



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE**

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Piana

INDIRIZZO IN FISIOPATOLOGIA MEDICA

Responsabile di Indirizzo: Prof. Roberto Manetti

XXVIII CICLO

**VARIANTI GENETICHE ASSOCIATE CON LA MASSA
VENTRICOLARE SINISTRA IN PAZIENTI CON IPERTENSIONE
ESSENZIALE MAI TRATTATA**

Direttore:

Prof. Andrea Piana

Tutor:

Prof. Nicola Glorioso

Tesi di dottorato di:

Dott. Antonio Sircana

Anno Accademico 2015 - 2016

Attività svolte durante il Corso di Dottorato di Ricerca

Il lavoro di ricerca nei miei due anni di dottorato in Scienze Biomediche, indirizzo di fisiopatologia medica, si è articolato principalmente su tre argomenti:

- Pattern respiratorio e insufficienza respiratoria acuta (IRA) in Pronto Soccorso;
- Farmacogenomica dei beta bloccanti
- Varianti genetiche associate con la massa ventricolare sinistra in pazienti con ipertensione essenziale mai trattata

Progetto di ricerca “Pattern respiratorio e insufficienza respiratoria acuta”

E' stato dimostrato che nei pazienti in insufficienza respiratoria acuta (IRA) con attività del drive centrale neuromuscolare preservata, il difetto fisiopatologico è costituito dal carico respiratorio eccessivo a cui sono sottoposti i muscoli respiratori. Ne consegue una inesorabile evoluzione verso la fatica respiratoria che va a peggiorare l'ipossiemia e l'ipercapnia

Il pattern respiratorio adottato dai pazienti con IRA è rapido e superficiale (Rapid Shallow Breathing), esso viene espresso come rapporto f/VT e rappresenta un importante indice predittivo di successo/fallimento durante il weaning trial da ventilazione meccanica invasiva, poichè ci svela che i muscoli respiratori del paziente devono fronteggiare un carico respiratorio troppo elevato per la loro capacità di prestazione.

Obiettivo dello studio è quello di analizzare la correlazione del RSBI (Rapid Shallow Breathing Index) con i valori di PaCO₂ e di PH, e quindi, valutare se f/VT possa essere considerato un indice affidabile di svezabilità dalla ventilazione non invasiva nei pazienti con insufficienza respiratoria ipercapnica. Abbiamo condotto uno studio osservazionale, prospettico, in cui sono stati arruolati 16 pazienti adulti con insufficienza respiratoria ipercapnica, sottoposti poi a NIV, che si sono presentati presso il Pronto Soccorso del Presidio Sanitario Gradenigo di Torino nel periodo compreso tra Settembre 2014 e Marzo 2015. Tutti i pazienti hanno eseguito:

- 1) RX torace all'ingresso;
- 2) EGA, all'ingresso e dopo 1 ora di NIV, se ricoverati ogni 24h;
- 3) f/VT all'ingresso e dopo 1 ora di NIV, se ricoverati ogni 24h

Per determinare il RSBI abbiamo proceduto in questo modo: dopo aver collegato il paziente al ventilatore, con i valori di PEEP e Pressione Inspiratoria = 0 cm H₂O, abbiamo calcolato il rapporto f/VT, dividendo la frequenza respiratoria/min per il VTe medio di un minuto espresso in litri. La calibrazione del ventilatore meccanico dopo il posizionamento del circuito garantisce la corretta misurazione da parte del software del ventilatore meccanico del valore di VTe.

Abbiamo arruolato tutti i pazienti con età >18 anni, giunti in pronto soccorso con insufficienza respiratoria acuta ipercapnica con pH<7,35; PaCO₂>45 e FR>25.

Tutti i dati sono stati raccolti ed inseriti in un database elettronico (Microsoft Excell, StatView). Dati demografici (età, sesso), altezza, peso, diagnosi di ammissione, parametri vitali e valori emogas sono stati inseriti al momento dell'inizio della NIV. Ogni paziente ha ricevuto le cure per la patologia che ha causato distress respiratorio,

NIV, o è stato sottoposto ad intubazione OT, secondo parere del team medico del Pronto Soccorso-Area Critica, e in accordo con le attuali linee guida internazionali.

La NIV è stata praticata utilizzando ventilatori VersaMed iVent A201, attraverso maschere oro-nasali o maschere total-face.

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. Abbiamo eseguito analisi non parametrica della varianza (Mann-Whitney U test) per il confronto tra pazienti intubati e non intubati; correlazione di Spearman per calcolare la correlazione fra le diverse variabili (PaCO₂, pH, f/VT); t test per dati appaiati per individuare le differenze tra f/VT all'inizio e a fine trattamento con NIV.

Dei 36 pz arruolati, 16 sono giunti allo step 3 dello studio (24h) e 10 allo step 4 (48h).

I pazienti che sono andati incontro ad intubazione OT avevano un f/VT all'ingresso e dopo un'ora di NIV, più alto rispetto ai pazienti che sono stati subito svezzati o che hanno continuato con la NIV (144 \pm 11 e 116 \pm 14 VS 116 \pm 24 e 88 \pm 21 (p<0.05) rispettivamente). Dei sei pazienti arruolati con diagnosi di polmonite, due sono stati intubati. Dei otto pazienti che sono stati intubati, 4 sono deceduti, due con diagnosi di polmonite, due per scompenso cardiaco severo. 28 pazienti sono stati svezzati con successo dalla NIV con un f/VT finale di 60 \pm 23 (p<0,005).

All'analisi di regressione è emersa una importante correlazione tra Δ f/VT e Δ PaCO₂ (Rho 0,951 p<0,005) e tra Δ f/VT e Δ PH (Rho 0,875 p<0,005). Δ è inteso come differenza tra valore all'ingresso e valore a svezzamento avvenuto. La differenza tra f/VT all'inizio del trattamento ed f/VT a fine trattamento è risultata statisticamente significativa (p<0,001).

Il RSBI costituisce un parametro ausiliario che identifica i pazienti candidati al trattamento con NIV, ci informa di come il paziente sta respirando, suggerendo eventualmente l'impiego di un trattamento più aggressivo o invasivo. Superata la fase critica, il RSBI, in virtù della correlazione con i gas ematici, ci aiuta ad identificare quei pazienti candidati allo svezzamento dalla NIV.

Questo studio, nonostante presenti dati da ritenere preliminari a causa dell'entità del campione di pazienti studiati, permette per la prima volta di evidenziare il valore del rapporto f/VT nel valutare l'andamento clinico nei pazienti in insufficienza respiratoria acuta sottoposti a ventilazione non invasiva.

Progetto di ricerca "Farmacogenomica dei Beta Bloccanti nell'Iperensione Arteriosa"

L'atenololo è ampiamente utilizzato nel controllo dell'ipertensione arteriosa, fornendo una protezione non solo cardiaca, ma anche renale e cerebrale.

I beta-bloccanti agiscono mediante un meccanismo di competizione con gli agonisti beta-adrenergici (come epinefrina e norepinefrina) per i recettori beta. Essi vengono frequentemente classificati in "selettivi" o "non-selettivi", a seconda che blocchino o meno sia i recettori beta 1 nel muscolo cardiaco sia i beta 2 presenti nei muscoli bronchiali e lisci.

Scopo di questo studio è stato quello di cercare varianti genetiche associate alla risposta della pressione arteriosa ai beta-bloccanti nel trattamento dell'ipertensione arteriosa essenziale. Per questo studio sono stati arruolati, presso il Centro Iperensione e Malattie correlate della AOU-Università degli Studi di Sassari, 435

Antonio Sircana, Varianti genetiche associate con la massa ventricolare sinistra in pazienti con ipertensione essenziale mai trattata, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche indirizzo Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

pazienti (M=46.9%; F=53.1%; meanage 51.7±11.4 yrs) sardi, ipertesi, mai trattati. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un periodo di 8 settimane di follow-up al fine di escludere la presenza di malattie o ipertensione secondaria. Alla week 0 i pazienti iniziano il trattamento con 50 mg di atenololo b.i.d per 4 settimane. I partecipanti alla studio hanno firmato un consenso informato scritto che autorizza l'utilizzo dei dati e l'analisi del DNA.

Sono stati genotipizzati 82 pazienti utilizzando l'Illumina Human1M-Duo array (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) e 353 pazienti utilizzando l'array Illumina HumanOmniExpress BeadChip. Prima di eseguire le analisi di associazione abbiamo eseguito il controllo di qualità del campione genotipizzato.

L'imputazione è stata effettuata utilizzando Minimac e come pannello di riferimento quello del progetto "1000 genomi". I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) con una bassa frequenza allelica (MAF < 0,01) o una bassa qualità di imputazione (Rsq < 0,8) non sono stati usati nell'analisi di associazione. Il campione è stato sottoposto a controllo di qualità seguendo il protocollo di Anderson e colleghi, usando il software PLINK (versione 1.07). Abbiamo valutato la stratificazione della popolazione con l'analisi delle componenti principali, usando il pacchetto EIGENSOFT (versione 3.0). Dopo il controllo di qualità il campione era composto da 403 pazienti (189 maschi e 214 femmine).

I fenotipi analizzati erano le variazioni della pressione arteriosa (sistolica e diastolica) e HR dopo 4 settimane di trattamento (Δ SBP4, Δ DBP4 e HR4), cioè la

differenza tra la BP o HR alla fine del trattamento (settimana 4) e la BP o HR al termine del periodo di run-in (week0).

Per valutare l'associazione tra il genotipo e il fenotipo abbiamo eseguito 3 regressioni lineari sotto un modello additivo come implementato in Mach2qtl. Al fine di identificare i polimorfismi associati con il Δ SBP4, abbiamo effettuato una analisi di regressione lineare, corretta per sesso, età, indice di massa corporea, pressione sistolica basale, l'aldosterone plasmatico, HR basale, e per le componenti principali (PCs); Al fine di identificare i polimorfismi associati con il Δ DBP4, abbiamo effettuato una analisi di regressione lineare, corretta per sesso, età, indice di massa corporea, basale DBP, aldosteroneplasmatico, HR basale, l'attività della renina plasmatica, e per le componenti principali PCs; Al fine di identificare i polimorfismi associati con il Δ HR4, abbiamo effettuato una analisi di regressione lineare, corretta per sesso, età, HR basale, potassio sierico, BP basale, e per le componenti principali PCs.

L'analisi ha permesso di identificare: 431 SNPs associati al Δ SBP4 con un p-value $\leq 10^{-5}$, 561 SNPs associati al Δ DBP4 con un p-value $\leq 10^{-5}$ e 383 SNPs associati al delta della frequenza cardiaca (Δ HR) con un p-value $\leq 10^{-5}$.

Per escludere risultati ridondanti, abbiamo eliminato gli SNPs che erano in linkage disequilibrium (LD) ($r^2 \geq 0.8$), abbiamo anche escluso gli SNPs che mappano in regioni deserte. Abbiamo quindi identificato: 5 SNPs associati al Δ SBP4, 6 SNPs associati al Δ DBP4 e 3 SNPs associati al Δ HR con un ruolo funzionale nella risposta ai Beta Bloccanti.

Al fine di validare i risultati da noi ottenuti, le varianti geniche da noi identificate in associazione alla risposta antiipertensiva alla terapia con beta-bloccanti sono state valutate indipendentemente in una coorte di pazienti di etnia finlandese e pertanto completamente diversa da quella della nostra coorte. La validazione ha dato risultati positivi per un numero significativo degli SNPs risultati significativamente associati alla risposta antiipertensiva ai beta bloccanti nella nostra coorte.

Il manoscritto relativo alla ricerca di cui sopra, e della quale risuldo co-autore, è in fase di avanzata preparazione per essere poi sottomesso ad una rivista internazionale ad alto fattore di impatto.

Progetto di ricerca “varianti genetiche associate con la massa ventricolare sinistra in pazienti con ipertensione essenziale mai trattata”

L'Ipertrofia Ventricolare Sinistra è un potente fattore di rischio cardiovascolare, indipendente dal grado di ipertensione arteriosa o da altre comorbidità e aumenta significativamente il rischio di malattia coronarica, insufficienza cardiaca, fibrillazione atriale, ictus, aritmie ventricolari e morte improvvisa.

La patogenesi è complessa e prevede un'interazione di fattori genetici, ambientali ed emodinamici.

Lo studio è stato disegnato con l'obiettivo di a) indagare l'associazione tra varianti genetiche comuni e la massa ventricolare sinistra in pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale attraverso uno studio di associazione genome-wide e b) proporre

uno score di rischio genetico ponderato che aggrega i loci di suscettibilità selezionati con lo scopo di incrementarne il valore predittivo.

L'associazione delle varianti genetiche con l'ipertrofia ventricolare sinistra, valutata mediante metodica ecocardiografica transtoracica è stata indagata attraverso un'analisi di associazione genome-wide in 966 pazienti mai trattati affetti da ipertensione arteriosa essenziale, di nuova diagnosi, di grado lieve e moderato.

I geni ROCK1, IGF1, CACNA1D, FGFR1, TRAF5, SOX5 e KRS2 sono stati identificati, nel nostro studio, come possibili modulatori dell'ipertrofia ventricolare sinistra. La combinazione di questi loci di suscettibilità all'interno di uno score di rischio genetico ponderato ha mostrato, nella nostra coorte,

un consistente potere discriminatorio nel predire l'ipertrofia ventricolare sinistra.

I risultati dello studio suggeriscono che l'incremento della massa cardiaca nei pazienti ipertesi sia determinato da fattori genetici che sono almeno in parte indipendenti dall'effetto della pressione arteriosa. Lo score di rischio genetico, aggregando i loci di suscettibilità selezionati, ha permesso di incrementare il valore predittivo nei confronti dell'ipertrofia ventricolare sinistra.

Anche il manoscritto relativo alla ricerca di cui sopra è in fase di preparazione per essere poi sottoposto ad una rivista internazionale ad alto fattore di impatto.

Abstract

Aim

To investigate the association of common genetic variants with left ventricular mass (LVM) using a genome wide approach (GWAS) in a large cohort of never treated mild-to-moderate essential hypertensive subjects and propose a pilot, “weighted genetic risk score” that aggregates the measures of risk of raised LVM

Materials and Methods

The association of genetic variants with LVM (trans-thoracic echocardiography) was investigated by a genome-wide association analysis in 966 never treated mild-to-moderate EH patients

Results

ROCK1, IGF1, CACNA1D, FGFR1, TRAF5, SOX5, and KSR2 genes were identified in our study as putative modulators of LVM. The combination of these susceptibility loci into a “weighted genetic risk score” shows consistent discriminatory power to predict the risk of raised LVM in our cohort

Conclusion

Our GWAS allowed us to pinpoint genes whose role cardiac hypertrophy (LVH) has been demonstrated in previously publications by different authors. Moreover, we highlighted the usefulness of an aggregate measure of risk of LVH to discriminate high-risk subjects. Future work is needed to better characterize the regions identified in our study, to assess the functional role of putative genetic variants and to confirm our proposed “genetic risk score”.

