'ipotesi dell'esistenza di una certa ereditarietà alla base della variabilità interindividuale osservata nei livelli plasmatici dell'ACE, ed il gene ACE si è rivelato il candidato principale. Vari studi hanno indicato la presenza di un'associazione tra genotipo omozigote DD di un polimorfismo inserzione/delezione (I/D) del gene ACE, e fenotipo intermedio (concentrazioni circolanti dell'enzima stesso). Nel 1992 lo studio ECTIM<sup>64</sup> mise in luce l'esistenza di un'associazione piuttosto importante tra questa variante genetica e rischio di CHD; tuttavia le numerose altre indagini che sono state condotte successivamente allo scopo di verificare tale evidenza, anche su popolazioni etnicamente diverse, hanno dato risultati controversi, probabilmente a causa delle dimensioni individualmente piuttosto esigue degli studi. I dati del Physicians' Health Study<sup>65</sup> riportavano una sostanziale neutralità di rischio, mentre una metanalisi<sup>66</sup> su 15 studi ed un totale di quasi 9000 soggetti, evidenziava un risultato, seppur modestamente, significativo.

Oggi siamo in grado di trarre delle conclusioni riguardo alla relazione tra polimorfismo D del gene ACE e rischio di CHD. Una metanalisi<sup>67</sup> recente comprendente più di 32 000 individui di razza caucasica, che ha valutato separatamente studi di dimensioni più o meno modeste, ha infatti riscontrato un rischio statisticamente significativo di sviluppare CHD per i soggetti omozigoti DD nei piccoli ma non nei grandi studi. Inoltre l'ampio studio caso-controllo ISIS<sup>68</sup> indica l'esistenza

**Tabella IV.** Livello di concordanza tra i principali studi di associazione sulla relazione tra comuni polimorfismi dei geni coinvolti nel sistema renina-angiotensina e rischio di cardiopatia ischemica.

Autore	N. pazienti	Gene	Polimorfismi considerati	Rischio di CHD	Concordanza tra gli studi
Cambien et al. <sup>64</sup> , 1992	1343	ACE	I/D	↑	Molto scarsa
Lindpaintner et al. <sup>65</sup> , 1995	3590				
Samani et al. <sup>66</sup> , 1996	8873 M				
Agerholm-Larsen et al. <sup>67</sup> , 2000	32 715 M				
Keavney et al. <sup>68</sup> , 2000	10 563				
Katsuya et al. <sup>69</sup> , 1995	828	AGT	T235	↑	Molto scarsa
Ludwig et al. <sup>70</sup> , 1997	462				
Jeunemaitre et al. <sup>71</sup> , 1997	463				
Ko et al. <sup>72</sup> , 1997	426				
Fatini et al. <sup>73</sup> , 2000	414				
Sethi et al. <sup>74</sup> , 2001	866, 943, 519, 493	AT <sub>1</sub> R	C1166	↑	Molto scarsa
Gardemann et al. <sup>75</sup> , 1998	2244				
Berge et al. <sup>76</sup> , 1997	619				
Jeunemaitre et al. <sup>71</sup> , 1997	463				
Rice et al. <sup>77</sup> , 1999	618				
Fatini et al. <sup>73</sup> , 2000	414				

ACE = enzima di conversione dell'angiotensina; AGT = angiotensinogeno; AT<sub>1</sub>R = recettore di tipo 1 dell'angiotensina II; ↑ = aumento. Altre abbreviazioni come in tabella I.

di una debole non significativa associazione tra genotipo indagato e rischio di sviluppare infarto del miocardio. Pertanto tale variante genetica dell'ACE non pare costituire un fattore di rischio individualmente importante per la CHD.

