

**1000 anni di variabilità genetica a Brisighella (RA):  
le malattie cardiovascolari dal IX secolo a oggi**

**Uno studio diacronico della variabilità genetica a Brisighella (Ravenna):  
un approccio gene-candidato**

**Premessa**

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nel mondo, rappresentando il 31 % del totale dei decessi (dato WHO 2015). Le lipoproteine, come il colesterolo LDL, HDL e totale, giocano un ruolo chiave nello sviluppo delle malattie cardiovascolari. Uno studio recente di metanalisi genetica (Rosticci et al., 2018) nella popolazione di Brisighella (Brisighella Heart Study) e in gruppo di popolazione estone ha confermato l'effetto della variante (rs 3846662) del gene HMGCR sui livelli di colesterolo LDL e la forte correlazione tra LDL e livelli plasmatici di Apo-B. Al contrario, un'altra variante dello stesso gene risulta associata con i livelli di pressione sistolica e diastolica a Brisighella, ma non in Estonia. È noto infatti come la variabilità genetica delle popolazioni umane, plasmata da millenni di migrazioni, non sia determinata soltanto da eventi demografici, ma anche da fenomeni di adattamento in risposta a pressioni selettive dipendenti principalmente da clima, patogeni e dieta. La genetica rappresenta quindi un importante strumento per gli studi di medicina evolutiva e medicina di precisione, permettendo di analizzare i pathways metabolici delle malattie complesse. La medicina evolutiva, disciplina di intersezione tra biologia evolutiva e medicina, suggerisce che, per comprendere salute umana e malattie, sia necessaria una prospettiva temporale, principi e teorie della genetica evolutiva umana e conoscenza della biodiversità delle popolazioni.

Il presente progetto di ricerca, finalizzato allo studio di marcatori genetici (SNPs) associati al rischio di malattie cardiovascolari e al metabolismo dell'acido urico nella popolazione di Brisighella in un periodo cronologico di circa 1000 anni, si basa proprio su tale approccio. Le peculiarità del progetto risiedono nella possibilità di tipizzare l'intera biobanca "Brisighella Heart Study" e di integrare il campionamento di individui moderni con il DNA estratto da reperti scheletrici risalenti al IX - X secolo d.C, provenienti dalla stessa area geografica, permettendone quindi un'analisi evolutiva diacronica.

I principali obiettivi del progetto possono essere così elencati: 1) analizzare nella coorte di Brisighella (RA) un gruppo selezionato dalla letteratura di 28 SNPs, localizzati in 25 differenti geni legati al catabolismo delle purine e al rischio cardiovascolare e valutarne l'associazione con 18 diversi parametri clinici relativi al rischio cardiovascolare; 2) studiare la variabilità genetica di queste varianti a livello micro e macrogeografico utilizzando rispettivamente i dati italiani di Sazzini et al., (2016) e del 1000 Genome Project; 3) confrontare la variabilità genetica moderna con quella presente 1000 anni fa nella stessa area geografica; 4) ricostruire la dieta dell'antica popolazione di Brisighella tramite analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto.

## Materiali e Metodi

Dopo una revisione della letteratura, sono stati identificati e selezionati 28 marcatori genetici (SNPs) associati al rischio di malattie cardiovascolari e a parametri associati ad una maggior suscettibilità a malattie cardiovascolari (come concentrazione di acido urico, pressione arteriosa, concentrazione di omocisteina plasmatica), riportati in Tabella 1. I marcatori selezionati sono stati identificati da precedenti studi di associazione sull'intero genoma (genome-wide) in popolazioni europee, ma l'associazione non è mai stata analizzata in una popolazione italiana.

È stato quindi effettuato il disegno dei primers, l'ottimizzazione della multiplex per la genotipizzazione tramite spettrometria di massa MALDI-TOF (Agena Bioscience) e successivamente le analisi statistiche.

Il campionamento per le analisi effettuate ha previsto:

- **Campioni antichi:** 2 reperti (denti) per ogni individuo (totale 80 campioni), dalla necropoli di Rontana, adiacente alla città di Brisighella, del X secolo rinvenuti nella campagna di scavo 2013-14 sotto la direzione del Prof. Enrico Cirelli e della Dott.ssa Debora Ferreri. I campionamenti sono stati effettuati secondo le più stringenti norme previste nel settore di ricerca del DNA antico al fine di evitare la contaminazione da DNA esogeno (Figura 1). Le fasi di analisi sono state effettuate presso il Laboratorio del DNA antico del Dipartimento di Beni Culturali dell'Università di Bologna, Campus di Ravenna (Figura 2).
- per **l'analisi della paleodieta** sono stati selezionati alcuni distretti scheletrici (mandibole o mascelle) dagli stessi individui campionati per il DNA (n=40). È stato inoltre effettuato il campionamento dei reperti animali (n=8) utili alla ricostruzione dei livelli trofici della dieta. L'analisi è stata effettuata presso il laboratorio di Geochimica Isotopica dell'Università di Parma (Iacumin et al., 2014) sulla porzione organica dell'osso (collagene) dopo aver separato quest'ultima dalla frazione minerale del reperto osteologico.