Sommario

Scopo dello studio

Indagare l'associazione tra varianti geniche comuni e la massa ventricolare sinistra (LVM) attraverso uno studio di associazione genome-wide (GWAS) in pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale lieve-moderata mai trattata e proporre uno "score di rischio genetico ponderato" che aggrega le misure di rischio di aumento della massa ventricolare sinistra (LVM)

Materiali e Metodi:

L'associazione delle varianti genetiche con l'ipertrofia ventricolare sinistra (ecografia trans-toracica) è stata indagata attraverso un'analisi di associazione in 966 pazienti mai trattati affetti da ipertensione essenziale lieve-moderata

Risultati:

Nel nostro studio, i geni ROCK1, IGF1, CACNA1D, FGFR1, TRAF5, SOX5, e KSR2 sono stati identificati come possibili modulatori dell'ipertrofia ventricolare sinistra. La combinazione di questi loci di suscettibilità all'interno di uno score di rischio genetico ponderato ha mostrato nella nostra coorte, un consistente potere discriminatorio nel predire l'ipertrofia ventricolare sinistra.

Conclusioni:

Il nostro studio ci ha permesso di individuare dei geni, il cui ruolo nella ipertrofia cardiaca (IVS) è stata dimostrata in precedenza da pubblicazioni di diversi autori. Inoltre abbiamo evidenziato l'utilità di una misura aggregata di rischio di IVS nel discriminare soggetti ad alto rischio. Saranno necessari ulteriori studi per meglio

caratterizzare le regioni genetiche identificate, valutarne il ruolo funzionale e per confermare la validità dello “score di rischio genetico” da noi proposto.

INDICE

1 L'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS)	15
1.1 Introduzione	15
1.2 Fattori determinanti la massa ventricolare sinistra	18
1.3 La genetica dell'ipertrofia ventricolare sinistra	21
1.4 Diagnosi di ipertrofia ventricolare sinistra.....	26
1.4.1 Diagnosi elettrocardiografica	26
1.4.2 Diagnosi ecocardiografica	27
1.4.3 Diagnosi mediante Risonanza Magnetica	28
2 Lo studio	31
2.1 Introduzione	31
2.2 Scopo dello studio	32
2.3 Materiali e metodi	32
2.3.1 Coorte di studio	32
2.3.2 Misurazioni ecocardiografiche	33
2.3.3 Genotipizzazione, imputazione, controllo di qualità.....	35
2.3.4 Analisi statistica	36
2.3.5 Score di rischio genetico ponderato	36
2.4 Risultati	38
2.4.1 Analisi di associazione quantitativa	38
2.4.2 Analisi caso-controllo	39
2.4.3 Score di rischio genetico ponderato	40
2.5 Discussione.....	47
2.6 Conclusioni.....	49
3 Bibliografia	51
4 Appendice	62

1 L'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS)

1.1 Introduzione

L'ipertrofia ventricolare sinistra è definita come un aumento della massa del ventricolo sinistro, il quale può essere secondario ad un incremento dello spessore di parete, un incremento di dimensione della camera cardiaca, o entrambe. L'aumento della massa potrebbe essere espressione di un meccanismo di adattamento-compenso ventricolare messo in atto per fronteggiare un elevato postcarico sebbene esista una componente genetica non trascurabile¹.

A livello cellulare, si assiste ad un aumento di volume dei cardiomiociti che incrementano il numero di miofibrille e mitocondri a cui si associa un aumento di volume dell'interstizio per proliferazione di fibroblasti e aumento della matrice extracellulare con progressiva fibrosi interstiziale². La possibilità di coltivare *in vitro* dei miociti cardiaci neonatali ha portato all'identificazione dei meccanismi recettoriali che attivano le risposte cellulari e molecolari che caratterizzano l'ipertrofia cardiaca e in particolare l'aumento delle dimensioni dei miociti, la maggiore espressione di geni embrionali e l'organizzazione delle proteine contrattili⁷. Una presentazione completa e un approfondimento d'argomento può essere trovata in due chiare revisioni critiche^{2,3}. Sono stati identificati, mediante modificazioni di specifici geni di accrescimento e citochine che possono attivare specifiche componenti della risposta ipertrofica sia fisiologica sia patologica, la stimolazione delle risposte contrattili e di rilasciamento, la produzione di energia,

l'apoptosi dei miociti. Fra le sostanze che attivano la risposta cellulare, quelle maggiormente caratterizzate sono l'endotelina, l'angiotensina II, l'*insulin-like growth factor-I* e altri fattori di accrescimento. Il fatto che a ciascuna di queste sostanze corrisponda un diverso tipo di risposta cellulare, suggerisce che le loro azioni siano specifiche. Ad esempio, è stato dimostrato che l'espressione di geni embrionali, come i peptidi natriuretici, è aumentata sia nell'ipertrofia ventricolare di tipo concentrico sia in quella di tipo eccentrico, mentre non è aumentata nell'ipertrofia provocata da stress biomeccanico. Sia i miociti, sia altre strutture cellulari del miocardio agiscono come sensori biomeccanici diretti del carico emodinamico che provocano ipertrofia, producendo segnali di accrescimento generati dal rilascio di fattori di accrescimento e di citochine che insieme portano ad una risposta localizzata regionale.

Il riscontro clinico-emeiologico e/o e il riscontro strumentale di un'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS) comportano sempre implicazioni importanti relative sia alla valutazione prognostica del singolo paziente, per il maggior rischio di aritmie⁴, di morte improvvisa⁵ e di evoluzione verso l'insufficienza cardiaca⁶ ormai accertato per ogni condizione associata ad aumento della massa ventricolare sinistra, sia al riconoscimento della reale presenza di una cardiopatia e della sua eventuale eziologia. La documentazione di un'IVS in un paziente iperteso rappresenta uno dei criteri più significativi per la classificazione prognostica del singolo caso e per la stratificazione di rischio negli studi epidemiologici o di intervento terapeutico ma non dovrebbe mai essere trascurato il sospetto che l'aumento rilevato della massa ventricolare sinistra non sia secondario all'ipertensione arteriosa e sia invece da

riferire a causa genetica, fisiologica (“cuore d’atleta”) o ad altra patologia concomitante. Ogni condizione che comporti un aumento della tensione di parete sul ventricolo sinistro e quindi, oltre all’ipertensione arteriosa sistemica, anche tutte le altre patologie che si accompagnano a sovraccarico di volume o di pressione per il ventricolo sinistro determina lo sviluppo di IVS. Ma un aumento della massa ventricolare o rilievi semiologico-strumentali che possono suggerirne il sospetto, non sempre dipendente dal meccanismo fisiopatologico del “sovraccarico”, può essere dovuto ad un’ampia serie di altre condizioni patologiche. Ne consegue un richiamo all’importanza di: documentare adeguatamente il sospetto diagnostico di IVS; escludere altri meccanismi strutturali o funzionali diversi dall’ipertensione arteriosa.

1.2 Fattori determinanti la massa ventricolare sinistra

La patogenesi come già accennato è complessa, e prevede un'interazione tra fattori genetici, ambientali ed emodinamici. L'ipertensione arteriosa è il principale determinante di IVS. Numerosi studi basati sulla popolazione hanno dimostrato un'associazione tra ipertensione e massa ventricolare sinistra (LVM)^{10,11,12}. La prevalenza di ipertrofia ventricolare sinistra varia a seconda della gravità dell'ipertensione, infatti meno del 20% dei pazienti con ipertensione di grado lieve ha segni clinico-strumentali di IVS, mentre ciò non si può dire per i pazienti con ipertensione grave o complicata ove tali segni sono presenti nella quasi totalità dei casi¹³.

Alcuni autori hanno ipotizzato un coinvolgimento del sistema renina-angiotensina (RAS) nella progressione della IVS, in cui si assiste ad una mancata soppressione del RAS o ad una maggiore sensibilità per l'angiotensina II. Diversi studi confermano un'associazione tra livelli crescenti di attività reninica plasmatica e una maggiore ipertrofia ventricolare sinistra¹³. Evidenze sperimentali suggeriscono che l'angiotensina II induce ipertrofia nei miociti e delle cellule muscolari lisce vascolari e possono regolare la sintesi del collagene. Anche l' aldosterone può stimolare la deposizione di collagene extracellulare e la fibrosi miocardica¹³. Ricerche suggeriscono l'ipotesi che l'assunzione di sale con la dieta svolga un ruolo non trascurabile nello sviluppo di IVS in pazienti ipertesi, tuttavia il meccanismo fisiopatologico sottostante non è stato del tutto

chiarito.

L'IVS è un fattore di rischio indipendente per la malattia cardiovascolare nei pazienti con ipertensione arteriosa. I meccanismi alla base di questa associazione sono rappresentati da una combinazione di alterazioni anatomiche, elettrofisiologiche, e una maggiore attività simpatica che coinvolge il RAS¹³. Anche se l'aumento della massa cardiaca è stato storicamente considerato come un meccanismo adattativo di compenso al sovraccarico cronico di pressione, tuttavia possiamo affermare che è presente una notevole variabilità della massa ventricolare sinistra in rapporto ai valori di pressione arteriosa⁷⁰, il ciò suggerisce la presenza di una importante componente genetica nella determinazione del fenotipo³⁴. Nella pratica clinica è infatti frequente osservare pazienti con ipertensione di grado lieve associata a IVS marcata e viceversa pazienti con ipertensione resistente, non controllata, associata a IVS lieve o con normale massa ventricolare¹⁴.

Questa variabilità è ampiamente documentata in letteratura e la presenza di IVS nei soggetti normotesi (o non ancora ipertesi) suggerisce ulteriormente la presenza di una componente genetica^{14,15}.

Nello studio Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)¹⁶ la prevalenza di IVS diagnosticata mediante risonanza magnetica (RM) cardiaca in un campione di 4967 individui è risultata del 7.8%. L'ipertrofia era presente nel 4% dei soggetti normotesi e nel 13% dei pazienti ipertesi. Questi dati rappresentano una stima attendibile della prevalenza nella popolazione generale, considerate le caratteristiche del campione e l'accuratezza della metodica diagnostica.

Diversi studi mostrano una associazione significativa tra età e massa ventricolare¹⁷. Nella popolazione di Framingham, la prevalenza dell'IVS rilevata con l'ecocardiografia variava dal 6% nelle persone sotto i 30 anni fino al 43% in quelli con età superiore ai 70 anni¹³. La massa cardiaca varia progressivamente durante l'invecchiamento, sia nei soggetti normotesi sia in quelli ipertesi¹⁸. Diversi studi riportano forti differenze di genere in LVM^{19,20}.

Studi epidemiologici hanno riscontrato che in una popolazione di adulti non ipertesi e non affetti da patologie cardiovascolari gli uomini hanno maggiori volumi ventricolari e maggiore massa rispetto alle donne, differenza che persiste anche dopo indicizzazione per superficie corporea^{20,21}. Anche la razza svolge un ruolo importante come determinante della massa ventricolare. L'incidenza di ipertrofia ventricolare sinistra nei neri rispetto ai bianchi è quattro volte superiore^{22,23} e l'appartenenza a questa razza è stata identificata come un fattore di rischio indipendente per IVS^{18,24}; probabilmente attribuibile, in parte, ad un maggior rischio di sviluppare ipertensione arteriosa. Ciò costituisce un ulteriore elemento che fa trasparire l'importanza dei fattori genetici nella determinazione del fenotipo.

Altri fattori di rischio, oltre all'ipertensione arteriosa, quali il fumo, il diabete, l'insufficienza renale cronica e l'obesità sono risultati associati all'IVS^{25,26,27}.

La terapia antipertensiva modifica la massa cardiaca infatti è dimostrato che tutti i farmaci antipertensivi, determinano una riduzione della massa cardiaca anche se in maniera differente²⁸. In base ai risultati di una meta-analisi recente, i sartani produrrebbero una riduzione media del 13%, seguiti dai calcio-antagonisti (11%),

ACE-inibitori (10%), diuretici (8%) e beta-bloccanti (6%). Tuttavia i trial clinici hanno dimostrato che la regressione dell'ipertrofia si verifica in meno della metà dei pazienti trattati, dato che corrobora l'ipotesi di un ruolo fondamentale dei determinanti genetici²⁹.

1.3 La genetica dell'ipertrofia ventricolare sinistra

E' stato dimostrato che la massa ventricolare sinistra presenta un'ereditabilità che varia tra il 15% e 84% a seconda degli studi³⁵.

L'IVS rappresenta un forte predittore di eventi avversi cardiovascolari e non esiste al momento una terapia specifica indipendente dalla riduzione della pressione arteriosa.

La prevalenza e la distribuzione nella popolazione suggerisce che tale fenotipo rappresenta un tratto complesso influenzato da numerosi geni, infatti studi di genetica dimostrano che la massa ventricolare è compatibile con un modello poligenico additivo³⁶. Comprendere i fattori genetici responsabili dell' IVS potrà fornire le basi per identificare i soggetti a rischio, e per sviluppare una terapia medica specifica e mirata che possa prevenire il rimodellamento e la progressione verso l'insufficienza cardiaca.

Diversi studi hanno indagato i determinanti genetici dell'IVS attraverso studi dei geni candidati, di linkage e di associazione genome-wide (GWAS).

Gli studi sui geni candidati hanno dimostrato un potenziale ruolo dei polimorfismi genetici situati nei geni che codificano per l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)^{39,40,41,42}, aldosterone sintetasi (CYP11B2)⁴³, fattore di

crescita insulino-simile (IGF1)⁴⁴, neuropeptide Y (NPY)⁴⁵, guanine nucleotide-binding protein 3 (GNB3)⁴⁶, endothelial nitric oxide synthase (eNOS)⁴⁷, peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARA)⁴⁸, e centlein centrosomal protein (CNTLN)⁴⁹. Tuttavia, gli studi successivi hanno spesso fallito nel replicare queste associazioni.

Morita et al. hanno valutato la massa ventricolare sinistra, mediante studio ecocardiografico, di 1862 individui della coorte di Framingham³⁰. Il 3% del campione, pari a 50 soggetti, presentava un incremento inspiegato degli spessori parietali, definito da uno spessore > 13 mm. L'analisi genetica in questi soggetti ha rilevato mutazioni nelle proteine sarcomeriche o mutazioni nel gene GLA in 9 soggetti (il 18%). I risultati dello studio sono importanti perchè dimostra che una singola mutazione può determinare IVS in un numero significativo di individui.

Studi di linkage e di associazione a livello del genoma hanno dimostrato un'associazione tra massa ventricolare sinistra e diversi loci situati in diversi cromosomi. In particolare, in uno studio di linkage di famiglie di ipertesi, tre regioni (10q23.1, 12q14.1, 17p13.3) sono risultate suggestive di linkage per determinate misure di IVS⁵⁰.

Gli studi di associazione sull'intero genoma umano (GWAS) hanno un potere senza precedenti nell' identificare i potenziali geni coinvolti con discreti effetti sulla massa ventricolare sinistra³⁷.