Il discorso è in realtà piuttosto simile per quanto concerne l'angiotensinogeno, altra componente principale del sistema renina-angiotensina in funzione di progenitore sia dell'angiotensina I sia dell'angiotensina II. Sono state messe in luce diverse varianti genetiche del locus angiotensinogeno, alcune in correlazione a livelli circolanti più alti della sostanza e ad un aumentato rischio di ipertensione. Le maggiori evidenze riscontrate si riferiscono ad una mutazione "missense", che determina una sostituzione aminoacidica al codone 235 (T235) nel gene dell'angiotensinogeno. Uno studio caso-controllo<sup>69</sup> condotto su una popolazione caucasica riscontrò un significativo aumento del rischio di CHD nei soggetti omozigoti TT. Indagini condotte successivamente, di dimensioni minori ma tra loro analoghe, quali l' NHLBI Family Heart Study<sup>70</sup>, lo studio CORGENE<sup>71</sup>, uno studio cinese<sup>72</sup> ed uno studio italiano<sup>73</sup> hanno riportato risultati in parte discordanti, avendo soltanto il primo riscontrato un'associazione tra allele 235T e rischio di CHD.

I recentissimi risultati del Copenhagen City Heart Study<sup>74</sup>, che ha condotto quattro ampi studi caso-controllo allo scopo di valutare la relazione tra mutazione M235T e rischio di CHD e di infarto miocardico, non hanno mostrato alcuna evidenza significativa, aumentando così lo scetticismo riguardo all'esistenza di associazione.

L'AT<sub>1</sub>R, presente in diversi tipi di cellule (muscolari lisce dei vasi, cardiomiociti, ecc.), modula l'azione vasocostrittrice e di fattore di crescita dell'angiotensina II, e pertanto il gene AT<sub>1</sub>R rappresenta un candidato per l'ipertensione e la CHD. Ad oggi non è ancora chiaro se la variante genetica identificata C1166, caratterizzata da una sostituzione aminoacidica, sia essa stessa funzionale o sia in "linkage disequilibrium" con una variante funzionale, per ora non identificata, coinvolta nella regolazione dell'espressione del gene. Ad ogni modo, i dati paiono piuttosto conflittuali riguardo all'esistenza sia di una possibile associazione tra allele C1166 e rischio aumentato di CHD sia di un'interazione tra tale polimorfismo e quello D del gene ACE. Se uno studio<sup>75</sup> di più di 2000 soggetti ha ottenuto risultati negativi per entrambe le ipotesi, di quattro studi<sup>71,73,76,77</sup> di dimensioni minori simili tra loro, solo due<sup>73,76</sup> hanno riportato risultati positivi riguardo ad un maggior rischio di infarto miocardico nei soggetti omozigoti CC. Perciò sembra improbabile che la variante genetica indagata per l'AT<sub>1</sub>R svolga un ruolo importante nella suscettibilità alla CHD.

**Geni e varianti implicati in altre vie metaboliche di recente individuazione.** Studi epidemiologici hanno rivelato come il consumo moderato di alcool si associ in maniera consistente ad un ridotto rischio di infarto

miocardico, nonostante non sia ancora del tutto chiaro se questa associazione sia da imputarsi a fattori socio-economici e stili di vita correlati al consumo alcolico, o piuttosto a costituenti delle bevande diverse dall'etanolo. Sono al contrario piuttosto conosciute la farmacocinetica del metabolismo alcolico e le proprietà degli isoenzimi dell'alcool deidrogenasi (ADH) di classe I. Tra questi ultimi il locus dell'ADH<sub>3</sub> presenta varianti alleliche comuni ( $\gamma_1, \gamma_2$ ) nella popolazione che implicano differenti velocità di ossidazione dell'etanolo nel sangue. Un recentissimo studio caso-controllo<sup>78</sup>, basato sui dati del Physicians' Health Study, ha indagato la relazione esistente tra genotipo ADH<sub>3</sub>, consumo alcolico e rischio di infarto miocardico, riscontrando una riduzione del rischio massima ed altamente significativa (rischio relativo 0.14, intervallo di confidenza 95% 0.04-0.45) nei soggetti omozigoti per l'allele  $\gamma_2$  che assumono dosi moderate di alcool.