- per i campioni destinati all'analisi della *variabilità genetica moderna* dal database “*Brisighella Heart Study*” sono stati selezionati 758 individui in base ai parametri biochimici stabiliti (Tabella 2), 376 maschi e 382 femmine con un'età media rispettivamente di  $48 \pm 16.2$  e  $49 \pm 16.5$ .
- per la *popolazione italiana N= 747* individui del *progetto Genographic* (Sazzini et al, 2016) appartenenti a 20 province caratterizzate da omogeneità culturale e storica e suddivisi in 4 macro aree geografiche dell'Italia (ovvero Nord, Centro, Sud e Sardegna).

## Risultati

### 1. *Analisi di associazione*

I risultati dell'analisi di regressione logistica tra SNPs e parametri biochimici hanno evidenziato valori di p-value statisticamente significativi (Tabella 3) per gli rs1471633, rs478607 and rs3741414, localizzati nei geni PDZK1, NRXN2 e INHB e associati con i livelli di creatin fosfochinasi; con gli rs2231142 e rs1471633, localizzati nei geni ABCG2 e PDZK1, associati con i livelli di acido urico, e con gli rs1764391 e rs1260326 localizzati nei geni GJA4 e GCKR associati con i livelli di creatinina.

### 2. *Analisi della variabilità genetica mondiale e italiana*

I risultati ottenuti dal confronto con il database 1000 Genome Project <https://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/> hanno evidenziato un cline nord-sud per 3 SNPs associati al rischio cardiovascolare (rs10757274, rs2383206 and rs1801133 localizzati nei geni CDKNBAS e MTHFR) che presentano frequenza più elevata degli alleli di rischio nelle popolazioni del sud Europa. Nella tabella 4 sono riportati i valori di frequenza allelica delle tre varianti nella popolazione di Brisighella e nelle popolazioni Africane, sud Americane, del sud ed est Asia, Europa e nei Toscani (1000 Genomes project). Le frequenze riportate rientrano nel range di valori riportati per la popolazione dei toscani, l'unica presente per l'Italia nel database dei 1000 genomi. Questo studio ha permesso inoltre di studiare per la prima volta la struttura genetica della popolazione di Brisighella per 22 dei 28 SNPs selezionati dalla letteratura e di analizzarli rispetto a campioni della penisola italiana (Sazzini et al., 2016). Nella tabella 5 vengono riportati i valori statisticamente significativi nei confronti tra le macroaree italiane dalla quale emerge, come era da attendersi che riguardano confronti con la Sardegna. Complessivamente i dati individuano uno SNP interessante (rs1260326) che presenta un cline di frequenza nord-sud sia in Italia che in Europa, coinvolto nel metabolismo dei trigliceridi e del glucosio. Tale risultato porta a pensare che ci possa essere una diversa suscettibilità geografica a diverse pressioni selettive locali relative al consumo di grassi e carboidrati, legate alla diversificata situazione climatica italiana ed europea. Le abitudini alimentari possono aver ridotto la pressione selettiva sulle varianti genetiche del rischio

cardiovascolare, comportando una frequenza elevata di queste varianti di rischio nelle popolazioni dell'Europa meridionale.

### 3. Confronto tra popolazione antica e moderna di Brisighella

Il confronto tra i campioni moderni e quelli antichi ha evidenziato una generale omogeneità tra le frequenze alleliche del passato e quelle attuali, ad eccezione di 2 SNPs (rs1613662 e rs10757274 localizzati nei geni GP6 e CDKNBAS), la cui funzione è legata al rischio cardiovascolare. Un risultato interessante è che entrambi questi SNPs mostrano un arricchimento di varianti correlate con eventi cardiovascolari nella popolazione antica di Brisighella (Tabella 6).

### 4. Paleodieta

La ricostruzione della paleodieta tramite analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto è finalizzata alla ricostruzione delle abitudini alimentari di individui vissuti nel passato. I rapporti isotopici di carbonio e azoto, vengono riportati a due standard internazionali ed espressi come  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$ .  $\delta^{13}C$  permette di discriminare il consumo di piante a differenti vie di fissazione del carbonio (piante C3 vs. piante C4). Nei tessuti animali viene fissato preferenzialmente l'isotopo dell'azoto più pesante ( $N^{15}$ ) e il rapporto  $\delta^{15}N$  tende a diventare più positivo a mano a mano che si risale lungo la catena alimentare. I risultati preliminari finora ottenuti hanno mostrato come l'alimentazione della popolazione antica fosse largamente basata sul consumo di carne (Figura 3), ma l'analisi più approfondita di questi dati e della loro relazione con i dati genetici ottenuti in questo studio, è ancora in fase di studio.

