

Efecto aditivo de diferentes variantes genéticas en el riesgo de cardiopatía isquémica

Carla Lluís-Ganella^a, Gavin Lucas^a, Isaac Subirana^{a,b}, Mariano Sentí^{a,c}, Jordi Jimenez-Conde^d, Jaume Marrugat^a, Marta Tomás^a y Roberto Elosua^{a,b}

^aGrupo de Epidemiología y Genética Cardiovascular (EGEC-ULEC). Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM-Hospital del Mar). Barcelona. España.

^bCIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Barcelona. España.

^cUniversitat Pompeu Fabra. Barcelona. España.

^dServicio de Neurología. Hospital del Mar. Barcelona. España.

Introducción y objetivos. La cardiopatía isquémica (CI) tiene un componente genético significativo y en los últimos años se han identificado variantes genéticas asociadas con ella. El objetivo de este estudio fue evaluar la magnitud de la asociación entre una puntuación individual de riesgo genético, basada en el número de alelos de riesgo acumulados en un conjunto de variantes genéticas de interés, y la presencia de CI.

Métodos. Estudio de los datos *in silico* del consorcio de casos y controles del Wellcome Trust. Se incluyó a 1.988 pacientes con CI y 5.380 controles. Se analizó la asociación entre una puntuación de riesgo genética y CI mediante regresión logística.

Resultados. Se seleccionaron nueve variantes genéticas asociadas con CI de forma independiente de los factores de riesgo. Existe una asociación lineal entre el número de alelos de riesgo y el riesgo de sufrir CI: *odds ratio* (OR) por incremento de alelo = 1,18 (intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,15-1,22; $p = 2 \times 10^{-16}$). La OR de CI del último quintil del número de alelos de riesgo

acumulados respecto al primero fue 2,21 (IC del 95%, 1,87-2,61; $p = 5 \times 10^{-21}$).

Conclusiones. Las nueve variantes genéticas asociadas con CI independientemente de los factores de riesgo cardiovascular permiten crear una puntuación de riesgo genético de CI que se asocia con la presencia de la enfermedad. Es necesario realizar estudios de cohorte que analicen si esta puntuación genética puede mejorar la capacidad predictiva o la reclasificación de las funciones de riesgo clásicas.

Palabras clave: *Cardiopatía isquémica. Genética. Polimorfismos. Riesgo genético. Variantes genéticas.*

VÉASE EDITORIAL EN PÁGS. 890-2

Los fondos para el proyecto fueron suministrados por Wellcome Trust bajo la concesión 076113. Además, este análisis ha sido financiado por el ACC1Ó/FEDER (CIDEM RD08-1-0024), Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto Carlos III/FEDER (Red HERACLES RD06/0009); el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI061254); G.L. tiene una ayuda del Programa Juan de la Cierva (JCI-2009_04684); M.T. tiene una ayuda del Comisionado para las Universidades y la Investigación del Departamento de Innovación, Universidades y Empresa de la Generalitat de Catalunya (2007BP-B100068); la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias y de Investigación de la Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1195); Fundació La Marató TV3 (081810,080431).

Conflicto de intereses:

Los autores del Grupo de Epidemiología y Genética Cardiovascular declaran que están colaborando con la empresa Gendiag.exe en el desarrollo y validación de una prueba genética para mejorar la capacidad predictiva de las funciones de riesgo cardiovascular. Esta colaboración se formalizó inicialmente con un contrato de colaboración a nivel institucional entre la Fundación IMIM y Gendiag.exe, y actualmente con una ayuda de ACC1Ó/FEDER de la Generalitat de Catalunya en la que también participa la empresa Ferrer inCode.

Correspondencia: Dr. R. Elosua.

Grupo de Epidemiología y Genética Cardiovascular (EGEC-ULEC). Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM-Hospital del Mar).

Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. España.

Correo electrónico: relousa@imim.es

Recibido el 4 de febrero de 2010.

Aceptado para su publicación el 19 de abril de 2010.

Additive Effect of Multiple Genetic Variants on the Risk of Coronary Artery Disease

Introduction and objectives. Coronary artery disease (CAD) has a substantial genetic component and, in recent years, a number of genetic variants associated with the disease have been identified. The objective of this study was to evaluate the magnitude of the association between a genetic risk score, which is based on the accumulated number of risk alleles in all genetic variants of interest, and the presence of CAD.

Methods. The study involved *in silico* data from the Wellcome Trust Case-Control Consortium on 1988 patients with CAD and 5380 controls. The association between the genetic risk score and CAD was assessed using logistic regression analysis.

Results. Nine genetic variants independently associated with CAD irrespective of other cardiovascular risk factors were selected. There was a linear association between the number of risk alleles and the risk of presenting with CAD (*odds ratio* [OR] for an increase of one allele=1.18; 95% confidence interval [CI], 1.15-1.22; $P=2 \times 10^{-16}$). The OR for CAD for the last quintile of the accumulated number of risk alleles relative to the first was 2.21 (95%CI, 1.87-2.61; $P=5 \times 10^{-21}$).

Conclusions. A genetic risk score based on nine genetic variants independently associated with CAD irrespective of other cardiovascular risk factors was associated with the presence of the disease. Cohort studies are needed to determine whether this genetic risk score can improve the predictive capacity or the risk classification of classical risk functions.

ABREVIATURAS

CI: cardiopatía isquémica.
DE: desviación estándar.
FRCV: factor de riesgo cardiovascular clásico.
GWAS: estudio de asociación de genoma completo.
IC: intervalo de confianza.
OR: *odds ratio*.
WTCCC: Wellcome Trust Case Control Consortium.