Lo studio di Vasan et al³¹. rappresenta il primo studio GWA sui fenotipi della struttura e della funzione cardiaca condotto su larga scala. Sono stati genotipizzati 12.612 soggetti, appartenenti al campione EchoGen, per fenotipi multipli che

includevano la massa cardiaca, le dimensioni ventricolari, gli spessori parietali, la funzione sistolica e le dimensioni dell'atrio sinistro. Gli SNPs associati ai fenotipi oggetto dello studio sono stati replicati in 2 coorti indipendenti (4094 individui). Nonostante il grande numero di individui presenti nello studio, solo un locus ha raggiunto la significatività statistica ed è stato replicato con successo. La presenza di tale polimorfismo spiega meno dell'1% della variabilità del fenotipo. Lo studio EchoGen ha quindi messo in luce la difficoltà che esiste nel riuscire a indentificare i determinanti genetici responsabili.

Nello studio HyperGEN, alcuni autori hanno condotto uno studio GWA sull'ipertrofia ventricolare sinistra in famiglie di pazienti ipertesi di razza bianca (1258 soggetti) e di razza afro-americana (989 soggetti)³². I risultati sono stati replicati in una coorte indipendente di 1316 pazienti ipertesi di razza caucasica, appartenenti al campione di studio GENOA. Un polimorfismo nel gene NCAM1 è risultato associato con lo spessore parietale dopo conferma nella coorte di replicazione. La plausibilità biologica del ruolo del gene nella patogenesi dell'ipertrofia ventricolare sinistra è confermata da studi sperimentali.

Nello studio NHLBI-CARe, Fox et al. hanno condotto uno studio GWA sui fenotipi della struttura e della funzione cardiaca³³. Sono stati genotipizzati 6765 pazienti di razza afro-americana. All'analisi di associazione sono stati individuati 4 polimorfismi correlati con la massa cardiaca, con il diametro tele-diastolico del ventricolo sinistro, con lo spessore parietale e con la frazione d'eiezione. Tuttavia nessuno dei 4 loci è stato replicato nella coorte indipendente dello studio EchoGen, che comprendeva

soggetti di razza bianca. I risultati suggeriscono un potenziale ruolo di queste varianti nella sola razza afro-americana³³.

In letteratura sono descritti altri lavori in cui è risultata significativa l'associazione tra massa ventricolare e polimorfismi genetici tra cui quelli che coinvolgono i geni RYR⁵¹,KCNB1³⁷,SLC35F1³¹,CDH13⁵²,ROCK1⁵³,WVOX⁵⁴,CACNA1D⁵⁵,SOX5⁵⁶,FIGN⁵⁷,IGF1⁵⁸,CSMD1⁵,TRAF5⁶⁴,KSR2⁶⁵.

Questi studi GWA pubblicati, hanno indubbiamente identificato vari loci di suscettibilità genetica, ma non sono riusciti a svelare né il legame tra geni e fisiopatologia nell'IVS, né l'architettura genetica di fenotipi complessi come la stessa IVS.

Attualmente gran parte della variabilità genetica rimane inspiegata. Questa caratteristica è comune a tutti i fenotipi complessi ed è stata denominata "missing heritability" (ereditabilità mancante).

I motivi sono molteplici e sono necessarie alcune considerazioni metodologiche che possono avere un impatto positivo nel migliorare il risultato degli studi di associazione genotipo/fenotipo. In particolare:

- L'esclusione di fattori ambientali (incluse le terapie) che esercitano un effetto sul fenotipo oggetto dello studio;
- La scelta della metodica diagnostica nella definizione del fenotipo (nel nostro caso ECG, ecocardiografia, risonanza magnetica cardiaca);
- L'utilizzo di score genetici che raggruppino l'effetto di vari loci di suscettibilità.

L'identificazione di un singolo polimorfismo che esercita un modesto effetto sul fenotipo è di scarsa utilità, anche se tale polimorfismo è comune nella popolazione.

Combinando il debole effetto di ogni variante, all'interno di uno score di rischio genetico potrebbe essere possibile incrementare la predittività.

- Il ruolo delle varianti rare, che nella determinazione del fenotipo rappresenta un aspetto da non trascurare.

Per la natura della loro progettazione, gli studi GWA sono destinati a rilevare gli effetti delle varianti genetiche comuni mentre possiedono una capacità limitata di individuare le varianti rare che possono influenzare il fenotipo. Per spiegare la variabilità del fenotipo l'ipotesi "varianti genetiche rare" prevede, quindi, che esistano numerose varianti di un gene, ciascuna delle quali è rara nella popolazione ma con un effetto maggiore nella determinazione del fenotipo.

L'incapacità dei GWAS di identificare le varianti rare potrebbe spiegare parte dell'"ereditabilità mancante".

La ricerca delle varianti rare può essere eseguita in maniera più completa attraverso l'analisi dell'esoma mediante whole exome sequencing (WES) e implementando un campionamento di soggetti agli estremi dello spettro fenotipico.

1.4 Diagnosi di ipertrofia ventricolare sinistra

Solo in condizioni cliniche che comportano un franco aumento della massa ventricolare sinistra la semeiotica fisica permette di rilevare segni obiettivi suggestivi di ipertrofia ventricolare, quali un impulso apicale spostato verso l'ascella, di maggiore forza e ampiezza, o l'auscultazione in area mitralica di un tono presistolico, rilievi questi che comunque richiedono un'adeguata conferma strumentale, soprattutto al fine di una migliore definizione eziologica e quantitativa⁷. Ma nella grande maggioranza dei casi, sono invece proprio le indagini strumentali, mirate od occasionali, quali ad esempio un tracciato elettrocardiografico di routine o una radiografia del torace, l'occasione per il rilievo di anomalie suggestive di un aumento della massa ventricolare. La documentazione fornita dall'esame radiografico del torace è caratterizzata da elevata specificità ma da una sensibilità decisamente insufficiente a confronto con le altre metodologie strumentali, quali l'elettrocardiografia di superficie, l'ecocardiografia e la risonanza magnetica⁷.

1.4.1 Diagnosi elettrocardiografica

L'elettrocardiografia rappresenta uno strumento utile ma imperfetto per diagnosticare un'IVS: la sua indiscussa utilità deriva dalla diffusione e facilità del suo impiego e dal basso costo. I suoi limiti derivano invece dalla moderata sensibilità o specificità che sono da riportare, tuttavia, ai criteri diagnostici utilizzati. In vari studi epidemiologici è stato adottato il sistema a punti "Romhilt-Estes" che distingue

un'IVS “certa” da una “probabile”. In larga parte dei più recenti studi di intervento farmacologico sull'IVS i termini di riferimento diagnostico elettrocardiografico sono basati sui criteri “Cornell” del “prodotto voltaggio per durata di QRS” o più semplicemente sui soli criteri di voltaggio “Sokolow-Lyon”. Nello studio LIFE³ una diagnosi elettrocardiografica positiva per IVS risultava in due terzi dei casi in base ai criteri “Cornell”, in un terzo dei casi in base ai soli criteri “Sokolow-Lyon” e solo nel 10% in base ad ambedue i criteri. È stato valutato che nell'82% degli ipertesi con diagnosi elettrocardiografica di IVS risultano positivi anche i correnti criteri ecocardiografici. Fra gli ipertesi, quelli positivi per IVS anche in base a criteri elettrocardiografici hanno mediamente una massa ventricolare sinistra superiore a quella degli ipertesi risultati positivi per IVS solo all'esame ecocardiografico⁸.

1.4.2 Diagnosi ecocardiografica

A partire dal 1997, l'esame ecocardiografico è stato espressamente incluso, al pari del profilo lipidico, del diabete e della funzione renale, fra gli elementi utilizzati per una stratificazione prognostica completa del paziente iperteso. Attualmente, gli indici normali di massa ventricolare sinistra sono 20-48 g/m^{2,7} per l'uomo e 18-44 g/m^{2,7} per la donna³⁸. Tuttavia, i limiti di attendibilità della misurazione ecocardiografica dell'IVS costituisce a tutt'oggi un argomento ampiamente dibattuto e non completamente risolto. In particolare, l'importanza dell'aspetto metodologico per definire il valore della massa ventricolare sinistra negli ipertesi è risultata ben evidente in base allo studio RES (Reliability of M-mode Echocardiographic

Studies)⁶⁰, Lo studio ha documentato un'attendibilità accettabile dei risultati degli ecocardiogrammi quando si sia di fronte ad una franca IVS, ma con un errore di misura tra valutazioni ripetute comprese fra +18 e -18%; la probabilità di errore diventa maggiore quando le misurazioni vengano eseguite da operatori diversi. Fra le misurazioni in base alle quali viene calcolata la massa ventricolare sinistra, quella meno attendibile riguarda lo spessore della parete posteriore. L'impiego della tecnica bidimensionale con visualizzazione tissutale mediante mezzo di contrasto dovrebbe permettere di migliorare il grado di attendibilità. I risultati dello studio RES suggeriscono dunque che, in attesa di una maggiore diffusione di questa ottimizzazione metodologica, è opportuno che per confronti seriati nello stesso soggetto o per confronti fra soggetti, gli esami vengano eseguiti tutti nello stesso laboratorio e possibilmente dallo stesso esaminatore. Deve inoltre essere tenuto presente che, malgrado partecipassero allo studio RES centri di larga esperienza, la qualità delle registrazioni ecocardiografiche era sufficiente o ottima solo per il 79% dei tracciati. Mentre la valutazione della funzione sistolica ventricolare mediante eco-bidimensionale è ormai di impiego corrente e mediamente attendibile, la valutazione della funzione diastolica mediante eco-Doppler della velocità di flusso transmitralico risulta spesso non corretta in funzione dell'età del soggetto esaminato.

1.4.3 Diagnosi mediante risonanza magnetica

Al pari dell'ecocardiografia bidimensionale, la risonanza magnetica rappresenta un metodo accurato e sensibile per la valutazione quantitativa e morfologica della massa

ventricolare. Rispetto all'esame ecocardiografico, di impiego largamente più diffuso e di minor costo, la risonanza magnetica è caratterizzata da un alto potere di risoluzione spaziale e di caratterizzazione tissutale^{61,62} e, inoltre, i risultati non sono operatore-dipendenti. Mediamente, i valori di massa ventricolare sinistra rilevati mediante risonanza magnetica sono risultati inferiori del 9% rispetto a quelli della valutazione ecocardiografica⁶³. Al pari dell'ecocardiografia Doppler, la risonanza magnetica permette una valutazione dinamica sia della contrattilità segmentaria dei ventricoli, sia della funzione diastolica, elementi entrambi determinanti nella valutazione qualitativa ed eziologica dell'IVS.

Da quanto enunciato possiamo concludere quindi che la metodica di riferimento è la RM cardiaca che presenta un'accuratezza superiore e una maggiore riproducibilità.

L'ECG costituisce una metodica diagnostica peculiare. Infatti al contrario delle metodiche di imaging che valutano la struttura e la funzione cardiaca, l'ECG studia le proprietà elettriche del cuore e può fornire informazioni sul rimodellamento elettrico e le alterazioni cellulari secondarie all'ipertrofia. E' altamente riproducibile. Il limite è rappresentato dalla bassa sensibilità che è inferiore al 40% e che tende ad aumentare in funzione della severità dell'ipertrofia, mentre possiede una specificità superiore al 90%.

L'ecocardiografia presenta un'ottima accuratezza ma risente di una discreta variabilità intra ed inter-operatore, una minore riproducibilità ed è influenzata dalla finestra acustica. Nonostante i limiti intrinseci, l'ecocardiografia convenzionale continua ad essere la modalità di imaging di scelta per la valutazione della massa cardiaca nella pratica clinica di routine. L'ecocardiografia ha dimostrato

di caratterizzare in modo affidabile la massa ventricolare, e il suo uso è stato ampiamente validato in clinica e nella ricerca^{69,18}.

2 Lo Studio

2.1 Introduzione

Il seguente lavoro rappresenta uno studio esplorativo in cui abbiamo utilizzato un approccio Genome Wide. I dati presentati sono parte dei dati generati all'interno di due progetti:

1) "HYPERGENES Project" – European Network for Genetic Epidemiological Studies: utilizzando l'ipertensione arteriosa essenziale come modello di malattia, è concentrato sulla definizione di un modello epidemiologico genetico completo dei caratteri genetici complessi (progetto di collaborazione finanziato dalla Commissione europea nel 7th Framework Program)

2) "InterOmics Project" – consiste nello Sviluppo di una piattaforma integrata per l'applicazione delle scienze "omiche" alla definizione dei biomarcatori e profili diagnostici, predittivi e teranostici. Il progetto prevede lo sviluppo delle competenza per l'intera filiera delle "scienze omiche", con particolare riferimento alla genomica, proteomica, bioinformatica e system biology (finanziato dal MIUR-CNR).

2.2 Scopo dello studio

Lo studio è stato disegnato con l'obiettivo di indagare l'associazione tra varianti genetiche comuni e la massa ventricolare sinistra in pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale attraverso uno studio di associazione genome-wide e proporre uno score di rischio genetico ponderato che aggrega i loci di suscettibilità selezionati con lo scopo di incrementarne il valore predittivo.

2.3 Materiali e metodi

2.3.1 Coorte di studio

Sono stati arruolati 1029 pazienti, di origine caucasica, affetti da ipertensione arteriosa essenziale di nuova diagnosi, di grado lieve e moderato (SBP>140 mmHg o DBP>90 mmHg), mai trattati, in assenza di comorbidità importanti (diabete mellito, insufficienza renale, scompenso cardiaco...). I pazienti sono stati reclutati presso il Centro di diagnosi e cura dell'Iipertensione Arteriosa presso l'AOU di Sassari (739 pz) e presso altri dieci centri di ricerca italiani (290 pz) seguendo lo stesso protocollo di studio (tabella A1 in appendice).

Tutte le misure dei fenotipi cardiaci, renali e metabolici sono stati eseguiti dopo un periodo di run-in di 8 settimane durante il quale, per confermare la diagnosi di

ipertensione arteriosa, i pazienti hanno praticato una dieta iposodica standardizzata e sono state eseguite misurazioni della pressione arteriosa ambulatoriale con cadenza settimanale. Gli studi di farmaco genomica sono stati effettuati in collaborazione con il laboratorio di genetica e bioinformatica dell'Università di Milano^{66,6768}.

Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico locale della ASL n.1 - AOU di Sassari. Il consenso informato scritto è stato ottenuto per la valutazione fenotipica e per l'analisi del DNA: tutte le indagini cliniche sono state condotte in accordo con la Dichiarazione di Helsinki.

2.3.2 Misurazioni ecocardiografiche

Le dimensioni del ventricolo sinistro sono state misurate mediante ecocardiografia transtoracica (ETT) in accordo con le linee guida della Società Americana di Ecocardiografia³⁸.