## **Discussione e conclusioni**

La struttura genetica di piccole popolazioni risulta particolarmente utile per l'identificazione di varianti di suscettibilità a determinate malattie che si presentano a causa della deriva genetica a più alta frequenza. Il progetto ha analizzato nella coorte di Brisighella (RA) e in un campione antico 28 SNPs, localizzati in 25 differenti geni, legati al catabolismo delle purine e al rischio cardiovascolare e valutarne l'associazione con 18 diversi parametri clinici relativi al rischio cardiovascolare. I risultati ottenuti hanno confermato per 2 SNPs (rs2231142 and rs1471633) su 18, localizzati nei geni ABCG2 e PDZK1 la già nota associazione con i livelli di acido urico e trovato per la prima volta nuove associazioni statisticamente significative con i livelli di CPK e di creatinina (CREA). La mancata associazione per i 16 SNPs è da ricollegarsi al diverso tipo di campionamento utilizzato nel lavoro di Köttgen et al. (2013), la cui coorte comprendeva 62 diversi studi. È presumibile che l'ancestralità geografica mista della coorte, l'interazione esistente tra genetica e ambiente, in particolare per lo stretto legame tra livelli di acido urico e dieta che è diversa nelle varie popolazioni umane, sia alla base del risultato. Studi di letteratura dimostrano come una particolare dieta

possa influenzare le complesse dinamiche di interazione gene-dieta e addirittura annullare le associazioni con tratti complessi come l'infarto (Corella & Ordovas, 2014). L'importanza della storia demografica, della geografia e degli adattamenti locali risulta evidente anche dalla presenza di un cline nord-sud in Europa per quanto riguarda la frequenza allelica di 3 SNPs associati al rischio cardiovascolare (rs10757274, rs2383206 and rs1801133) con una più alta frequenza degli alleli di rischio nelle popolazioni del sud Europa, dove c'è tuttavia un più basso tasso di mortalità dovuta a CVD rispetto al nord Europa. Le abitudini alimentari possono aver ridotto la pressione selettiva sulle varianti genetiche legate al rischio cardiovascolare, portando queste varianti di rischio ad alta frequenza nelle popolazioni dell'Europa meridionale (Corella et al., 2013). L'analisi condotta a livello microgeografico nella popolazione italiana ha mostrato un gradiente nord-sud per la variante rs1260326 nel gene GCKR, coinvolto nel metabolismo dei trigliceridi e del glucosio. Questo trend geografico, confermato anche a livello europeo dall'analisi delle popolazioni del database 1000 genomi, risulta in linea con quanto osservato da Sazzini et al. (2016) che evidenziava una diversa suscettibilità genetica lungo la penisola italiana legata all'assunzione di grassi e carboidrati, che a sua volta può avere un impatto sulla salute cardiovascolare. La possibilità di analizzare campioni geograficamente omogenei, vissuti 1000 anni prima ha permesso inoltre di aggiungere la prospettiva temporale e di osservare una sostanziale omogeneità tra le frequenze alleliche nel passato e nel presente, evidenziando tuttavia la peculiarità di 2 SNPs (rs1613662 e rs10757274 situati nei geni GP6 e CDKNBAS) la cui funzione è correlata al rischio cardiovascolare. Entrambi gli SNPs hanno mostrato un'alta frequenza degli alleli legati al rischio cardiovascolare nella popolazione antica, per la quale l'analisi della paleodieta, per quanto preliminare, ha mostrato come l'alimentazione fosse largamente basata sul consumo di carne.

In conclusione questo progetto rappresenta il primo caso di studio diacronico delle varianti genetiche correlate alle malattie cardiovascolari e all'acido urico nella popolazione di Brisighella e un ottimo "case study" per comprendere l'importanza dell'ancestralità geografica e dell'analisi della diversità genetica delle popolazioni negli studi medici e la contestualizzazione della variante in un determinato periodo storico (differenze nello stato socioeconomico e nel sistema sanitario). Anche nella popolazione sana basi genetiche della variabilità fenotipica potrebbero influenzare il rischio malattia. Alcune di queste varianti «normali» sono adattamenti ambientali, influenzati dall'ambiente, ma l'influenza dell'ambiente non è rimasta e non rimane costante nel corso del tempo per cui fenotipi dannosi nel presente possono essere stati neutrali o addirittura vantaggiosi nel passato in determinate condizioni.