Key words: *Coronary artery disease. Genetics. Polymorphisms. Genetic risk. Genetic variants.*

Full English text available from: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica (CI) es una enfermedad de etiología compleja en la que intervienen factores genéticos y ambientales y la interacción entre ellos. Se estima que los factores genéticos explican entre un 40 y un 55% de la variabilidad existente en la población (heredabilidad) para la aparición de CI¹. En los últimos 3 años se han realizado estudios de asociación de genoma completo (Genome-Wide Association Studies [GWAS]) que han identificado de forma consistente nuevas variantes genéticas asociadas con diferentes enfermedades complejas, entre ellas la CI²⁻⁸. Algunas de estas variantes genéticas están a la vez relacionadas con algún factor de riesgo cardiovascular clásico (FRCV), pero otras son independientes de ellos. El descubrimiento de estas variantes genéticas asociadas independientemente con CI puede permitir identificar nuevos mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad y nuevas dianas terapéuticas. Además, estas variantes podrían utilizarse como nuevos biomarcadores para contribuir a mejorar la capacidad de predicción del riesgo coronario o la reclasificación de individuos en riesgo intermedio, al aportar información adicional a la ya incluida en las funciones de riesgo clásicas⁹. La mejora de las funciones de riesgo mediante la incorporación de nuevos biomarcadores tiene una gran relevancia clínica, ya que las funciones actuales tienen una sensibilidad baja y gran parte de los casos se presentan en personas con riesgo intermedio¹⁰.

Recientemente, la American Heart Association (AHA) ha publicado unas recomendaciones en las que se definen las diferentes fases en la evaluación de los nuevos biomarcadores de riesgo y su posterior aplicación en la práctica clínica¹¹. En la primera

fase, denominada prueba de concepto, se debe determinar si el nivel de exposición al biomarcador es diferente en individuos con y sin la enfermedad. En fases posteriores, se deben realizar estudios de cohorte para analizar la mejora en la discriminación, su impacto en la práctica clínica diaria y valorar la relación entre el coste y la efectividad.

Los objetivos del presente estudio son: *a)* seleccionar variantes genéticas asociadas con CI e independientes de los FRCV, y *b)* responder a la primera fase de la evaluación de un nuevo biomarcador propuesta por la AHA, determinando la magnitud de la asociación entre una puntuación individual de riesgo genético, basada en el número de alelos de riesgo acumulados que cada individuo tiene en un grupo de variantes genéticas seleccionadas, y la presencia de CI.

MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio de casos y controles con datos *in silico* procedentes del Consorcio de casos y controles del Wellcome Trust (Wellcome Trust Case Control Consortium [WTCCC])⁸.

Muestra en estudio

Los casos (n = 1.988) se seleccionaron de la primera fase del estudio WTCCC⁸. Tal como se describe en el estudio original, los casos de CI presentaban antecedentes de infarto de miocardio o revascularización coronaria (incluidas cirugía de *bypass* coronario o angioplastia coronaria) antes de los 66 años. Los controles se seleccionaron de dos estudios diferentes: *a)* 2.706 controles procedentes de una cohorte británica de personas nacidas en 1958 (1958 Birth Cohort Controls [58C])¹², y *b)* 2.674 controles procedentes de donantes de sangre (UK Blood Services Controls [NBS])⁸, ambos incluidos en el proyecto WTCCC. Aunque en el estudio original⁸ se presentaron datos de 3.004 controles, recientemente se han puesto a disposición de la comunidad científica¹³ datos genotípicos individuales de un total de 5.380 controles, que son los que se han incluido en el presente análisis.

Selección de variantes genéticas

Las variantes genéticas se seleccionaron a partir de datos procedentes de la base de datos de GWAS (catálogo de GWAS) del National Human Genome Research Institute (NHGRI)¹⁴. Las variantes genéticas debían estar asociadas con CI y ser independientes de los FRCV según datos procedentes de

ese catálogo¹⁴. Para identificar las variantes asociadas con CI se incluyeron los términos clínicos: «Coronary Artery Disease», «Coronary Disease», «Myocardial Infarction», «Early onset Myocardial Infarction» en la búsqueda en el catálogo de GWAS del NHGRI. Se excluyeron las variantes con un valor de *p* en el estudio descubridor $> 1 \times 10^{-6}$. De las variantes genéticas que estuvieran relacionadas entre sí por desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,9$; HapMap CEU —residentes de Utah con antepasados del Norte y el Este de Europa—), se seleccionó sólo una. Para excluir las variantes asociadas con FRCV, se buscó si había alguna asociación entre la variante genética de interés o la región cromosómica donde se localizaba esta variante con los FRCV en el catálogo de GWAS del NHGRI; además, se excluyeron también las variantes localizadas en genes relacionados con los FRCV teniendo en cuenta el conocimiento derivado de estudios previos (p. ej., gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad [LDL], *LDLR*).

Se realizó un control de calidad de los resultados para todas las variantes genéticas seleccionadas, verificando el equilibrio de Hardy-Weinberg en controles, y que la frecuencia del alelo minoritario fuera superior al 1%. Se realizaron también controles de calidad en los individuos y se excluyó a los participantes que no tuvieran datos sobre al menos una de las variantes genéticas, al no poderse generar una puntuación para todos los alelos de riesgo posibles (19 individuos excluidos).

Para cada una de las variantes se definió un alelo de riesgo, es decir, el nucleótido que al estar presente confiere un mayor riesgo de sufrir un acontecimiento coronario, según los datos proporcionados en el estudio de descubrimiento de las variantes.

Estimación de la puntuación individual de riesgo genético

Para calcular la puntuación de riesgo genético, se contabilizó el número de alelos de riesgo acumulados en cada individuo en el conjunto de las variantes genéticas seleccionadas. En cada una de las variantes cada individuo puede tener 0, 1 o 2 alelos de riesgo. Al calcular el sumatorio de alelos de riesgo acumulados en el conjunto de las variantes seleccionadas ($n = 9$), a cada individuo se le asignó una puntuación de 0 a 18. Se asumió que el efecto de los diferentes alelos analizados era similar y, por este motivo, se dio a todos el mismo peso.

También se calculó una puntuación de riesgo genético individual ponderando cada una de las variantes seleccionadas por la magnitud de su efecto individual, extraída de los datos presentados en los estudios de descubrimiento.

Análisis estadístico

En un análisis inicial se analizaron las variantes genéticas seleccionadas de forma individual y se determinó la asociación entre cada variante y la presencia de CI mediante un modelo genético aditivo estimando la OR de CI por incremento de alelo de riesgo.

Para considerar el efecto aditivo del conjunto de las diferentes variantes genéticas seleccionadas, primero se analizó la distribución del número de alelos de riesgo acumulado en casos y controles, y se comparó la diferencia de la media de la puntuación de riesgo genético entre casos y controles mediante la prueba de la *t* de Student.