Le misure del ventricolo sinistro sono state acquisite in proiezione parasternale asse lungo e ottenute attraverso metodica M-mode posizionando la traccia perpendicolarmente all'asse maggiore del ventricolo sinistro, immediatamente al di sotto della punta dei lembi della valvola mitrale. E' stata eseguita la media di almeno quattro misurazioni consecutive, eseguite in tele-diastole, per determinare lo spessore del setto interventricolare, il diametro telediastolico del ventricolo sinistro e lo spessore della parete posteriore. La massa cardiaca è stata stimata utilizzando l'equazione di Devereux e quindi indicizzata per altezza^{2.7}⁷¹.

L'ipertrofia ventricolare sinistra è stata definita come la presenza di una massa cardiaca indicizzata per altezza^{2.7} > 48 g/m^{2.7} negli uomini e > 44 g/m^{2.7} nelle donne⁷². I Riferimenti per la determinazione della massa ventricolare normale per misure lineari sono riportati nella tabella 1.

L'esame ecocardiografico è stato eseguito dallo stesso operatore e revisionato in cieco da un secondo operatore: l'interazione dei due operatore nella valutazione della massa cardiaca, sebbene in cieco l'uno con l'altro, è stata considerata come una covariata rilevante nell'analisi di associazione.

Table 1 Reference limits and partition values for left ventricular mass, determined by linear M-mode imaging.

	Women				Men			
	Reference range	Mildly abnormal	Moderately abnormal	Severely abnormal	Reference range	Mildly abnormal	Moderately abnormal	Severely abnormal
LVM (g)	67-162	163-186	187-210	≥ 211	88-224	225-258	259-292	≥ 293
LVM/BSA (g/m ²)	43-95	96-108	109-121	≥ 122	49-115	116-131	132-148	≥ 149
LVM/height (g/m)	41-99	100-115	116-128	≥ 129	52-126	127-144	145-162	≥ 163
LVM/height ^{2.7} (g/m ^{2.7})	18-44	45-51	52-58	≥ 59	20-48	49-55	56-63	≥ 64

BSA, body surface area; LVM, left ventricular mass; 2D, 2-dimensional (adapted from Ref. 18).

2.3.3 Genotipizzazione, imputazione, controllo di qualità

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico con procedure standard.

I campioni sono stati genotipizzati con l'Illumina Human 1M-Duo array nell'ambito del progetto "HYPERGENES" (n=901), e con l'Illumina HumanOmniExpress array nell'ambito del progetto "InterOmics" (n=139).

L'imputazione dei genotipi non direttamente tipizzati è stata condotta mediante il software SHAPEIT2⁷³ e Minimac⁷⁴ usando come riferimento il pannello 1000 Genomes (versione Marzo 2012). L'accuratezza di imputazione è stata valutata utilizzando "l'imputation R-square" (Rsq), un parametro fornito dal software Minimac, che stima il quadrato della correlazione tra genotipi imputati e veri, cioè il rapporto tra la varianza degli alleli imputati e il conteggio vero⁷⁹.

I marcatori con bassa frequenza dell'allele minore (MAF < 0.01) o con bassa qualità di imputazione (Rsq < 0.8) sono stati eliminati.

Undici soggetti sono stati esclusi dallo studio per la presenza di comorbidità (diabete o danno renale). Quindi 1,029 soggetti sono stati sottoposti al controllo di qualità dei dati genetici utilizzando il software PLINK (versione 1.07).

La parentela e la stratificazione della popolazione sono state esaminate mediante il software EIGENSOFT (versione 3.0).

Il campione finale era composto da 966 soggetti (figura S1 in appendice).

2.3.4 Analisi statistica

E' stata condotta inizialmente un'analisi di associazione dei caratteri quantitativi utilizzando i dosaggi degli alleli imputati attraverso il software Mach2qt⁷⁶.

Abbiamo eseguito un'analisi di regressione lineare per la massa ventricolare indicizzata per altezza^{2.7}, sotto un modello additivo aggiustato per sesso, pressione sistolica e diastolica, creatinina sierica, sodiuria delle 24 ore, attività reninica plasmatica prelevata da seduto, indice di massa corporea frequenza cardiaca, i primi dieci componenti principali e l'operatore ecocardiografico.

Quindi, prendendo in considerazione i risultati più interessanti in relazione al fenotipo studiato, abbiamo condotto un'analisi caso-controllo dividendo il nostro campione in due sottogruppi in base ai valori della massa ventricolare sinistra indicizzata per altezza^{2.7} secondo Lang RM et al³⁸: donne con LVM > 52 g/m^{2.7} e uomini con LVM > 56 g/m^{2.7} (n=158) sono stati considerati come casi, i restanti 615 pazienti con LVM nel range di normalità (donne < 44 g/m^{2.7}, uomini < 48 g/m^{2.7}) sono stati considerati controlli.

2.3.5 Score di rischio genetico ponderato

Abbiamo applicato una misura aggregata del rischio di ipertrofia ventricolare sinistra sulla base dei loci di suscettibilità selezionati. Seguendo il modello presentato da De Jager PL et al⁷⁷, abbiamo selezionato gli SNPs in KSR2, ROCK1, CACNA1D, TRAF5, IGF1, FGFR1, e SOX5 e abbiamo progettato uno score di rischio genetico

ponderato (wGRS). Lo score di rischio genetico ponderato è stato calcolato moltiplicando il numero di alleli di rischio per ogni SNPs in base al peso dello SNPs (effetto beta) e sommando i 7 SNPs secondo la seguente formula:

$$GRS = \sum_{i=1}^7 w_i \times X_i$$

Dove i è lo SNP, w_i è il peso dello SNP i , e X_i è il numero degli alleli di rischio (0, 1 o 2).

Il peso relativo di ogni SNP è mostrato in tabella S2 in appendice. Dopo aver calcolato lo score di rischio genetico ponderato abbiamo testato la distribuzione dello score nei casi e nei controlli, usando un t-test a due campioni. I gruppi sono stati definiti come nell'analisi caso-controllo sopra descritta. Poichè uno score continuo è difficile da interpretare abbiamo suddiviso i soggetti in diverse categorie di rischio. Sono state definite sette categorie utilizzando la media e la deviazione standard del campione di controlli in base alle seguenti deviazioni standard della media +/- 0.25, +/- 0.75 e +/- 1.25. Abbiamo utilizzato il gruppo appartenente alla categoria 4 come categoria di riferimento: questa categoria rappresenta approssimativamente il gruppo di soggetti con la massa ventricolare sinistra media. Sono state definite ulteriori sei categorie a cui appartengono i soggetti con score di rischio genetico ponderato progressivamente crescenti (tabella 1, figura S2). All'interno del dataset casi-controlli, abbiamo calcolato l'odds ratio per ogni categoria.

Per determinare il potere predittivo di questo algoritmo preliminare abbiamo costruito una curva ROC che mette in relazione la sensibilità della metodica con l'inverso della sua specificità ed abbiamo calcolato l'area al di sotto della curva (AUC).

2.4 Risultati

Le principali caratteristiche della coorte studiata sono riportate in tabella 2.

I partecipanti allo studio erano costituiti da soggetti di origine caucasica, affetti da ipertensione arteriosa essenziale ed includevano 333 donne (il 34.5% del campione), l'età media era di 47.8 \pm 9.0 anni, mentre la massa cardiaca media indicizzata per altezza^{2.7} era di 44.5 \pm 10 g/m^{2.7} (\pm SD).

2.4.1 Analisi di associazione quantitativa

L'analisi di regressione lineare è stata eseguita per massa ventricolare sinistra indicizzata per altezza^{2.7} dopo aggiustamento per le covariate. Utilizzando una soglia di significatività con p-value di 1x10⁻⁵ per le associazioni suggestive, ed escludendo gli SNPs in linkage disequilibrium ($r^2 \geq 0.8$) o mappanti nei deserti genici, abbiamo infine selezionato 85 SNPs (tabella S3, figura S3 e S4).

Tra questi sono stati selezionati quattordici SNPs appartenenti a geni associati alla massa ventricolare sinistra (tabella 3, figure S5 e S6): rs12369523 in KSR2; rs35996865 in ROCK; rs78633628 in WWOX; rs17068332 and rs76156580 in CSMD1; rs183544012 in CACNA1D; rs10863888 in TRAF5; rs6590636 in CNTN5; rs79910493 in IGF; rs13023211 in FIGN; rs76472108 in RGS7; rs2288696 in FGFR1; and rs7137607 in SOX5.

I polimorfismi così selezionati mappavano in regioni introniche ad eccezione di rs35996865, che mappava 532 basi a monte del gene ROCK1 (figura S5b).

In accordo con il software Variant Effect Predictor della banca dati di Ensembl, e delle banche dati di TRANSFAC® e UCSC la variante si trova nella regione promotore del gene^{78,79,80}.

Dati non ancora pubblicati confermerebbero che la regione promotrice del gene umano ROCK1 si estende circa 1200 bp a monte del sito di inizio trascrizione⁸¹.

Abbiamo controllato quindi che rs35996865 si trovasse in un sito di binding. Utilizzando l'algoritmo PATCH della banca dati TRANSFAC® abbiamo caratterizzato alcuni probabili siti di binding per i fattori di trascrizione adiacenti a rs35996865 (Egr-1, TAFII250, WRNIP1, RNF96, SP1, SOX4, SRF, AML1/ETO).

2.4.2 Analisi caso-controllo

Per valutare il rischio associato ai 14 SNPs selezionati è stata eseguita un'analisi caso-controllo applicando una analisi di regressione logistica. Le caratteristiche cliniche dei due gruppi sono riportate in tabella 2. I casi e i controlli erano simili per quanto riguarda la creatinina, sodiuria delle 24 ore, frequenza cardiaca, glicemia, potassiuria delle 24 ore. I valori di pressione arteriosa sistolica, diastolica, attività reninica da seduto ed indice di massa corporea erano maggiori nei casi rispetto ai controlli. L'età risultava leggermente differente tra i casi e i controlli sebbene non esistano prove che l'età possa condizionare la massa cardiaca.

Tutti gli SNPs nella regressione lineare hanno mostrato un'associazione significativa con la massa ventricolare sinistra, mostrando che i portatori di alleli di rischio hanno una probabilità maggiore di 1 di essere dei casi rispetto ai controlli (tabella 3).

2.4.3 Score di rischio genetico ponderato

Abbiamo infine calcolato uno score di rischio genetico ponderato per valutare il possibile utilizzo di questo modello di stratificazione sperimentale. Lo score di rischio ponderato è basato sull'effetto beta dei 7 loci di suscettibilità selezionati attraverso l'analisi di associazione genome-wide. Utilizzando questo modello, i casi avevano uno score medio di 0.99 ± 0.26 , mentre i controlli di 0.77 ± 0.24 (t-test a due campioni $p\text{-value} < 0.00001$, figura 1). Per rappresentare la differenza nella distribuzione degli score genetici ponderati tra casi e controlli abbiamo suddiviso i soggetti in 7 categorie di rischio. La percentuale maggiore di soggetti nel gruppo di controllo (il 19.4% circa) apparteneva alla categoria 3, mentre la maggior parte dei soggetti nel gruppo dei casi (il 35.44% circa) apparteneva alla categoria 7, che mostra un più alto rischio di suscettibilità genetica per l'ipertrofia ventricolare sinistra. All'interno del dataset casi-controllo, abbiamo calcolato gli odds ratio per ogni categoria, prendendo la categoria 4 come categoria di riferimento (tabella 1). L'analisi statistica eseguita sulla categoria 1, 2 e 3 non ha raggiunto valori di p significativi. Gli individui nelle categorie 5, 6 e 7, quelli cioè con il più alto score di rischio genetico, avevano una probabilità di 2.22, 4.30 e 5.30 volte maggiore, rispettivamente, di sviluppare ipertrofia ventricolare sinistra rispetto ai soggetti normali presenti in categoria 4 ($p\text{-value} < 0.01$). La distribuzione della massa ventricolare sinistra in accordo con le categorie di rischio è riportata in figura 2b (beta 1.78, $p\text{-value} 5.03 \times 10^{-27}$). Per esaminare il potere discriminante dello score di rischio genetico abbiamo tracciato una curva ROC che presenta un'AUC del 73.35%

(figura 3). L'odd ratio dello score di rischio genetico ponderato sullo status caso-controllo è stato di 24.37 ± 9.08 (CI 95%: 11.75-50.58, p-value < 0.0001).

Table 1: Distribution of subjects in the risk categories and odds ratios of left ventricular mass in each risk category.

Categories	Formula	Score	N (%) controls	N (%) cases	OR	p-value
1	mean -1.25 SD	≤ 0.470	61 (9.92)	2 (1.27)	0.24	0.06
2	mean -0.75 SD	0.470-0.591	101 (16.42)	6 (3.80)	0.43	0.09
3	mean -0.25 SD	0.59-0.713	122 (19.84)	20 (12.66)	1.19	0.63
4 (Ref)	mean	0.714-0.834	116 (18.86)	16 (10.13)	-	-
5	mean +0.25 SD	0.83 -0.955	85 (13.82)	26 (16.46)	2.22	0.022
6	mean +0.75 SD	0.956-1.077	54 (8.78)	32 (20.25)	4.30	<0.0001
7	mean +1.25 SD	> 1.077	76 (12.36)	56 (35.44)	5.34	< 0.0001
TOT			615 (79.56)	158 (20.44)		

In the table, for each category, is reported the number and percentage of controls and cases. The frequency is calculated according to the total number of individuals for each status. Glossary: SD, standard deviation; OR, odds ratio.

Table 2: Characteristics of the analyzed subjects in the total sample and in cases/controls.

Characteristics	Total sample (n=966)	Cases (n=158)	Controls (n=615)	p-value
Sex, M/F	633/333	97/61	417/198	NS
Age, years	47.8 ± 9.0	49.3 ± 8.0	47.6 ± 9.1	3.53E-02
LVMh ^{2.7} , g/m ^{2.7}	44.5 ± 10.0	60.7 ± 6.0	38.6 ± 5.8	1.27E-202
SBP, mmHg	154.8 ± 12.4	159.5 ± 14.8	153.1 ± 10.6	7.75E-10
DBP, mmHg	100.1 ± 8.0	102.5 ± 8.0	99.0 ± 8.0	1.61E-07
Heart rate, b.p.m.	75.4 ± 10.0	73.9 ± 10.5	75.6 ± 9.7	NS
Urine sodium, mEq/24 h	148.0 ± 51.0	147.7 ± 41.0	145.9 ± 52.3	NS
Urine potassium, mEq/24 h	56.5 ± 20.3	54.9 ± 15.1	57.2 ± 22.1	NS
sPRA, ng/mL/h	1.4 ± 1.1	1.6 ± 1.0	1.3 ± 1.1	1.92E-03
Glycaemia, mg/dl	89.8 ± 11.0	89.0 ± 10.0	89.6 ± 11.0	NS
Serum creatinine, mg/dl	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	NS
BMI, kg/m ²	27.2 ± 3.6	28.2 ± 3.5	26.7 ± 3.4	2.04E-06

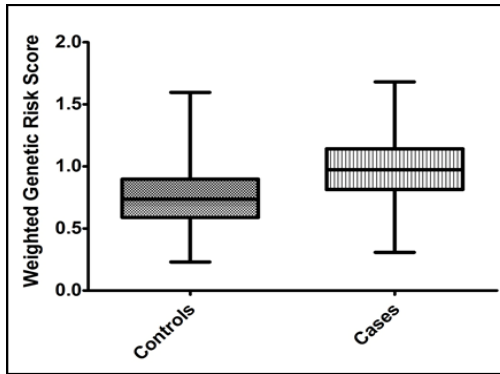
Values are reported as mean±standard deviation. P-values of comparison among groups are reported. Glossary: LVMh^{2.7}, left ventricular mass indexed for height^{2.7}; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; b.p.m, beats per minute; sPRA, sitting plasma renin activity; BMI, body mass index; NS, non-significant.