Le trombospondine (TSP) costituiscono una famiglia di proteine extracellulari, delle quali si conoscono ad oggi cinque prodotti genetici con funzioni probabilmente differenti in biologia vascolare. Studi sperimentali hanno riconosciuto l'importanza della TSP-1 nell'adesione e aggregazione piastrinica, nel processo infiammatorio, nell'interazione tra cellule, nell'angiogenesi e nella proliferazione delle cellule muscolari lisce. Pertanto la TSP-1 è sospettata di giocare un ruolo nello sviluppo dei processi aterosclerotici. Risultati preliminari di uno studio caso-controllo hanno evidenziato l'esistenza di una forte associazione tra la variante genetica rara TSP-1 e il rischio di infarto in età precoce (negli omozigoti OR 8.8,  $p < 0.04$ ). Un rischio statisticamente significativo (OR 2.08,  $p = 0.025$ ) è stato inoltre osservato per gli individui che possiedono almeno una copia della variante allelica TSP-4. Ulteriori studi saranno necessari per confermare questi risultati.

### Problemi metodologici dell'approccio caso-controllo su geni candidati

Nel paragrafo precedente si è evidenziato come la ricerca dei geni coinvolti nella suscettibilità alla CHD sia avvenuto fino ad oggi mediante studi di associazione su geni candidati secondo il modello caso-controllo. Questo approccio permette di indagare la potenziale associazione tra un marcatore genetico (un polimorfismo, un allele) e la suscettibilità ad una malattia, attraverso il confronto tra la frequenza della variante allelica nel gruppo dei casi e in quello dei controlli. La principale forza di questo genere di studi riguarda la possibilità di mettere in evidenza l'esistenza di associazione tra l'insorgenza di malattia ed i geni che la influenzano anche in modo moderato, mediante il reclutamento di un numero di soggetti considerevole ma in genere realistico e raggiungibile. Questo aspetto si rivela di particolare importanza di fronte a patologie multifattoriali quali la

CHD, nelle quali si presume siano implicati più geni, ciascuno dall'effetto lieve o moderato. A dispetto di ciò e dell'attuale vastissima applicazione, gli studi di associazione sui geni candidati presentano più di una debolezza. Un limite, insito nel disegno dello studio, consiste nell'impossibilità di mettere in luce geni del tutto nuovi, ossia precedentemente insospettiti di un loro coinvolgimento nella patogenesi della malattia, e rispetto ai quali non è stata avanzata alcuna teoria o ipotesi<sup>79</sup>.

Altro limite riguarda l'interpretazione di un risultato positivo, che non si ottiene solo nella situazione più auspicabile, quando cioè la variante genetica di interesse condiziona direttamente la suscettibilità alla malattia, ma anche nel caso in cui la variante genetica sia fisicamente molto vicina al vero allele-malattia (condizione detta di "linkage disequilibrium"), o nel caso in cui il risultato sia falso positivo. Il riscontro di un risultato falso positivo è in realtà piuttosto frequente negli studi di associazione sui geni candidati, e non solo a causa dei bias metodologici tipici del disegno caso-controllo. Il motivo più serio, perché difficilmente evitabile, si presenta qualora il gruppo dei casi sia di differente origine etnica rispetto ai controlli. Il reclutamento di casi e controlli etnicamente disomogenei può condurre infatti ad associazioni spurie, ossia al riscontro di frequenze alleliche diverse nei due gruppi per ragioni indipendenti da una reale associazione tra variante genetica ed insorgenza della malattia.

## Conclusioni

La revisione della letteratura sui geni candidati per la CHD non mette in luce evidenze soddisfacenti. Nuovi approcci metodologici oggi disponibili, quali ad esempio quelli utilizzati nello studio PROCARDIS, potranno forse produrre risultati più definitivi nel prossimo futuro.