Posteriormente, se utilizó la regresión logística para estimar la asociación entre la puntuación de riesgo genético y el riesgo de CI y se realizaron varios tipos de análisis:

1. Se consideró esta variable de riesgo genético como una variable categórica considerando como grupo de referencia al grupo de personas portadoras de siete alelos de riesgo, que es el valor más próximo a la mediana en controles y conforma el grupo con mayor número de individuos, lo que permite obtener unos estimadores de riesgo más precisos. Se estimó la OR para cada categoría de la puntuación de riesgo genético (grupo de portadores de ocho alelos frente a portadores de siete alelos; portadores de nueve alelos frente a siete; portadores de seis alelos frente a siete, y así sucesivamente).

2. Se calculó la OR por incremento de alelo de riesgo tomando esta variable como continua y asumiendo que el riesgo es constante por incremento de alelo en el intervalo de valores observados, y se analizó si la asociación entre número de alelos y riesgo de CI era lineal.

3. Se repitió el análisis explicado en 1, definiendo grupos basados en los quintiles de la puntuación de riesgo genético obtenidos en el grupo de controles y tomando como referencia el primer quintil.

También se analizó si existían interacciones entre las variantes genéticas de interés para determinar si el efecto de la combinación era superior al aditivo.

Para todos los análisis realizados se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los análisis se realizaron mediante el programa R¹⁵.

RESULTADOS

En el catálogo de GWAS del NHGRI¹⁴, y para los fenotipos seleccionados, se identificó un total de 21 variantes genéticas únicas (tabla 1). En la figura 1 se presenta el diagrama de flujo del proceso

TABLA 1. Descripción de las variantes genéticas asociadas con cardiopatía isquémica identificadas en el catálogo de estudios de asociación de genoma completo y razones para su exclusión de nuestro estudio

| Referencia | Variante genética | Región cromosómica ^a | Genes cercanos a la variante identificada ^a | Alelos | MAF ^a | Alelo menor ^b | Alelo de riesgo ^b | OR (IC del 95%) ^a | p ^a | Motivo de exclusión |
|------------|-------------------|---------------------------------|--|--------|------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------|
| 4 | rs646776 | 1p13.3 | <i>CELSR2, PSRC1, SORT1</i> | T/C | 0,19 | C | T | 1,19 (1,13-1,26) | 8 × 10 ⁻¹² | 3 |
| 6 | rs599839 | 1p13.3 | <i>PSRC1</i> | A/G | 0,23 | G | A | 1,29 (1,18-1,4) | 4 × 10 ⁻⁹ | 3 |
| 4 | rs11206510 | 1p32.3 | <i>PCKS9</i> | C/T | 0,19 | C | T | 1,15 (1,1-1,21) | 1 × 10 ⁻⁸ | 3 |
| 4,6 | rs17465637 | 1q41 | <i>MIA3</i> | A/C | 0,29 | A | C | 1,20 (1,12-1,3) | 1 × 10 ⁻⁶ | — |
| 8 | rs17672135 | 1q43 | Intergénico | C/T | 0,13 | C | C | 1,43 (1,23-1,64) | 2 × 10 ⁻⁶ | 1 |
| 4 | rs6725887 | 2q33.1 | <i>WDR12</i> | C/T | 0,14 | C | C | 1,17 (1,11-1,23) | 1 × 10 ⁻⁸ | — |
| 6 | rs2943634 | 2q36.3 | <i>IRS1</i> | A/C | 0,35 | A | C | 1,21 (1,13-1,3) | 2 × 10 ⁻⁷ | 3 |
| 2 | rs9818870 | 3q22.3 | <i>MRAS</i> | C/T | 0,15 | T | T | 1,15 (1,11-1,19) | 7 × 10 ⁻¹³ | — |
| 4 | rs12526453 | 6p24.1 | <i>PHACTR1</i> | C/G | 0,35 | G | C | 1,12 (1,08-1,17) | 1 × 10 ⁻⁹ | — |
| 6 | rs6922269 | 6q25.1 | <i>MTHFD1L</i> | A/G | 0,25 | A | A | 1,23 (1,15-1,33) | 3 × 10 ⁻⁸ | — |
| 3 | rs10757278 | 9p21.3 | <i>CDKN2A/2B</i> | A/G | 0,45 | A | G | 1,28 (1,22-1,35) | 1 × 10 ⁻²⁰ | 2 |
| 4 | rs4977574 | 9p21.3 | <i>CDKN2A/2B</i> | A/G | 0,44 | A | G | 1,29 (1,25-1,34) | 3 × 10 ⁻⁴⁴ | 2 |
| 6,8 | rs1333049 | 9p21.3 | <i>CDKN2A/2B</i> | C/G | 0,47 | C | C | 1,47 (1,27-1,7) | 1 × 10 ⁻¹³ | — |
| 4 | rs1746048 | 10q11.21 | <i>CXCL12</i> | C/T | 0,16 | T | C | 1,17 (1,11-1,24) | 7 × 10 ⁻⁹ | — |
| 6 | rs501120 | 10q11.21 | <i>CXCL12</i> | T/C | 0,13 | C | T | 1,33 (1,2-1,48) | 9 × 10 ⁻⁸ | 2 |
| 2 | rs2259816 | 12q24.31 | <i>HNF1A</i> | T/G | 0,36 | T | T | 1,08 (1,05-1,11) | 5 × 10 ⁻⁷ | 4 |
| 6 | rs17228212 | 15q22.33 | <i>SMAD3</i> | C/T | 0,30 | C | C | 1,21 (1,13-1,3) | 2 × 10 ⁻⁷ | — |
| 8 | rs8055236 | 16q23.3 | intergénico | G/T | 0,20 | T | G | 1,91 (1,33-2,74) | 6 × 10 ⁻⁶ | 1 |
| 4 | rs1122608 | 19p13.2 | <i>LDLR</i> | G/T | 0,25 | T | G | 1,15 (1,1-1,2) | 2 × 10 ⁻⁹ | 4 |
| 4 | rs9982601 | 21q22.11 | <i>SLC5A3, MRPS6, KCNE2</i> | C/T | 0,13 | T | T | 1,20 (1,14-1,27) | 6 × 10 ⁻¹¹ | — |
| 8 | rs688034 | 22q12.1 | intergénico | C/T | 0,31 | T | T | 1,11 (0,98-1,25) | 4 × 10 ⁻⁶ | 1 |

—: variantes no excluidas; IC: intervalo de confianza; MAF: frecuencia del alelo menor; OR: *odds ratio*.