Table 3: Fourteen functional SNPs associated to left ventricular mass (LVMh^{2.7}) trait in linear and case-control regression analyses.

Genomic context						Quantitative analysis (Linear Regression)				Case-control analysis (Logistic regression)			
SNP	Chr	Position (bp)	Gene	Location	Alleles	Risk allele	Beta	SE	p-value	OR	p-value	95% CI	
rs12369523	12	118309008	KSR2	intron	A/G	0.57	2.25	0.43	1.37E-07	1.7	3.62E-04	1.27	2.27
rs35996865	18	18692344	ROCK1	upstream	G/T	0.3	2.33	0.46	3.17E-07	1.7	5.02E-04	1.26	2.3
rs78633628	16	78971380	WVOX	intron	T/C	0.99	10.95	2.46	8.66E-06	/	/	/	/
rs17068332	8	3833181	CSMD1	intron	C/T	0.88	2.63	0.63	3.05E-05	2.46	2.62E-04	1.52	3.99
rs183544012	3	53747902	CACNA1D	intron	T/C	0.02	6.46	1.57	3.93E-05	3.92	9.92E-04	1.74	8.83
rs10863888	1	211502769	TRAF5	intron	G/A	0.59	1.71	0.42	4.23E-05	1.99	8.34E-06	1.47	2.69
rs6590636	11	100047729	CNTN5	intron	A/C	0.44	1.71	0.42	4.30E-05	1.81	3.84E-05	1.37	2.41
rs79910493	12	102843754	IGF1	intron	T/C	0.02	5.94	1.46	4.60E-05	2.77	1.10E-02	1.27	6.06
rs13023211	2	164504320	FIGN	intron	A/G	0.86	2.55	0.63	4.85E-05	1.86	7.00E-03	1.18	2.94
rs76472108	1	241304791	RGS7	intron	C/G	0.02	6.07	1.54	7.71E-05	3.72	1.10E-02	1.68	8.24
rs76156580	8	4474130	CSMD1	intron	A/C	0.01	8.53	2.16	7.98E-05	4.62	5.00E-03	1.58	13.54
rs2288696	8	38286225	FGFR1	intron	G/A	0.81	2.06	0.53	8.79E-05	1.73	5.00E-03	1.18	2.54
rs7137607	12	23778584	SOX5	intron	A/C	0.55	1.61	0.41	9.63E-05	1.69	3.23E-04	1.27	2.26
rs9284436	19	607108	HCN2	intron	C/T	0.43	1.75	0.44	5.89E-05				

To retrieve information about SNPs and their genomic context (the nearest gene) we used the hg19 assembly. Glossary: SNP, single nucleotide polymorphism; chr, chromosome; bp, base pair; SE, standard error; OR, odds ratio; and 95% CI, 95% confidence intervals. *not calculable (cases with heterozygous genotype are missing).

Figure 1: Box plot of the weighted genetic risk score distribution in control and in case groups.



Mean values are indicated in the plot.

Figure 2: Box plot of weighted genetic risk score (a) and left ventricular mass (b) distribution in each risk category defined by the weighted genetic risk score.

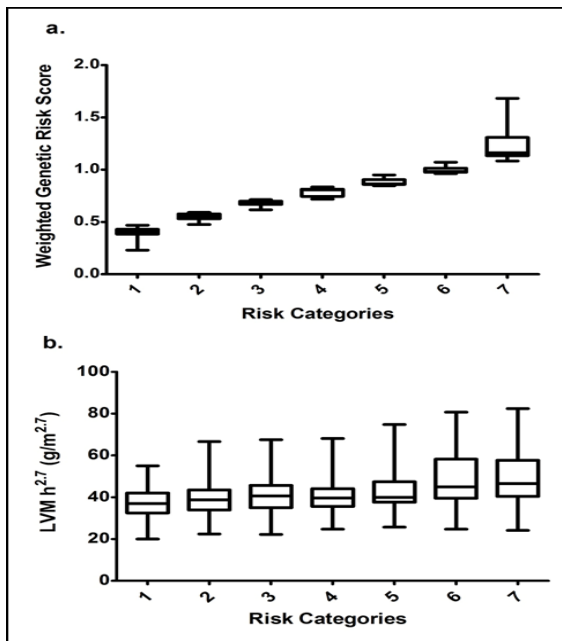
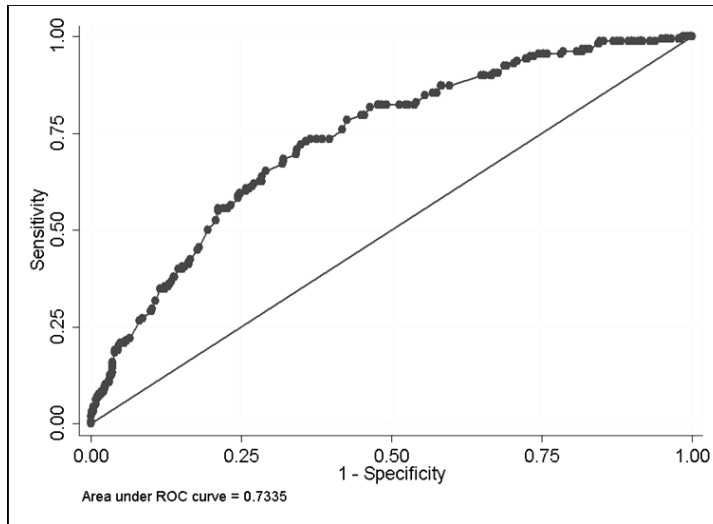


Figure 3: ROC curve analysis of the discriminatory power of weighted genetic risk score in predicting left ventricular mass.



The graph is generated by plotting the sensitivity of continuous wGRS against 1-specificity. The area under ROC curve is 73.35%

2.5 Discussione

Con il presente studio esplorativo abbiamo cercato di individuare, attraverso un'analisi di associazione genome-wide, le varianti genetiche associate all'ipertrofia ventricolare sinistra in un'ampia coorte di pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale di grado lieve e moderato, mai trattati. L'assenza di un precedente trattamento anti-ipertensivo costituisce un'importante caratteristica della nostra coorte di studio in quanto permette di non alterare il fenotipo, riducendo così il "rumore di fondo" che spesso influenza i risultati degli studi di associazione genotipo-fenotipo.

Riteniamo sia importante sottolineare che la massa cardiaca è sensibile al trattamento antipertensivo e che i farmaci comunemente impiegati per controllare la pressione arteriosa, ad eccezione dei vasodilatatori diretti, modificano massa cardiaca. Gli studi di associazione genome-wide in questo contesto per essere attendibili dovrebbero basarsi pertanto su pazienti ipertesi mai trattati.

La massa ventricolare sinistra è riconosciuta come un potente fattore di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari e quindi non può essere considerata soltanto come un semplice adattamento del ventricolo sinistro al sovraccarico cronico di pressione^{82,83}.

Nel complesso abbiamo identificato 85 SNPs con un p-value < 10⁻⁵, dopo aver escluso gli SNPs ridondanti per LD e gli SNP che mappavano nei deserti genici.

Tra questi SNPs alcuni appartengono a geni precedentemente descritti per il loro ruolo chiave nella patogenesi dell'ipertrofia cardiaca: ROCK1, IGF1, CACNA1D, FGFR1, TRAF5, SOX5, KSR2.

Altri geni identificati nello studio hanno invece un ruolo marginale nel determinare l'ipertrofia ventricolare sinistra: WWOX, RGS7, CSMD1, CNTN5, FIGN e HCN2. La Tabella S4 mostra i loci di maggiore interesse identificati nel nostro studio e il loro ruolo funzionale in base a precedenti studi sperimentali: ciascuno di essi potrebbe svolgere un possibile ruolo nel determinare il fenotipo finale dell'ipertrofia ventricolare sinistra.

-ROCK1 ha mostrato di avere un ruolo, in vivo, nella patogenesi dell'ipertrofia cardiaca e nel rimodellamento ventricolare⁸⁴.

-IGF1 è un mediatore dello sviluppo cardiaco e della ipertrofia fisiologica⁸⁵.

-CACNA1D è coinvolto nella contrazione cardiaca e della muscolatura liscia vascolare ed ha un ruolo eziopatogenico nella cardiomiopatia ipertrofica.

-FGFR1 è il principale recettore a livello cardiaco dei fattori di crescita dei fibroblasti e media i loro effetti interagendo con le cardiomiocine⁸⁶.

-TRAF5 svolge un ruolo importante nello sviluppo dell'ipertrofia cardiaca attraverso la regolazione inibitoria della via di trasduzione del segnale MEK-ERK1/2⁸⁷.

-L'espressione di SOX5 è modulata dall'ossido nitrico i cui livelli sono significativamente correlati con la massa ventricolare sinistra; inoltre regola l'espressione dei canali muscolari del calcio di tipo-L associati all'ipertrofia cardiaca⁸⁸.

-KSR2 coordina l'attivazione della cascata Ras-Raf-MEK-ERK in risposta ai segnali del calcio e svolge una funzione protettiva anti-apoptotica e ha un ruolo nella genesi dell'ipertrofia cardiaca⁸⁹.

Questi dati dimostrano il potenziale ruolo di questi geni nel determinare l'ipertrofia ventricolare sinistra.

L'identificazione delle varianti alleliche riportate nel nostro studio potrebbe essere significativa da un punto di vista clinico.

L'identificazione di un singolo polimorfismo che esercita un modesto effetto sul fenotipo è di scarsa utilità, anche se risulta essere comune nella popolazione generale. Per questo motivo la combinazione dei sette loci di suscettibilità integrati in uno score di rischio genetico ponderato, combinando il debole effetto di ogni variante, consente di incrementare la probabilità di predire il rischio di ipertrofia ventricolare sinistra e nella nostra coorte ha dimostrato una consistente capacità discriminatoria.

L'eventuale aggiunta di loci di suscettibilità all'interno dello score di rischio potrebbe aumentarne l'efficienza predittiva. Per questo motivo sarà necessario eseguire ulteriori valutazioni della metodica includendo anche nuovi loci di suscettibilità ed integrarla con i fattori di rischio ambientali.

2.6 Conclusioni

Abbiamo descritto dei loci associati alla massa ventricolare sinistra che possiedono un ruolo fisiopatologico dimostrato nella genesi dell'ipertrofia cardiaca. Poiché gli

studi di associazione genome-wide sono studi esplorativi è importante che questi risultati vengano interpretati con cautela. Siamo consapevoli che la replica dei risultati in coorti indipendenti rappresenta il gold standard per determinare se i risultati ottenuti rappresentino dei veri-positivi. La conferma delle associazioni genetiche identificate necessita di ampi campioni di studio generati raggruppando numerosi studi con un simile disegno sperimentale.

I punti di forza del nostro studio, rappresentati dall' omogeneità fenotipica e genotipica della nostra coorte e all'assenza di precedenti terapie antipertensive, potrebbero rafforzare la potenza statistica del nostro studio per rilevare un effetto genetico.

Alcuni limiti del nostro studio meritano un commento. In primo luogo, il nostro approccio possiede una potenza statistica limitata per poter rilevare l'associazione del fenotipo con SNPs rari. Nel nostro studio abbiamo valutato un modello additivo di associazione ma sono necessarie ulteriori indagini per rilevare effetti genetici non additivi. Inoltre i risultati degli studi GWA possono identificare regioni genomiche che non presentano un meccanismo fisiopatologico di associazione o di causalità noto. Nonostante questo tali SNPs potrebbero essere utilizzati per stratificare i pazienti in funzione del rischio di ipertrofia ventricolare sinistra, applicando uno score di rischio ponderato, indipendentemente dalla conoscenza della funzione, nota o meno, del gene.

3 Bibliografia

1. Uptodate. Left ventricular hypertrophy and arrhythmia. Definition and etiologies of LVH. Philip J Podrid, MD, FACC
2. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999; 341: 1276-83.
3. Dalhlof B, Devereux R, De Faire U, et al. The Losartan Intervention for Endpoint Reduction (LIFE) in hypertension study. *Am J Hypertens* 1997; 10: 705-13.
4. Meta-analysis of left ventricular hypertrophy and sustained arrhythmias. Chatterjee S, Bavishi C, Sardar P, Agarwal V, Krishnamoorthy P, Grodzicki T, Messerli FH . *Am J Cardiol.* 2014 Oct;114(7):1049-52. Epub 2014 Jul 18.
5. Precursors of sudden coronary death. Factors related to the incidence of sudden death. Kannel WB, Doyle JT, McNamara PM, Quickenton P, Gordon T *Circulation.* 1975;51(4):606.
6. Role of blood pressure in the development of congestive heart failure. The Framingham study. Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM, McKee PA, Feinleib M . *N Engl J Med.* 1972;287(16):781.
7. L'ipertrofia cardiaca fisiologica e patologica. Bruno Magnani. *Ital Heart J* Vol 1 Suppl 2 2000
8. Fragola PV, Colivicchi F, Fabrizi E, Borzi M, Cannata D. Assessment of left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. A rational basis for the electrocardiogram. *Am J Hypertens* 1993; 6: 164-9.
9. Abergel E, Tase M, Bohlender J, Menard J, Chatellier G. Which definition for echocardiographic left ventricular hypertrophy? *Am J Cardiol* 1995; 75: 498-502.
10. Gardin JM, Arnold A, Gottdiener JS, Wong ND, Fried LP, Klopfenstein HS, et al. Left ventricular mass in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Hypertension.* 1997; 29:1095-103.
11. Kannel WB. Left ventricular hypertrophy as a risk factor: the Framingham experience. *J Hypertens Suppl.* 1991; 9:S3-8; discussion S8-9.