Tuttavia la rilettura metodologica, per quanto parziale, di quanto si è prodotto nel campo dell'epidemiologia genetica della CHD impone un atteggiamento di sobrietà rispetto alle attese e alle promesse conoscitive della genetica stessa.

## Riassunto

Lo studio sui geni di suscettibilità all'infarto è cominciato in modo sostanziale negli ultimi due decenni. In questo tempo attenzione e sforzi si sono concentrati in principal modo verso l'identificazione e la valutazione dei geni implicati in quei sistemi ed in quelle vie già precedentemente sospettati di un coinvolgimento nella patogenesi della cardiopatia ischemica quali, ad esempio, il metabolismo lipidico, i sistemi della coagulazione e fibrinolitico, i recettori di membrana piastrinici, i livelli di omocisteina circolante e il tono vascolare. Per-

tanto, l'identificazione delle concause genetiche dell'infarto miocardico si è basata finora su di un approccio "gene candidato", e su studi di associazione con disegno per lo più caso-controllo, che hanno condotto a risultati spesso contraddittori e generalmente difficili da confrontare. In questa rassegna si tenta di fare il punto sullo stato dell'arte nella ricerca su alcuni principali geni candidati per la cardiopatia ischemica, mettendo in luce forze e debolezze del metodo.

*Parole chiave:* Cardiopatia ischemica; Epidemiologia; Fattori di rischio; Genetica; Geni.

## Bibliografia

1. Heng C, Saha N, Low P. Evolution of the apolipoprotein B gene and coronary artery disease: a study in low and high risk Asians. *Ann Hum Genet* 1999; 63: 45-62.
2. Saha N, Tong M, Tay J, Jeyaseelan K, Humphries S. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in Chinese coronary artery disease patients. *Clin Genet* 1992; 42: 164-70.
3. Bohn M, Bakken A, Erikssen J, Berg K. XbaI polymorphism in DNA at the apolipoprotein B locus is associated with myocardial infarction (MI). *Clin Genet* 1993; 44: 241-8.
4. De Padua Mansur A, Annicchino-Bizzacchi J, Favarato D, Avakian SD, Machado Cesar LA, Franchini Ramires JA. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein B polymorphisms in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000; 85: 1089-93.
5. Marshall H, Morrison L, Wu L, et al. Apolipoprotein polymorphisms fail to define risk of coronary artery disease. Results of a prospective, angiographically controlled study. *Circulation* 1994; 89: 567-77.
6. Gardemann A, Ohly D, Fink M, et al. Association of the insertion/deletion gene polymorphism of the apolipoprotein B signal peptide with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1998; 141: 167-75.
7. Salazar LA, Hirata MH, Forti N, et al. PvuII intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. *Clin Chim Acta* 2000; 293: 75-88.
8. Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Jensen G, Nordestgaard BG. Apolipoprotein E genotype: epsilon32 women are protected while epsilon43 and epsilon44 man are susceptible to ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1192-9.
9. Wilson PW, Myers RH, Larson MG. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA* 1994; 272: 1666-71.
10. Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM, for the EARS Group. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1617-24.
11. Wilson PW, Schaefer E, Larson M, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-5.
12. Ou T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T, et al. Methyl-entetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart



- disease in Japanese: a case-control study. *Atherosclerosis* 1998; 137: 23-8.
13. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96: 3005-8.
  14. Ruiz J, Blanche H, James RW, et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346: 869-72.
  15. Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg 192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2120-6.
  16. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Atherosclerosis* 1996; 126: 299-303.
  17. Aubo C, Senti M, Marrugat J, et al. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. The REGICOR Investigators. *Eur Heart J* 2000; 21: 33-8.
  18. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1067-73.
  19. Carluccio M, Vanuzzo D, Pilotto L, et al. La componente genetica del rischio coronarico - Parte I. *Cardiologia* 1999; 44: 39-50.
  20. Naggert JK, Recinos A, Lamerdin JE, Krauss RM, Nishina PM. The atherogenic lipoprotein phenotype is not caused by a mutation in the coding region of the low density lipoprotein receptor gene. *Clin Genet* 1997; 51: 236-40.
  21. Ichinose A, Kuriyama M. Detection of polymorphisms in the 5'-flanking region of the gene for apolipoprotein(a). *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 6: 372-8.
  22. Brazier L, Tiret L, Luc G, et al. Sequence polymorphisms in the apolipoprotein(a) gene and their association with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction. The ECTIM Study. *Atherosclerosis* 1999; 144: 323-33.
  23. Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation* 1997; 96: 3281-6.
  24. Murata M, Kawano K, Matsubara Y, Ishikawa K, Watanabe K, Ikeda Y. Genetic polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Semin Thromb Haemost* 1998; 24: 245-50.
  25. Ito T, Ishida F, Shimodaira S, Kitano K. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha and plasma von Willebrand factor antigen in coronary artery disease. *Int J Hematol* 1999; 70: 47-51.
  26. Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 1999; 94: 46-51.
  27. Croft SA, Hamton KK, Daly ME. Kozak sequence polymorphism in the platelet GPIIb gene is not associated with risk of myocardial infarction. *Blood* 2000; 95: 2183-4.
  28. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 1090-4.
  29. Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, et al. The Leu<sup>33</sup>/Pro polymorphism (PI<sup>A1</sup>/PI<sup>A2</sup>) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1179-81.
  30. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PI<sup>A1</sup>/PI<sup>A2</sup> polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349: 385-8.
  31. Zhu MM, Weedon J, Clark LT. Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa PI<sup>A1</sup>/A<sup>2</sup> polymorphism with myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2000; 86: 1000-5.
  32. Behague I, Poirier O, Nicaud V, et al.  $\beta$ -fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Circulation* 1996; 93: 440-9.
  33. Wang XL, Wang J, McCredie RM, Wilcken DEL. Polymorphisms of factor V, factor VII, and fibrinogen genes. Relevance to severity of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 246-51.
  34. Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W, et al. Positive association of the beta fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to the increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1120-6.
  35. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet PI(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen beta 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 1424-31.
  36. Zito F, Di Castelnuovo A, Amore C, D'Orazio A, Donati MB, Iacoviello L. Bcl I polymorphism in the fibrinogen beta-chain gene is associated with the risk of familial myocardial infarction by increasing plasma fibrinogen levels. A case-control study in a sample of GISSI-2 patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3489-94.
  37. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, de Knijff P, et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338: 79-85.
  38. Tamaki S, Iwai N, Nakamura Y, Tsujita Y, Kinoshita M. Variation of the factor VII gene and ischemic heart disease in Japanese subjects. *Coron Artery Dis* 1999; 10: 601-6.
  39. Doggen CJ, Manger CV, Bertina RM, Reitsma PH, Vandembroucke JP, Rosendaal FR. A genetic propensity to high factor VII is not associated with the risk of myocardial infarction in men. *Thromb Haemost* 1998; 80: 281-5.
  40. Lane A, Green F, Scarabin PY, et al. Factor VII Arg/Gln353 polymorphism determines factor VII coagulant activity in patients with myocardial infarction (MI) and control subjects in Belfast and in France but is not a strong indicator of MI risk in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996; 119: 119-27.
  41. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332: 912-7.
  42. Dunn ST, Roberts CR, Schechter E, Moore WE, Lee ET, Eichner JE. Role of factor V Leiden mutation in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Thromb Res* 1998; 91: 91-9.
  43. Junker R, Heinrich J, Schulte H, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G- polymorphism and factor V Q506 mutation are not associated with myocardial infarction in young men. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 597-602.
  44. Gardemann A, Arsic T, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The factor II G20210A and factor V G1691A gene transitions and coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1999; 81: 208-13.
  45. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz WT, et al. Factor V Leiden (resistance for activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 89: 2817-21.
  46. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998; 97: 1037-41.
  47. Van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, et al. Tissue plas-