^aDatos que provienen del estudio de descubrimiento.

^bDatos de la población CEU (residentes de Utah con antepasados del norte y el este de Europa) de HapMap.

La información de las asociaciones se ha extraído del catálogo de GWAS del NHGRI¹⁴ y se ha revisado en los artículos que establecieron las asociaciones.

Motivos de exclusión:

1. Valor de p del estudio de descubrimiento > 1 × 10⁻⁶.

2. Ya incluida otra variante genética que captura esta variante ($r^2 > 0,9$ según datos obtenidos de la muestra CEU de HapMap).

3. Variante genética asociada con factores de riesgo cardiovascular o en desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,8$ según datos obtenidos de la muestra CEU de HapMap) con otra/s variante/s genética/s asociada/s con factores de riesgo cardiovascular en este catálogo.

4. Variante genética situada dentro de un gen asociado con factores de riesgo cardiovascular (receptor de LDL [*LDLR*]: variaciones genéticas en este gen causan hipercolesterolemia familiar autosómica; *HNF1A*: defectos en este gen se relacionan con diabetes MODY3), según datos obtenidos de NCBI (RefSeq).

de selección de las variantes genéticas de interés para el presente estudio. Con este procedimiento se seleccionaron nueve variantes genéticas asociadas con CI de forma independiente de los FRCV.

En la tabla 2 se presentan los resultados de las asociaciones de cada una de las nueve variantes seleccionadas con CI en la muestra ampliada del WTCCC analizada en este estudio. En este análisis, la mayoría de las variantes se asociaban con CI, aunque dos variantes presentaban una asociación en la dirección esperada pero que no llegaba a la significación estadística.

La figura 2A muestra la distribución del número de alelos de riesgo en casos y controles. Se observa la misma forma en esta distribución para ambos grupos, aunque con un desplazamiento hacia la derecha del número de alelos en los casos (media de alelos de riesgo ± DE, 7,9 ± 1,8 en casos y 6,8 ± 1,8 en controles; $p = 2 \times 10^{-16}$). Para determinar si el incremento de riesgo era constante en los diferentes grupos definidos por el número de alelos, se calculó la magnitud de riesgo de CI en cada grupo tomando

como grupo de referencia el de siete alelos de riesgo (mediana en controles). En la figura 2B se presenta la OR y el valor del coeficiente de regresión (β) para cada grupo respecto al grupo de referencia, el cambio del valor de los coeficientes de regresión ($\Delta\beta$) entre categorías consecutivas, y el valor de p de la prueba exacta de Fisher para diferencias entre casos y controles. La figura 2A incluye una representación gráfica de los valores de los coeficientes de regresión obtenidos (β).

El incremento de riesgo por incremento de alelo parece constante en el intervalo de valores observado. Para cuantificar este incremento por alelo, se consideró la variable número de alelos de riesgo como una variable continua y se estimó que la OR por incremento de alelo era de 1,18 (intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,15-1,22; $p = 2 \times 10^{-16}$); este modelo lineal explicaba un 92% de la variabilidad de los valores de β obtenidos.

Cuando se realizaron estos análisis ponderando cada una de las variantes seleccionadas por la magnitud de su efecto individual, los resultados fueron