12. Daniels SR, Kimball TR, Morrison JA, Khoury P, Witt S, Meyer RA. Effect of lean body mass, fat mass, blood pressure, and sexual maturation on left ventricular mass in children and adolescents. Statistical, biological, and clinical significance. *Circulation*. 1995; 92:3249-54.
13. Ruilope LM, Schmieder RE. Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2008; 21:500-8.
14. Garner C, Lecomte E, Visvikis S, Abergel E, Lathrop M, Soubrier F. Genetic and environmental influences on left ventricular mass. A family study. *Hypertension*. 2000; 36:740-6.
15. Daichi Shimbo,* Paul Muntner, Devin Mann, R. Graham Barr, Weihong Tang, Wendy Post, Joao Lima, Gregory Burke, David Bluemke, and Steven Shea. Association of Left Ventricular Hypertrophy With Incident Hypertension: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis *Am J Epidemiol*. 2011 Apr 15; 173(8): 898–905.
16. Thor Edvardsen, MD, PhD, a Boaz D. Rosen, MD, Li Pan, MS, Michael Jerosch-Herold, MD, Shenghan Lai, MD, PhD, W. Gregory Hundley, MD, Shantanu Sinha, PhD, Richard A. Kronmal, PhD, David A. Bluemke, MD, PhD, and Joa A.C. Lima, MD, Regional diastolic dysfunction in individuals with left ventricular hypertrophy measured by tagged magnetic resonance imaging—The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) *Am Heart J* 2006;151:109- 14.
17. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990 May 31;322(22):1561-6.
18. Foppa M, Duncan BB, Rohde LE. Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? *Cardiovasc Ultrasound*. 2005 Jun 17;3:17. Review.
19. Kaess BM, Gona P, Larson MG, Cheng S, Aragam J, Kenchaiah S, et al. Secular trends in echocardiographic left ventricular mass in the community: the Framingham Heart Study. *Heart*. 2013; 99:1693-8.

20. Yeon SB, Salton CJ, Gona P, Chuang ML, Blease SJ, Han Y, et al. Impact of age, sex, and indexation method on MR left ventricular reference values in the Framingham Heart Study offspring cohort. *J Magn Reson Imaging*. 2015; 41:1038-45.
21. De Simone G, Devereux RB, Daniels SR, Meyer RA. Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension*. 1995; 26:979-83.
22. Drazner MH, Dries DL, Peshock RM, Cooper RS, Klassen C, Kazi F, Willett D, Victor RG. Left ventricular hypertrophy is more prevalent in blacks than whites in the general population: the Dallas Heart Study. *Hypertension*. 2005; 46:124-9.
23. Arnett DK, Strogatz DS, Ephross SA, Hames CG, Tyroler HA. Greater incidence of electrocardiographic left ventricular hypertrophy in black men than in white men in Evans County, Georgia. *Ethn Dis*. 1992; 2:10-7.
24. De Simone G. Left ventricular hypertrophy in blacks and whites: different genes or different exposure? *Hypertension*. 2005; 46:23-4.
25. Soliman EZ, Byington RP, Bigger JT, Evans G, Okin PM, Goff DC Jr, Chen H. Effect of Intensive Blood Pressure Lowering on Left Ventricular Hypertrophy in Patients With Diabetes Mellitus: Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Blood Pressure Trial. *Hypertension*. 2015 Dec;66(6):1123-9
26. Zhang K, Huang F, Chen J, Cai Q, Wang T, Zou R, Zuo Z, Wang J, Huang H. Independent influence of overweight and obesity on the regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2014 Nov;93(25):e130
27. Minicucci MF¹, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling induced by smoking: concepts, relevance, and potential mechanisms. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012 Dec;11(6):442-7.
28. Ferreira Filho C, Abreu LC, Valenti VE, Ferreira M, Meneghini A, Silveira JA, Riera AR, Colombari E, Murad N, Santos-Silva PR, Silva LJ, Vanderlei LC, Carvalho TD, Ferreira C. Anti-hypertensive drugs have different effects

- on ventricular hypertrophy regression. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010 Jul;65(7):723-8.
29. Fagard RH¹, Celis H, Thijs L, Wouters S. Regression of left ventricular mass by antihypertensive treatment: a meta-analysis of randomized comparative studies. *Hypertension*. 2009 Nov;54(5):1084-91. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.136655. Epub 2009 Sep 21.
 30. Morita H¹, Larson MG, Barr SC, Vasan RS, O'Donnell CJ, Hirschhorn JN, Levy D, Corey D, Seidman CE, Seidman JG, Benjamin EJ Single-gene mutations and increased left ventricular wall thickness in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2006 Jun 13;113(23):2697-705. Epub 2006 Jun 5.
 31. Vasan RS, Glazer NL, Felix JF, Lieb W, Wild PS, Felix SB, Watzinger N, Larson MG, Smith NL, Dehghan A, Grosshennig A, Schillert A, Teumer A, Schmidt R, Kathiresan S. et al Genetic variants associated with cardiac structure and function: a meta-analysis and replication of genome-wide association data. *JAMA*. 2009 Jul 8;302(2):168-78.
 32. Arnett DK, Devereux RB, Rao DC, Li N, Tang W, Kraemer R, Claas SA, Leon JM, Broeckel U. Novel genetic variants contributing to left ventricular hypertrophy: the HyperGEN study. *J Hypertens*. 2009 Aug;27(8):1585-93
 33. Fox ER¹, Musani SK, Barbalic M, Lin H, Yu B, Ogunyankin KO, Smith NL, Kutlar A, Glazer NL, Post WS, Paltoo DN, Dries DL, Farlow DN, Duarte CW, Kardia SL, Meyers KJ, Sun YV, Arnett DK, Patki AA, Sha J, Cui X, Samdarshi TE, Penman AD, Bibbins-Domingo K, Bůžková P, Benjamin EJ, Bluemke DA, Morrison AC, Heiss G, Carr JJ, Tracy RP, Mosley TH, Taylor HA, Psaty BM, Heckbert SR, Cappola TP, Vasan RS. Genome-wide association study of cardiac structure and systolic function in African Americans: the Candidate Gene Association Resource (CARE) study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013 Feb;6(1):37-46.
 34. Bella JN, Göring HH. Genetic epidemiology of left ventricular mass. *Am J Cardiovasc Dis*. 2012; 2(4): 267-78.

35. Jin Y, Kuznetsova T, Bochud M, Richart T, Thijs L, Cusi D, Fagard R, Staessen JA. Heritability of left ventricular structure and function in Caucasian families. *Eur J Echocardiogr.* 2011; 12:326-32.
36. Garner C, Lecomte E, Visvikis S, Abergel E, Lathrop M, Soubrier F. Genetic and environmental influences on left ventricular mass. A family study. *Hypertension.* 2000; 36:740-6.
37. Arnett DK¹, Li N, Tang W, Rao DC, Devereux RB, Claas SA, Kraemer R, Broeckel U. Genome-wide association study identifies single-nucleotide polymorphism in *KCNB1* associated with left ventricular mass in humans: the HyperGEN Study. *BMC Med Genet.* 2009 May 19;10:43. doi: 10.1186/1471-2350-10-43.
38. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005; 18:1440-63.
39. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GA. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1994; 330:1634-8.
40. Celentano A, Mancini FP, Crivaro M, Palmieri V, Ferrara LA, De Stefano V, et al. Cardiovascular risk factors, angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism, and left ventricular mass in systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1999; 83:1196-200.
41. Doolan G, Nguyen L, Chung J, Ingles J, Semsarian C. Progression of left ventricular hypertrophy and the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2004; 96:157-63.

42. Kuznetsova T, Staessen JA, Thijs L, Kunath C, Olszanecka A, Ryabikov A, et al. Left Ventricular mass in relation to genetic variation in angiotensin II receptors, renin system genes, and sodium excretion. *Circulation*. 2004; 110:2644-50.
43. Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H, et al. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation*. 1998; 97:569-75.
44. Nagy Z, Busjahn A, Bähring S, Faulhaber HD, Gohlke HR, Knoblauch H, et al. Quantitative trait loci for blood pressure exist near the IGF-1, the Liddle syndrome, the angiotensin II-receptor gene and the renin loci in man. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:1709-16.
45. Kuch-Wocial A, Slubowska K, Kostrubiec M, Pasierski T, Januszewicz W, et al. Plasma neuropeptide Y immunoreactivity influences left ventricular mass in pheochromocytoma. *Clin Chim Acta*. 2004; 345:43-7.
46. Semplicini A, Siffert W, Sartori M, Monari A, Naber C, Frigo G, et al. G protein beta3 subunit gene 825T allele is associated with increased left ventricular mass in young subjects with mild hypertension. *Am J Hypertens*. 2001; 14:1191-5.
47. Xin Y, Song X, Xue H, Liu Z, Wang X, Wang H, et al. A common variant of the eNOS gene (E298D) is an independent risk factor for left ventricular hypertrophy in human essential hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 117:67-73.
48. Flavell DM, Jamshidi Y, Hawe E, Pineda Torra I, Taskinen MR, Frick MH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease. *Circulation*. 2002; 105:1440-5.
49. Menni C, Boffi L, Cesana F, Viviani Anselmi C, Nava S, Bertola F, et al. Variant on chromosome 9p is associated with left ventricular mass: results

- from two cohorts of essential hypertensive individuals. *J Hypertens.* 2012; 30:2144-50.
50. Mayosi BM, Avery PJ, Farrall M, Keavney B, Watkins H. Genome-wide linkage analysis of electrocardiographic and echocardiographic left ventricular hypertrophy in families with hypertension. *Eur Heart J.* 2008; 29:525-30.
51. Hong KW, Shin DJ, Lee SH, Son NH, Go MJ, Lim JE, et al. Common variants in RYR1 are associated with left ventricular hypertrophy assessed by electrocardiogram. *Eur Heart J.* 2012; 33:1250-6.
52. Barve RA, Gu CC, Yang W, Chu J, Dávila-Román VG, de las Fuentes L. Genetic association of left ventricular mass assessed by M-mode and two-dimensional echocardiography. *J Hypertens.* 2016; 34:88-96.
53. Shi J, Zhang YW, Yang Y, Zhang L, Wei L. ROCK1 plays an essential role in the transition from cardiac hypertrophy to failure in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 49:819-28.
54. Yang HC, Liang YJ, Chen JW, Chiang KM, Chung CM, Ho HY, et al. Identification of IGF1, SLC4A4, WWOX, and SFMBT1 as hypertension susceptibility genes in Han Chinese with a genome-wide gene-based association study. *PLoS One.* 2012; 7:e32907
55. Cambronero F, Marín F, Roldán V, Hernández-Romero D, Valdés M, Lip GY. Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *Eur Heart J.* 2009; 30:139-51.
56. Zheng Z, Wang ZM, Delbono O. Charge movement and transcription regulation of L-type calcium channel alpha(1S) in skeletal muscle cells. *J Physiol.* 2002; 540:397-409.
57. Kato N, Takeuchi F, Tabara Y, Kelly TN, Go MJ, Sim X et al. Meta-analysis of genome wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet.* 2011; 43:531-538.

58. McMullen JR, Izumo S. Role of the insulin-like growth factor 1 (IGF1)/phosphoinositide-3-kinase (PI3K) pathway mediating physiological cardiac hypertrophy. *Novartis Found Symp.* 2006; 274:90-111.
59. Hong KW, Go MJ, Jin HS, Lim JE, Lee JY, Han BG, et al. Genetic variations in ATP2B1, CSK, ARSG and CSMD1 loci are related to blood pressure and/or hypertension in two Korean cohorts. *J Hum Hypertens.* 2010; 24:367-372.
60. De Simone G, Muiesan ML, Ganau A, et al. Reliability and limitations of echocardiographic measurement of left ventricular mass for risk stratification and follow-up in single patients: the RES trial. *J Hypertens* 1999; 17: 1955-63.
61. Fattori R, Rapezzi C, Castriota F, et al. Significato clinico della risonanza magnetica e correlazioni ecocardiografiche nella valutazione della cardiomiopatia ipertrofica. *Radiol Med (Torino)* 1994; 88: 36-43.
62. Fattori R, Rocchi G, Celletti F, Bertaccini P, Rapezzi C, Gavelli G. Contribution of magnetic resonance imaging in the differential diagnosis of cardiac amyloidosis and symmetric hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1998; 136: 824-30.
63. Germain P, Roul G, Kastler B, et al. Inter-study variability in left ventricular mass measurement. Comparison between Mmode echocardiography and magnetic resonance imaging. *Eur Heart J* 1992; 13: 1011-9.
64. Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41:2351-5
65. Dougherty MK, Ritt DA, Zhou M, Specht SI, Monson DM, Veenstra TD, et al. KSR2 is a calcineurin substrate that promotes ERK cascade activation in response to calcium signals. *Mol Cell.* 2009; 34:652-62.
66. Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. Genomewide association study using a high-density single nucleotide polymorphism array and case-control design identifies a novel essential

- hypertension susceptibility locus in the promoter region of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2012; 59:248-55.
67. Frau F, Zaninello R, Salvi E, Ortu MF, Braga D, Velayutham D, et al. Genome-wide association study identifies CAMKID variants involved in blood pressure response to losartan: the SOPHIA study. *Pharmacogenomics*. 2014; 15:1643-52.
 68. Chittani M, Zaninello R, Lanzani C, Frau F, Ortu MF, Salvi E, et al. TET2 and CSMD1 genes affect SBP response to hydrochlorothiazide in never-treated essential hypertensives. *J Hypertens*. 2015; 33:1301-9.
 69. Celebi AS, Yalcin H, Yalcin F. Current cardiac imaging techniques for detection of left ventricular mass. *Cardiovasc Ultrasound*. 2010; 8:19.
 70. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1992; 19:1550-8.
 71. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015; 28:1-39.
 72. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol*. 1986; 57:450-8.
 73. Delaneau O, Marchini J, 1000 Genomes Project Consortium, 1000 Genomes Project Consortium. Integrating sequence and array data to create an improved 1000 Genomes Project haplotype reference panel. *Nat Commun*. 2014; 5:3934.
 74. Howie B, Fuchsberger C, Stephens M, Marchini J, Abecasis GR. Fast and accurate genotype imputation in genome-wide association studies through pre-phasing. *Nat Genet*. 2012; 44:955-9.

75. Porcu E, Sanna S, Fuchsberger C, Fritsche LG. Genotype imputation in genome-wide association studies. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013; Chapter 1:Unit 1.25.
76. Chen WM, Abecasis GR. Family-based association tests for genomewide association scans. *Am J Hum Genet* 2007;81:913-926.
77. De Jager PL, Chibnik LB, Cui J, Reischl J, Lehr S, Simon KC, Aubin C, Bauer D, Heubach JF, Sandbrink R, Tyblova M, Lelkova P; Steering committee of the BENEFIT study; Steering committee of the BEYOND study; Steering committee of the LTF study; Steering committee of the CCR1 study, Havrdova E, Pohl C, Horakova D, Ascherio A, Hafler DA, Karlson EW. Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. *Lancet Neurol* 2009;8:1111-1119.
78. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* 2010;26:2069-2070. <http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html> (02.02.2015).
79. Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A, Reuter I, Chekmenev D, Krull M, Hornischer K, Voss N, Stegmaier P, Lewicki-Potapov B, Saxel H, Kel AE, Wingender E. TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D108-110. <http://www.biobase-international.com/product/transcription-factor-binding-sites> (30.01.2015).
80. Karolchik D, Hinrichs AS, Furey TS, Roskin KM, Sugnet CW, Haussler D, Kent WJ. The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res* 2004;32:D493-496. <https://genome.ucsc.edu> (02.02.2015)
81. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1767-1775.
82. Gosse P, Dallochio M. Left ventricular hypertrophy: epidemiological prognosis and associated critical factors. *Eur Heart J* 1993;Suppl D:16-21.