- minogen activator and risk of myocardial infarction. The Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 95: 2623-7.
48. Ridker PM, Baker MT, Hennekens CH, Stampfer MJ, Vaughan DE. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1687-90.
  49. Steeds R, Adams M, Smith P, Channer K, Samani NJ. Distribution of tissue plasminogen activator insertion/deletion polymorphism in myocardial infarction and control subjects. *Thromb Haemost* 1998; 79: 980-4.
  50. Ye S, Green FR, Scarabin PY, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 1995; 74: 837-41.
  51. Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 33-7.
  52. Doggen CJ, Bertina RM, Cats VM, Reitsma PH, Rosendaal FR. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999; 82: 115-20.
  53. Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchionni R, Donati MB. The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 1029-30.
  54. Carluccio M, Vanuzzo D, Pilotto L, et al. La componente genetica del rischio coronarico - Parte II. *Cardiologia* 1999; 44: 155-67.
  55. Lane A, Cruickshank JK, Mitchell J, Henderson A, Humphries S, Green F. Genetic and environmental determinants of factor VII coagulant activity in ethnic groups at differing risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1992; 94: 43-50.
  56. Manzoli A, Andreotti F, Leone AM, Sperti G, Zecchi P, Di Sciascio G. Vascular and haemostatic gene polymorphisms associated with non-fatal myocardial infarction: a critical review. *Ital Heart J* 2000; 1: 184-93.
  57. Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, et al. Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; 94: 2154-8.
  58. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation* 1996; 94: 1812-4.
  59. Ma J, Stampfer M, Hennekens CH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94: 2410-6.
  60. Van Bockxmeer FM, Mamotte CDS, Vasikaran SD, Taylor RR. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation* 1997; 95: 21-3.
  61. Verhoef P, Rimm EB, Hunter DJ, et al. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and risk of coronary heart disease: results among US men. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 353-9.
  62. Gardemann A, Weidemann H, Philipp M, et al. The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C<sub>677</sub>T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999; 20: 584-92.
  63. Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 2573-7.
  64. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensinogen-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-4.
  65. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 706-11.
  66. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 708-12.
  67. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease. Meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 484-92.
  68. Keavney B, McKenzie C, Parish S, et al. Large-scale test of hypothesized associations between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *Lancet* 2000; 355: 434-42.
  69. Katsuya T, Koike G, Yee T, et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1600-3.
  70. Ludwig E, Borecki I, Ellison R, et al. Associations between candidate loci angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen with coronary heart disease and myocardial infarction: the NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol* 1997; 7: 3-12.
  71. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE Study. *Hum Genet* 1997; 99: 66-73.
  72. Ko YL, Ko YS, Wang SM, et al. Angiotensinogen and angiotensin-I converting enzyme gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease in Chinese. *Hum Genet* 1997; 100: 210-4.
  73. Fatini C, Abbate R, Pepe G, et al. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen gene polymorphisms. *Eur Heart J* 2000; 21: 633-8.
  74. Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Grønholdt MLM, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. Angiotensinogen mutations and risk for ischemic heart disease, myocardial infarction, and ischemic cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 2001; 134: 941-54.
  75. Gardemann A, Nguen Q, Humme J, et al. Angiotensin II type 1 receptor A1166 gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J* 1998; 19: 1657-65.
  76. Berge K, Bakken A, Bohn M, Erikssen J, Berg K. A DNA polymorphism and the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. *Clin Genet* 1997; 52: 71-6.
  77. Rice G, Foy C, Grant P. Angiotensin converting enzyme and angiotensin II type I-receptor gene polymorphisms and risk of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 746-53.
  78. Hines LM, Stampfer MJ, Ma J, et al. Genetic variation in alcohol dehydrogenase and beneficial effect of moderate alcohol consumption on myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 549-55.
  79. Ellsworth DL, Manolio TA. The emerging importance of genetics in epidemiologic research II. Issues in study design and gene mapping. *Ann Epidemiol* 1999; 9: 75-90.