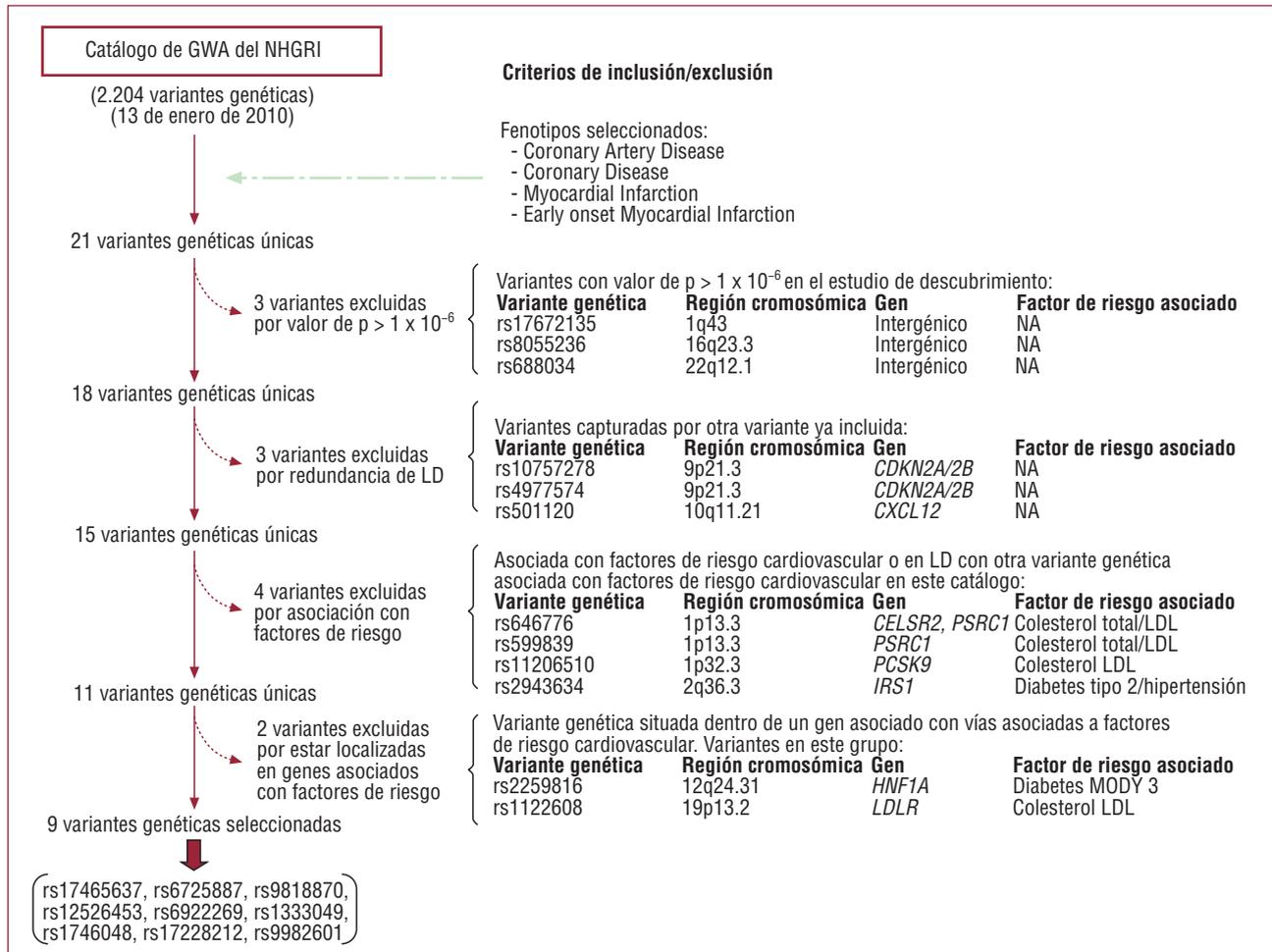


Fig. 1. Diagrama de flujo del proceso realizado para la selección de las variantes genéticas en estudio.

TABLA 2. Asociación entre las variantes genéticas seleccionadas y el riesgo de cardiopatía isquémica en la muestra ampliada del consorcio de casos y controles del Wellcome Trust (WTCCC)

| Resultados obtenidos en el estudio descubridor de la variante genética y registrados en el catálogo de GWAS del NHGRI ^a | | | | | | | Datos de asociación obtenidos en este análisis ^b | | | | | | |
|--|-------------------------|--------------------|---|------------------|-----------------|------------------|---|-------------|---------------|-----------|------------------|---------------------|-------|
| Referencia | Variante genética | Región cromosómica | Genes cercanos a la variante identificada | Alelos de riesgo | Alelo de riesgo | OR (IC del 95%) | p | Alelo menor | MAF controles | MAF casos | OR (IC del 95%) | p | EHW |
| 4,6 | rs17465637 ^c | 1q41 | <i>MIA3</i> | C/A | C | 1,20 (1,12-1,3) | 1×10^{-6} | A | 0,287 | 0,251 | 1,24 (1,13-1,36) | 1×10^{-5} | 0,894 |
| 4 | rs6725887 | 2q33.1 | <i>WDR12</i> | T/C | C | 1,17 (1,11-1,23) | 1×10^{-8} | C | 0,133 | 0,142 | 1,09 (0,98-1,21) | 1×10^{-1} | 0,058 |
| 2 | rs9818870 | 3q22.3 | <i>MRAS</i> | C/T | T | 1,15 (1,11-1,19) | 7×10^{-13} | T | 0,153 | 0,169 | 1,12 (1,02-1,23) | 2×10^{-2} | 0,528 |
| 4 | rs12526453 | 6p24.1 | <i>PHACTR1</i> | C/G | C | 1,12 (1,08-1,17) | 1×10^{-9} | G | 0,341 | 0,316 | 1,13 (1,04-1,24) | 4×10^{-3} | 0,927 |
| 6 | rs1474787 ^d | 6q25.1 | <i>MTHFD1L</i> | C/T | T | 1,23 (1,15-1,33) | 3×10^{-8} | T | 0,27 | 0,297 | 1,09 (0,99-1,19) | 1×10^{-1} | 0,557 |
| 3-6,8 | rs1333049 ^e | 9p21.3 | <i>CDKN2A/2B</i> | G/C | C | 1,47 (1,27-1,7) | 1×10^{-13} | C | 0,478 | 0,445 | 1,43 (1,28-1,6) | 7×10^{-17} | 0,428 |
| 4,6 | rs1746048 ^e | 10q11.21 | <i>CXCL12</i> | C/T | C | 1,17 (1,11-1,24) | 7×10^{-9} | T | 0,128 | 0,115 | 1,18 (1,06-1,31) | 2×10^{-2} | 0,179 |
| 6 | rs17228212 | 15q22.33 | <i>SMAD3</i> | C/T | C | 1,21 (1,13-1,3) | 2×10^{-7} | C | 0,298 | 0,331 | 1,16 (1,06-1,27) | 1×10^{-4} | 0,745 |
| 4 | rs9978407 ^d | 21q22.11 | <i>SLC5A3, MRPS6</i> | G/A | A | 1,20 (1,14-1,27) | 6×10^{-11} | A | 0,134 | 0,159 | 1,24 (1,12-1,37) | 1×10^{-4} | 0,481 |

EHW: valor de p obtenido en la prueba para analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg realizado en controles; IC: intervalo de confianza; MAF: frecuencia del alelo menor; OR: odds ratio.

^aValores descritos en el estudio de descubrimiento de la variante genética.

^bDatos obtenidos en la muestra de 1.988 casos y 5.380 controles del estudio WTCCC⁸ analizada.

^cVariante genética que se ha visto asociadas en más de un GWAS. Los datos que se han incluido en esta tabla son los pertenecientes al primer estudio que definió la asociación.

^dVariante genética que capturan respectivamente las variantes rs6922269, rs9982601 descritas en la base de datos de GWAS.

La región cromosómica y el gen presentados se extrajeron del catálogo de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) del NHGRI¹⁴, que a su vez extrajo la información de UCSC Genome Browser y tal como se describía en el artículo respectivamente. Las asociaciones que se presentan son para un modelo de herencia aditivo, es decir, que por cada copia del alelo de riesgo se ve incrementado el riesgo de cardiopatía isquémica según se indica.