83. Devereux RB, Koren MJ, de Simone G, Okin PM, Kligfield P. Methods for detection of left ventricular hypertrophy: application to hypertensive heart disease. *Eur Heart J* 1993;Suppl D:8-15.
84. Shi J, Zhang YW, Yang Y, Zhang L, Wei L. ROCK1 plays an essential role in the transition from cardiac hypertrophy to failure in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:819-828.
85. 1 McMullen JR, Izumo S. Role of the insulin-like growth factor 1 (IGF1)/phosphoinositide-3-kinase (PI3K) pathway mediating physiological cardiac hypertrophy. *Novartis Found Symp* 2006;274:90-111.
86. 1 Itoh N, Ohta H. Pathophysiological roles of FGF signaling in the heart. *Front Physiol* 2013;4:247.
87. 1 Bian Z, Dai J, Hiroyasu N, Guan H, Yuan Y, Gan L, Zhou H, Zong J, Zhang Y, Li F, Yan L, Shen D, Li H, Tang Q. Disruption of tumor necrosis factor receptor associated factor 5 exacerbates pressure overload cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Cell Biochem* 2014;115:349-358.
88. 1 Della-Morte D, Beecham A, Rundek T, Wang L, McClendon MS, Slifer S, Blanton SH, Di Tullio MR, Sacco RL. A follow-up study for left ventricular mass on chromosome 12p11 identifies potential candidate genes. *BMC Med Genet* 2011;12:100.
89. 1 Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:2351-2355.

4 Appendice

Figure S1. Principal components plot.

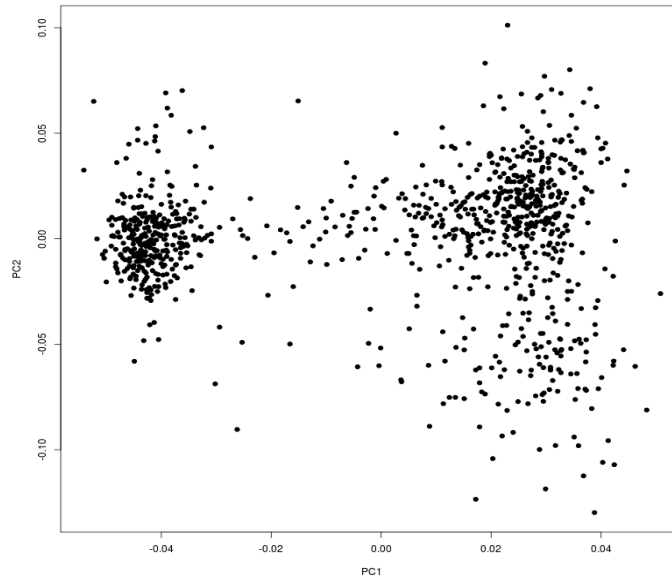
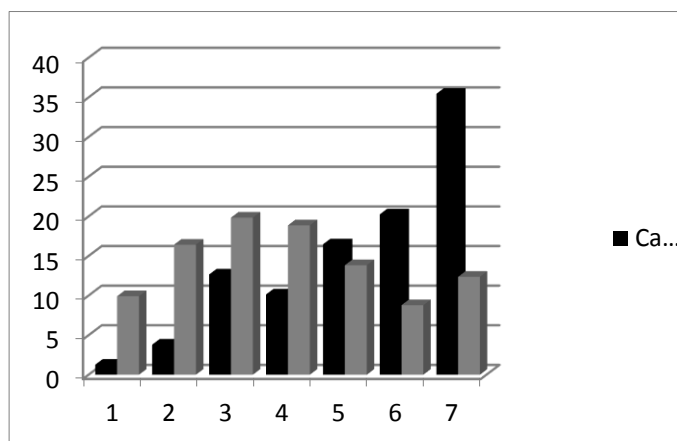


Figure S2: Distribution of percentage of controls (in grey) and cases (in black) in each risk category defined by the weighted genetic risk score.



The frequency is calculated according to the total number of individuals for each status.

Figure S3. Quantile-quantile plot of single nucleotide polymorphism p-values from genome wide association analysis with left ventricular mass.

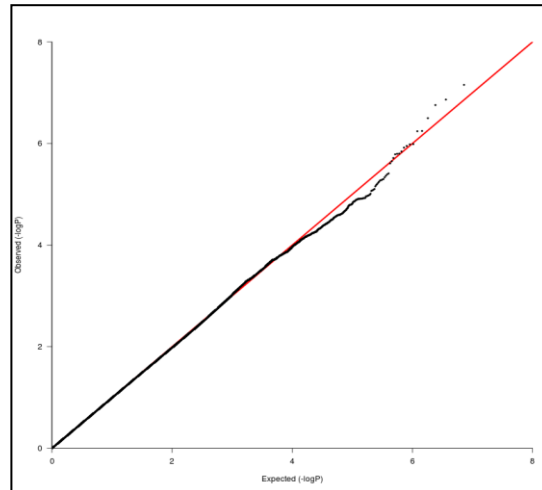
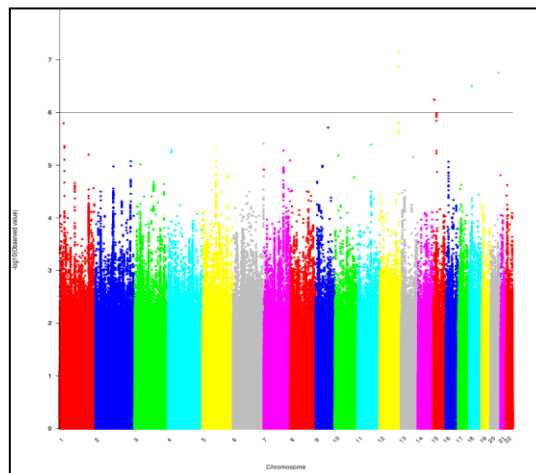
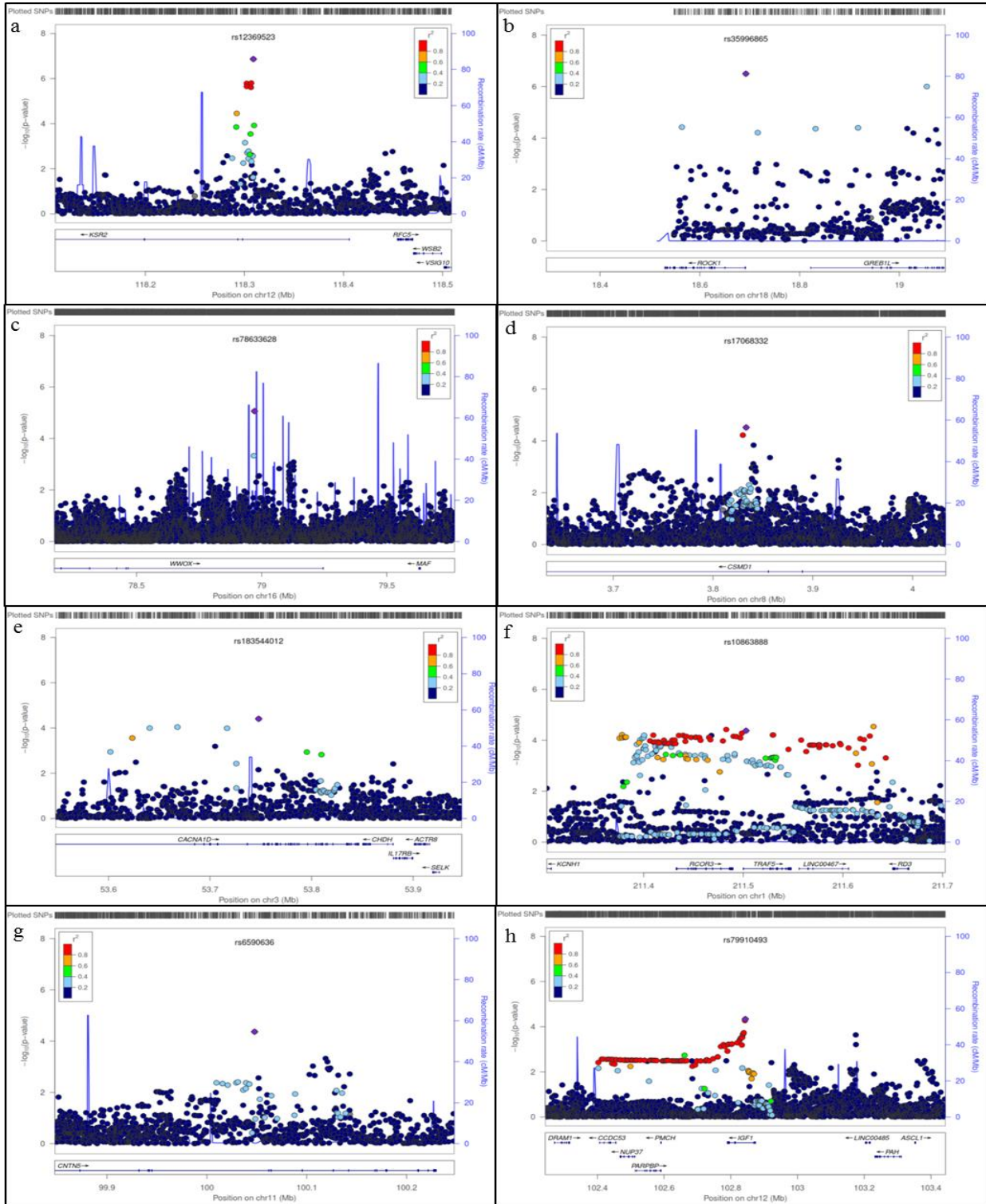


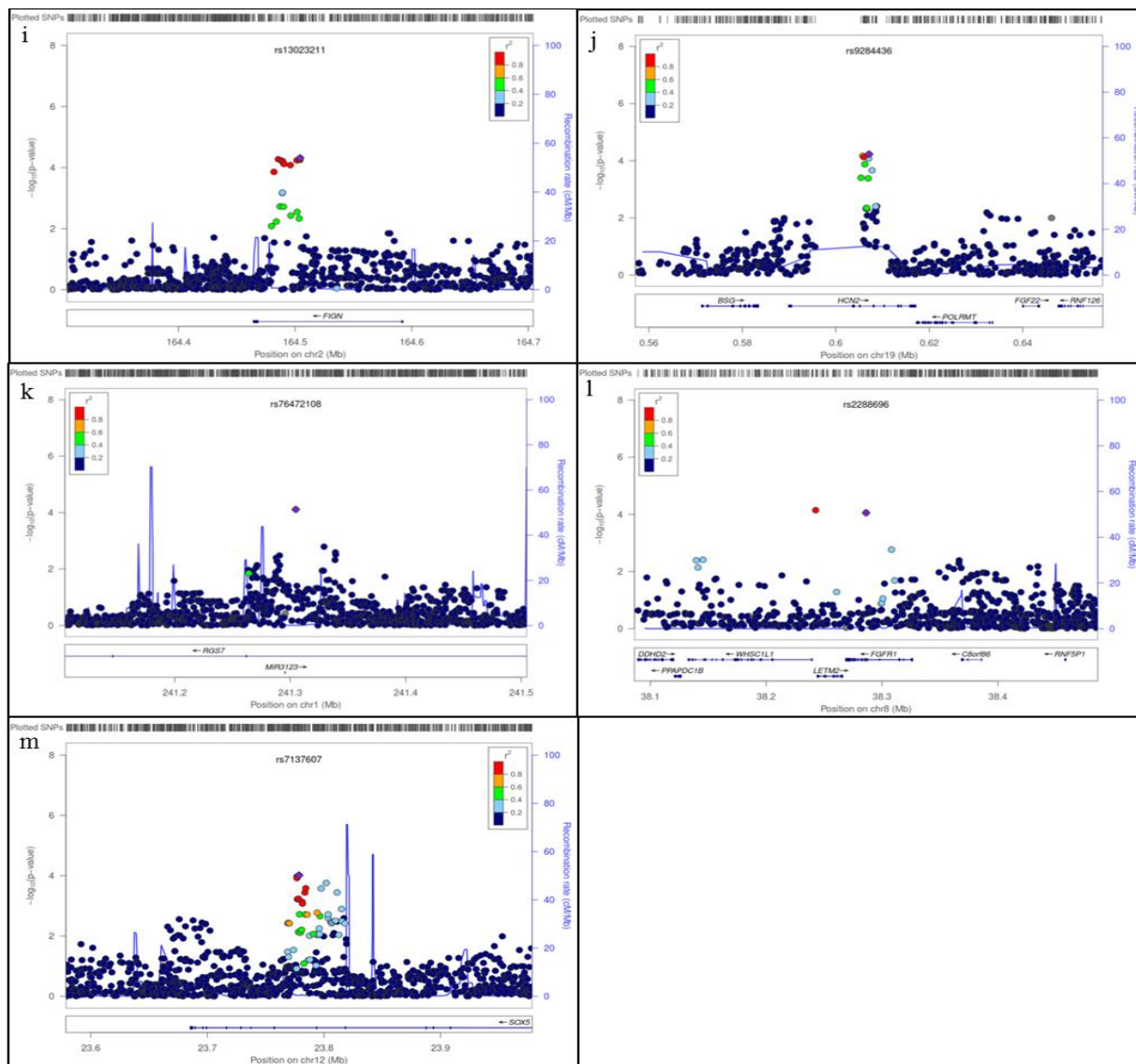
Figure S4. Manhattan plot of single SNP linear regression test statistics for LVMh^{2.7}.



Regression analysis adjusted for ancestry principal components, sex, systolic and diastolic blood pressure, serum creatinine, 24-hour urinary sodium, plasma renin activity, body mass index, heart rate, and echocardiography operator. Results are reported as $-\log_{10}(P \text{ value})$ by genomic position.