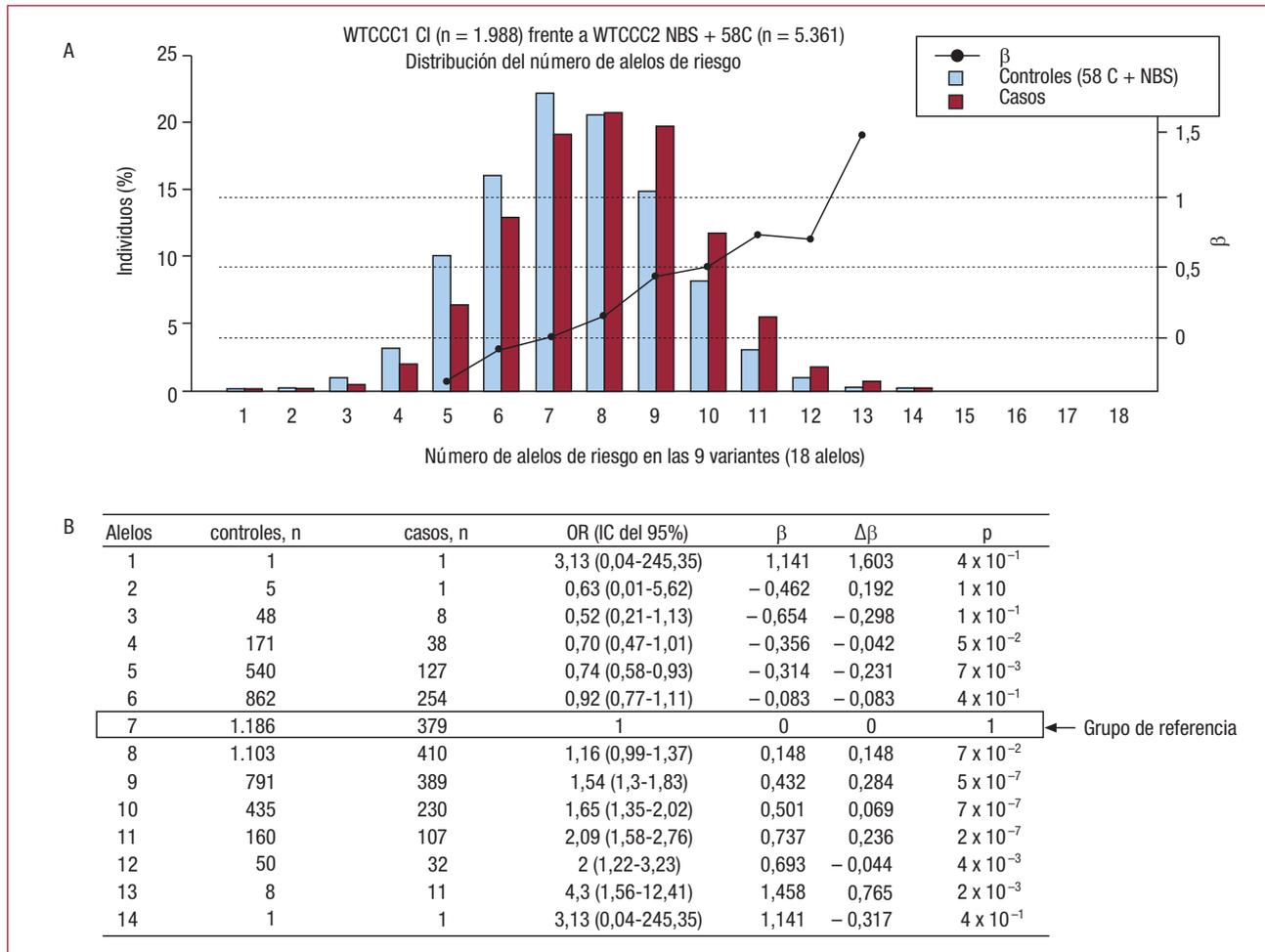


Fig. 2. A: distribución del porcentaje de individuos según el número de alelos de riesgo en la muestra analizada de casos y controles. B: magnitud de la asociación entre la exposición a diferentes categorías de número de alelos de riesgo y la presencia de cardiopatía isquémica definiendo como grupo de referencia el de siete alelos de riesgo. $\Delta\beta$: cambio en el coeficiente de regresión entre categorías de alelos consecutivas; β : coeficiente de regresión; 58C: controles del estudio 1958 Birth Cohort Controls^{8,23}; IC: intervalo de confianza; NBS: controles del estudio UK Blood Services Controls⁸; OR: *odds ratio*.

casi idénticos (OR por incremento de alelo = 1,18; IC del 95%, 1,14-1,21).

No se observó ninguna interacción entre variantes genéticas estadísticamente significativa, resultado que también apunta a un efecto aditivo de las variantes analizadas.

Los resultados del análisis definiendo cinco grupos según los quintiles de número de alelos de riesgo y tomando como referencia el quintil con menor número de alelos se presentan en la figura 3A. Los incrementos del riesgo ($\Delta\beta$) entre los quintiles consecutivos son similares (incremento medio de β , 0,198), y la OR observada entre los extremos es 2,21 (fig. 3B).

DISCUSIÓN

En este estudio hemos seleccionado nueve variantes genéticas asociadas con CI que, según los

conocimientos actuales, no están relacionadas con FRCV. Atendiendo a las recomendaciones de la AHA sobre la evaluación de nuevos biomarcadores de riesgo, los datos de este estudio responden de forma favorable a la primera fase de esta evaluación, pues se observa que el número de alelos de riesgo acumulado de estas variantes genéticas se asocia con el riesgo de CI.

Hemos comprobado que la asociación entre el número de alelos de riesgo y el riesgo de CI es lineal y directa, de manera que a mayor número de alelos de riesgo, mayor la probabilidad de presentar CI. Esta asociación lineal se ha observado con otros fenotipos como presión arterial¹⁶ y diabetes mellitus¹⁷. En este estudio hemos considerado que el peso de cada alelo de riesgo era similar y no hemos ponderado el efecto de cada variante genética según la magnitud de su asociación con CI, que se define por el coeficiente de regresión. En un análisis de sensibi-

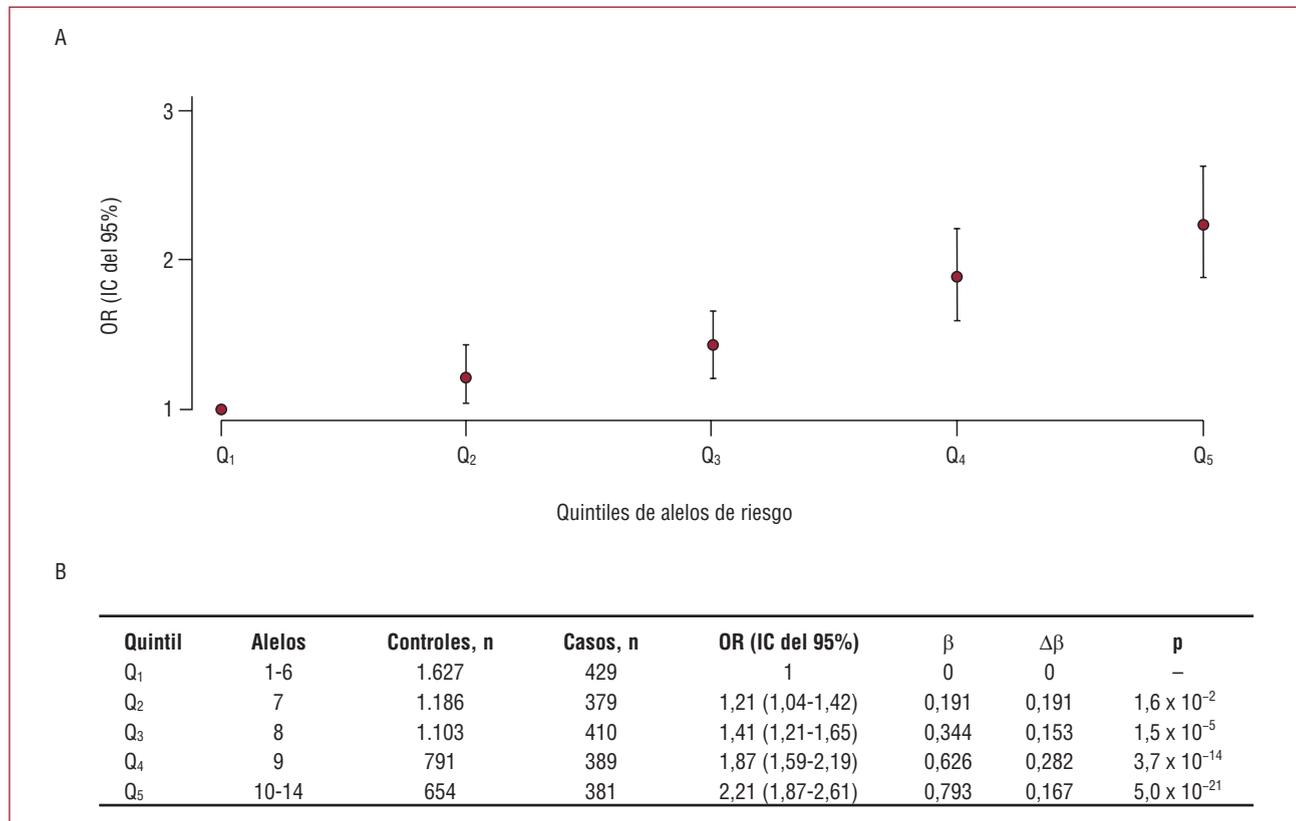


Fig. 3. A: odds ratio e intervalo de confianza del 95% de la asociación entre quintiles de números de alelos de riesgo y presencia de cardiopatía isquémica tomando como categoría de referencia el quintil con menor número de alelos de riesgo. B: magnitudes de dichas asociaciones. β : coeficiente de regresión; $\Delta\beta$: cambio en el coeficiente de regresión entre categorías de alelos consecutivas; 58C: controles del estudio 1958 Birth Cohort Controls^{8,23}; IC: intervalo de confianza; NBS: controles del estudio UK Blood Services Controls⁸; OR: odds ratio.

lidad, hemos realizado esta ponderación según los coeficientes obtenidos en nuestro análisis, y los resultados fueron similares a los presentados. Esta similitud de resultados obtenida al analizar el efecto de varios alelos ponderando y no ponderando por la magnitud de su asociación también se ha observado en otros fenotipos, como la diabetes mellitus¹⁸.

Hemos observado que la magnitud de la asociación observada, determinada por el coeficiente de regresión, es similar a la observada en algunos FRCV incluidos en las funciones de riesgo coronario. Por ejemplo, en la función de riesgo de Framingham y sus adaptaciones¹⁹, la diferencia en varones entre los coeficientes de regresión de los extremos de exposición de la variable colesterol (< 160 y ≥ 280 mg/dl) es 1,32 (que correspondería a RR = 3,74) y de la variable presión arterial (óptima y grado II-III de hipertensión) es 0,62 (RR = 1,86). En nuestro análisis, la diferencia entre los coeficientes de regresión de las categorías extremas de quintiles de número de alelos es de 0,79 (OR = 2,2), similar a los valores de la presión arterial, y considerando el número de alelos y tomando como extremos los grupos de cuatro y doce alelos de riesgo,

la diferencia en los coeficientes de regresión es de 1,05 (OR = 2,86), ligeramente inferior al del colesterol. Hay que tener en cuenta que una de las limitaciones de esta comparación es que estamos comparando coeficientes de regresión obtenidos en estudios de cohorte con otros obtenidos en estudios de casos y controles, que suelen sobrestimar ligeramente la magnitud de la asociación.

La siguiente fase en la evaluación de estos biomarcadores genéticos es evaluar en estudios de cohorte si contribuyen a mejorar la capacidad de predicción del riesgo coronario o la reclasificación de individuos, especialmente los que están en riesgo intermedio⁹. Ya hay algunos estudios de cohorte que han incluido una variante genética del cromosoma 9p21 en las funciones de riesgo sin que se observe una mejora relevante en la capacidad de discriminación de los modelos predictivos²⁰⁻²², probablemente porque la magnitud de la asociación de la variante analizada es pequeña (riesgo relativo [RR] $< 1,3$). Otros estudios han incluido una puntuación de riesgo genético basada en el número de alelos de riesgo acumulados en un individuo^{4,23-26}, con el objetivo de aumentar la magnitud de la asociación observada. Entre éstos hay cuatro estudios de

cohorte²³⁻²⁶, el primero basado en genes candidatos, en el que se observó que la inclusión de una puntuación de riesgo genético puede contribuir a mejorar la capacidad de predicción de las funciones de riesgo clásicas²³. En dos^{24,25} se incluían varios polimorfismos asociados con el metabolismo lipídico, y se observó que la puntuación de riesgo genético se asociaba con el riesgo de sufrir un acontecimiento cardiovascular, y aunque no mejoraban la capacidad predictiva medida mediante el estadístico C, sí que mejoraba ligeramente la reclasificación de individuos en categorías de riesgo. Una de las limitaciones de estos estudios es que la inclusión de marcadores en las funciones de riesgo que están asociados con variables o factores ya incluidos no introduce información adicional y complementaria, pues no se consideran nuevas vías y otros mecanismos biológicos asociados con la enfermedad todavía no conocidos y no incluidos en las funciones de riesgo. En el catálogo de GWAS del NHGRI se incluyen 21 variantes genéticas asociadas con CI; entre éstas, hemos identificado nueve que son independientes de los FRCV y buenas candidatas para incluirlas en una puntuación de riesgo genético en las funciones de riesgo coronario. Recientemente se han publicado los resultados de un tercer estudio de cohorte, el Nurse Health Study²⁶, con seguimiento de 19.313 mujeres, en el que los autores han utilizado una aproximación similar a la que proponemos. En un primer análisis incluyeron más de 100 variantes genéticas y en el segundo, únicamente doce, en su mayoría independientes de los FRCV, y analizaron si una puntuación genética basada en el número de alelos de riesgo de estas variantes mejoraba la capacidad de predicción o la reclasificación del riesgo coronario. Los resultados de este estudio han sido negativos, aunque la validez externa de estos resultados a la población general es discutible.

Una de las limitaciones de nuestro estudio está relacionada con el análisis de datos *in silico* del estudio WTCCC⁸, en el que hemos tenido acceso a datos individuales del genotipo de los participantes y si presentaban o no CI, pero no hemos tenido acceso a otro tipo de datos individuales como la edad o el sexo, que nos habrían permitido ajustar o estratificar por este tipo de variables clínicas. De todos modos, no hay datos que indiquen que la asociación entre las variantes genéticas seleccionadas y la CI sea diferente en varones y mujeres.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que este tipo de puntuación de riesgo genético de CI, basada en el efecto aditivo y combinado de un número de alelos de riesgo en diferentes marcadores genéticos independientes de los FRCV, se asocia con un

mayor riesgo de CI y responde de forma positiva a la primera fase de evaluación de un nuevo biomarcador propuesta por la AHA. Hace falta continuar con las siguientes fases de evaluación de este tipo de biomarcador realizando estudios de cohorte de base poblacional para determinar si mejora la capacidad de discriminación de las funciones utilizadas en la prevención primaria de la CI o la reclasificación de los individuos, especialmente los que están en riesgo intermedio, y definir la relevancia en la práctica clínica de este tipo de biomarcadores.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha utilizado datos generados por el WTCCC⁸. Una lista completa de los investigadores que participaron en la generación de los datos está disponible en: www.wtccc.org.uk

Agradecemos a José Miguel Baena-Díez y María Grau sus comentarios tras la revisión y lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Elosua R, Lluís C, Lucas G. Estudio del componente genético de la cardiopatía isquémica: de los estudios de ligamiento al genotipado integral del genoma. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2009;9 Supl B:B24-38.
2. Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, et al. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet.* 2009;41:280-2.
3. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science.* 2007;316:1491-3.
4. Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet.* 2009;41:334-41.
5. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavassari N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science.* 2007;316:1488-91.
6. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2007;357:443-53.
7. Tregouet DA, König IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS, Hall AS, et al. Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2009;41:283-5.
8. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447:661-78.
9. Gerszten RE and Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature.* 2008;451:949-52.
10. Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, Ordovas J, et al. An adaptation of the Framingham coronary heart disease risk function to European Mediterranean areas. *J Epidemiol Community Health.* 2003;57:634-8.
11. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, Ballantyne CM, Criqui MH, Elkind MS, et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2009;119:2408-16.

12. Power C, Elliott J. Cohort profile: 1958 British birth cohort (National Child Development Study). *Int J Epidemiol*. 2006;35:34-41.
13. EMBL-EBI. EMBL-EBI website [citado 2 Dic 2009]. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/ega/page.php?page=studies&name=WTCCCe>
14. Hindorf LA, Junkins HA, Mehta JP, Manolio TA. A catalog of published genome-wide association studies [citado 13 Ene 2010]. Disponible en: www.genome.gov/gwastudies
15. Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*. 2007;23:644-5.
16. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet*. 2009;41:666-76.
17. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet*. 2010;42:105-16.
18. Cornelis MC, Qi L, Zhang C, Kraft P, Manson J, Cai T, et al. Joint effects of common genetic variants on the risk for type 2 diabetes in U.S. men and women of European ancestry. *Ann Intern Med*. 2009;150:541-50.
19. Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, Sullivan L, Ordovás J, Cordón F. Estimación del riesgo coronario en España mediante la ecuación de Framingham calibrada. *Rev Esp Cardiol*. 2003;56:253-61.
20. Brautbar A, Ballantyne CM, Lawson K, Nambi V, Chambless L, Folsom AR, 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*. 2009;2:279-85.
21. 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*. 2009;150:65-72.
22. Talmud PJ, Cooper JA, Palmen J, Lovering R, Drenos F, Hingorani AD, et al. Chromosome 9p21.3 coronary heart disease locus genotype and prospective risk of CHD in healthy middle-aged men. *Clin Chem*. 2008;54:467-74.
23. Morrison AC, Bare LA, Chambless LE, Ellis SG, Malloy M, Kane JP, et al. Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 2007;166:28-35.
24. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, Roos C, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2008;358:1240-9.
25. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet*. 2009;41:47-55.
26. Paynter NP, Chasman DI, Pare G, Buring JE, Cook NR, Miletich JP, et al. Association between a literature-based genetic risk score and cardiovascular events in women. *JAMA*. 2010;303:631-7.