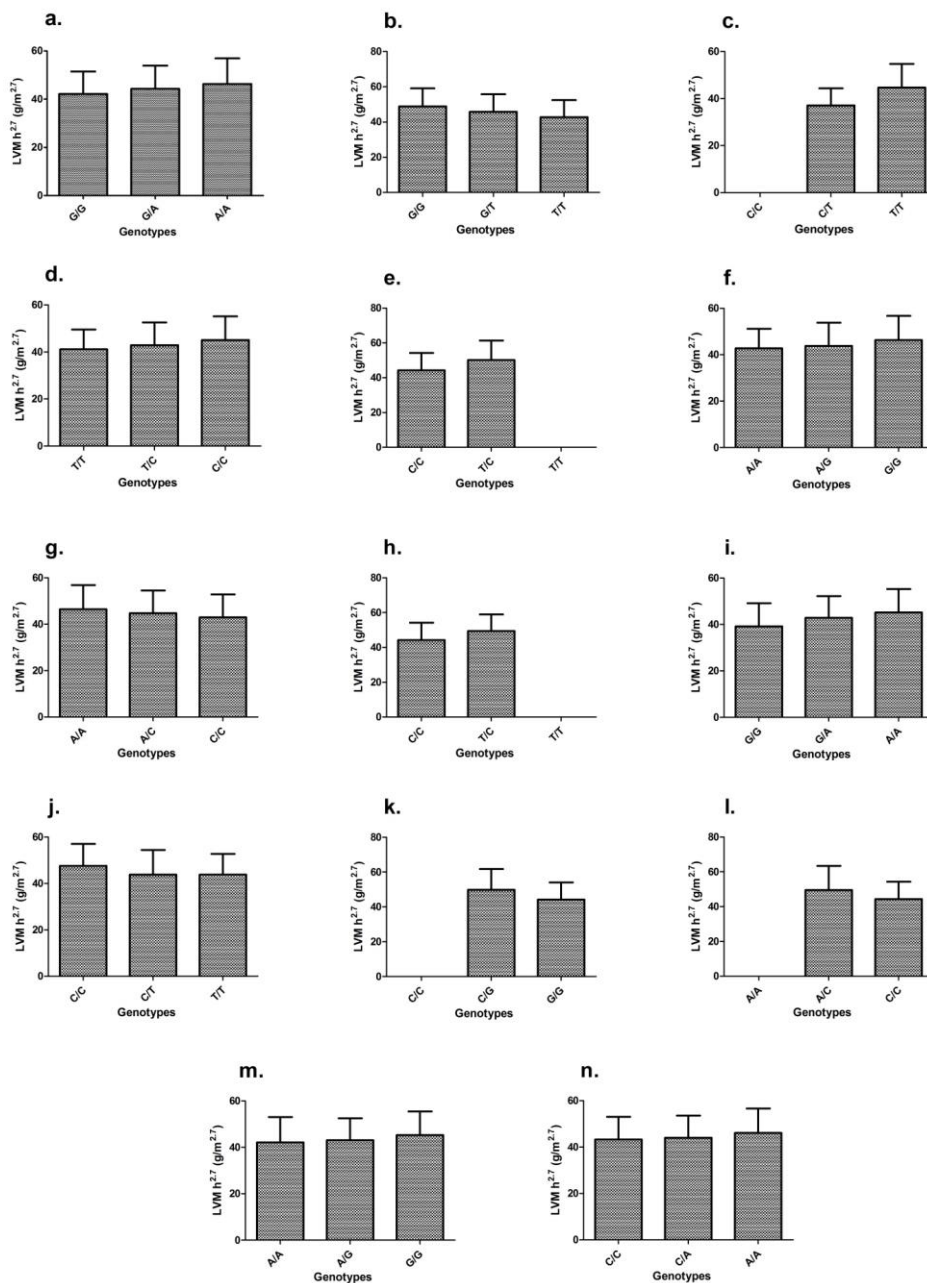
Figure S5: Local Manhattan plot for KSR2 (a), ROCK1 (b), WWOX (c), CSMD1 (d), CACNA1D (e), TRAF5 (f), CNTN5 (g), IGF1 (h), FIGN (i), HCN2 (j), RGS7 (k), FGFR1 (l), and SOX5 (m) genes.





Each circle represents a single nucleotide polymorphism; y-axis is the $-\log_{10}$ LVM association p-value, and x-axis represents the physical position on the chromosome (build 37, hg 19). The circles are filled with colors according to the linkage disequilibrium (LD, r^2) between the given SNPs and the lead SNP (purple square).

Figure S6: Plot of LVM average by KSR2 rs12369523 (a), ROCK1 rs35996865 (b), WWOX rs78633628 (c), CSMD1 rs17068332 (d), CACNA1D rs183544012 (e), TRAF5 rs10863888 (f), CNTN5 rs6590636 (g), IGF1 rs79910493 (h), FIGN rs13023211 (i), HCN2 rs9284436 (j), RGS7 rs76472108 (k), CSMD1 rs76156580 (l), FGFR1 rs2288696 (m), and SOX5 rs7137607 (n) genotypes of participants.



In each box the number of subjects for each genotype is indicated.

Table A1: Clinical research centers that recruited patients for the study.

Recruitment center	Number of subjects
Department of Medicine and Hypertension Centre University of Catania	31
Department of Clinic and Experimental Medicine, Cardiovascular Disease Unit, University of Catanzaro 'Magna Graecia'	41
Division of Internal Medicine, ASL Isernia	46
Department of Internal Medicine and Public Health, University of L'Aquila	44
Department of Internal Medicine, University Federico II, Napoli	29
Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padova	31
Department of Clinical And Experimental Medicine, University of Padova	11
Department of Internal Medicine, University of Pisa	23
Division of Internal Medicine, ASL Reggio Emilia	8
Division of Internal Medicine and Hypertension Center, S.Giovanni Battista e della Città di Torino Hospital, University of Torino	26
Joint ASL n.1, AOU Sassari	676

Table S2: SNPs that compose the weighted genetic risk score and weights assigned to each marker.

SNP	Allele	Gene	Weight (beta)	% of total weight
rs12369523	A	KSR2	2.25	10.06
rs35996865	G	ROCK1	2.33	10.42
rs183544012	T	CACNA1D	6.46	28.89
rs10863888	G	TRAF5	1.71	7.6
rs79910493	T	IGF1	5.94	26.57
rs2288696	G	FGFR1	2.06	9.21
rs7137607	A	SOX5	1.61	7.20

Glossary: SNP, single nucleotide polymorphism; Chr, chromosome.

$$GRS = \sum_{i=1}^7 w_i \times X_i$$

Where i is the SNP, w_i = weight for SNP i , and X_i = number of risk alleles (0, 1 or 2).

Table S3: Association results for LVMh^{2.7} in the linear regression analysis.

SNP	Chr	Position (bp)	risk allele	other allele	risk allele freq	beta	SE	p-value	gene	location
rs12369523	12	118309008	A	G	0.57	2.25	0.43	1.37E-07	KSR2	intron
rs35996865	18	18692344	G	T	0.30	2.33	0.46	3.17E-07	ROCK1	upstream
rs4966230	15	28969573	G	A	0.96	7.79	1.56	5.66E-07	WHAMMP2	intron
rs114443041	1	24281021	A	G	0.46	1.86	0.39	1.60E-06	CNR2	intron
rs2486612	9	99730155	G	A	0.96	6.99	1.47	1.93E-06	HIATL2	intron
rs7302899	12	118302322	A	G	0.55	1.95	0.41	2.24E-06	KSR2	intron
rs7933179	11	85419919	T	C	0.03	5.94	1.29	4.05E-06	SYTL2	intron
rs1501127	4	16554662	C	T	0.19	2.38	0.52	5.14E-06	LDB2	intron
rs56096309	10	17877539	C	A	0.80	2.65	0.59	6.56E-06	MRC1	intron
rs78633628	16	78971380	T	C	0.99	10.95	2.46	8.66E-06	WVOX	intron
rs17665445	3	29347554	G	A	0.12	2.99	0.68	9.70E-06	RBMS3	intron
rs10970978	9	32442256	G	A	0.12	2.93	0.67	1.02E-05	ACO1	intron
rs115299983	21	15199811	A	G	0.31	1.95	0.45	1.55E-05	CNN2P7	nc transcript
rs153458	5	150607972	A	C	0.11	3.01	0.70	1.59E-05	CCDC69	upstream
rs55803951	9	7134281	T	C	0.23	2.22	0.52	2.07E-05	KDM4C	intron
rs76400391	3	111915627	T	C	0.93	3.58	0.84	2.09E-05	SLC9C1	intron
rs682856	3	174415647	T	C	0.54	1.76	0.42	2.29E-05	NAALADL2	intron
rs9867121	3	114631548	C	A	0.82	2.38	0.57	2.46E-05	ZBTB20	intron
rs73853324	3	111887788	A	G	0.93	3.59	0.85	2.54E-05	SLC9C1	exon (missense)
rs74840030	3	111901099	T	C	0.94	3.63	0.86	2.63E-05	SLC9C1	exon (missense)

SNP	Chr	Position (bp)	risk allele	other allele	risk allele freq	beta	SE	p-value	gene	location
rs6946807	7	146608784	A	G	0.36	1.88	0.45	2.83E-05	CNTNAP2	intron
rs17252060	5	53321543	A	G	0.97	5.85	1.40	2.89E-05	ARL15	intron
rs17068332	8	3833181	C	T	0.88	2.63	0.63	3.05E-05	CSMD1	intron
rs182304522	11	85216321	A	G	0.03	5.39	1.29	3.14E-05	RNU6-1292P	upstream
rs10167952	2	29809505	C	G	0.88	2.80	0.67	3.17E-05	ALK	intron
rs183544012	3	53747902	T	C	0.02	6.46	1.57	3.93E-05	CACNA1D	intron
rs72766128	9	115417463	T	C	0.02	6.71	1.64	4.14E-05	KIAA1958	intron
rs74870432	11	84932409	C	T	0.03	5.36	1.31	4.14E-05	DLG2	intron
rs10863888	1	211502769	G	A	0.59	1.71	0.42	4.23E-05	TRAF5	intron
rs291785	18	19015831	C	T	0.62	1.77	0.43	4.26E-05	GREB1L	intron
rs1198591	1	98541836	C	G	0.19	2.23	0.55	4.27E-05	NFU1P2	upstream
rs6590636	11	100047729	A	C	0.45	1.71	0.42	4.30E-05	CNTN5	intron
rs13023211	2	164504320	A	G	0.86	2.55	0.63	4.85E-05	FIGN	intron
rs73226977	3	139928004	T	G	0.09	3.04	0.75	5.09E-05	CLSTN2	intron
rs9442871	6	73648263	C	T	0.84	2.38	0.59	5.21E-05	KCNQ5	intron
rs7959200	12	9330417	C	A	0.77	2.04	0.51	5.46E-05	PZP	intron
rs1599951	3	28359788	G	A	0.14	2.50	0.62	5.48E-05	CMC1	intron
rs111739640	1	242430997	T	C	0.94	4.41	1.09	5.49E-05	PLD5	intron
rs153452	5	150612619	G	A	0.11	2.75	0.68	5.65E-05	GM2A	intron
rs9544846	13	79121654	G	A	0.10	2.83	0.70	5.67E-05	RNF219-AS1	intron
rs62571027	9	15515899	A	G	0.06	3.59	0.89	5.70E-05	PSIP1	upstream
rs9620166	22	23076572	C	T	0.97	6.4	1.59	5.79E-05	IGLV3-17	upstream

Antonio Sircana, Varianti genetiche associate con la massa ventricolare sinistra in pazienti con ipertensione essenziale mai trattata, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche indirizzo Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

SNP	Chr	Position (bp)	risk allele	other allele	risk allele freq	beta	SE	p-value	gene	location
rs34077724	16	81739784	T	G	0.05	3.87	0.96	5.81E-05	CMIP	intron
rs9284436	19	607108	C	T	0.43	1.75	0.44	5.89E-05	HCN2	intron
rs148974495	7	1577796	A	G	0.02	6.32	1.58	6.06E-05	TMEM184A	downstream
rs7856710	9	15521362	A	G	0.06	3.57	0.89	6.19E-05	RN7SL98P	downstream
rs12403576	1	211439571	G	A	0.59	1.67	0.42	6.42E-05	RCOR3	intron
rs4731960	7	133206438	A	G	0.72	1.97	0.49	6.45E-05	EXOC4	intron
rs114996389	3	99379688	G	T	0.97	5.16	1.30	7.02E-05	COL8A1	intron
rs35422477	8	38242712	A	G	0.81	2.08	0.52	7.14E-05	WHSC1L1	upstream
rs6887266	5	13837218	A	G	0.62	1.77	0.45	7.45E-05	DNAH5	intron
rs77732888	15	49088198	G	A	0.84	2.31	0.58	7.67E-05	CEP152	intron
rs76472108	1	241304791	C	G	0.02	6.07	1.54	7.71E-05	RGS7	intron
rs7642531	3	23842814	C	A	0.24	2.05	0.52	7.71E-05	UBE2E1-AS1	downstream
rs76156580	8	4474130	A	C	0.01	8.53	2.16	7.98E-05	CSMD1	intron
rs59688356	14	58224134	C	T	0.94	3.43	0.87	8.00E-05	SLC35F4	intron
rs7894754	10	73074310	T	C	0.19	2.09	0.53	8.01E-05	SLC29A3	upstream
rs10437924	12	52951208	A	G	0.37	1.70	0.43	8.01E-05	KRT71	upstream
rs9646862	2	220233328	T	C	0.45	1.65	0.42	8.02E-05	DNPEP	downstream
rs6007872	22	48897704	G	A	0.87	2.50	0.63	8.14E-05	FAM19A5	intron
rs12198266	6	83743782	C	T	0.45	1.66	0.42	8.28E-05	UBE3D	intron
rs3825448	13	25145058	T	C	0.25	1.93	0.49	8.42E-05	PSPC1P2	downstream
rs17487808	4	166024258	G	A	0.02	5.51	1.40	8.44E-05	TMEM192	intron

Antonio Sircana, Varianti genetiche associate con la massa ventricolare sinistra in pazienti con ipertensione essenziale mai trattata, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche indirizzo Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

SNP	Chr	Position (bp)	risk allele	other allele	risk allele freq	beta	SE	p-value	gene	location
rs148372781	3	124555852	A	G	0.01	8.64	2.20	8.50E-05	ITGB5	intron
rs7504272	18	19172917	T	C	0.61	1.76	0.45	8.58E-05	ESCO1	downstream
rs56202747	11	89700849	G	A	0.69	1.78	0.45	8.68E-05	TRIM64	upstream
rs3002258	1	211617397	G	T	0.58	1.64	0.42	8.73E-05	ARPC3P2	downstream
rs2288696	8	38286225	G	A	0.81	2.06	0.53	8.79E-05	FGFR1	intron
rs35910954	15	92581551	T	A	0.21	2.06	0.53	8.88E-05	SLCO3A1	intron
rs7207593	17	66037405	C	T	0.99	13.80	3.52	8.94E-05	KPNA2	intron
rs5930	19	11224265	G	A	0.58	1.63	0.42	9.08E-05	LDLR	downstream
rs116435336	2	238563732	T	C	0.05	3.66	0.94	9.15E-05	LRRFIP1	intron
rs2993503	1	3028987	A	G	0.50	1.67	0.43	9.30E-05	PRDM16	intron
rs10166469	2	29829167	T	C	0.24	1.94	0.50	9.49E-05	ALK	intron
rs7137607	12	23778584	A	C	0.55	1.61	0.41	9.63E-05	SOX5	intron
rs150455300	4	79007274	T	C	0.02	7.47	1.92	9.69E-05	FRAS1	intron
rs113551213	12	12513870	A	G	0.08	3.31	0.85	9.70E-05	LOH12CR1	intron
rs6579841	5	150622225	A	G	0.58	1.63	0.42	9.70E-05	GM2A	intron
rs1790650	16	57511069	A	G	0.38	1.71	0.44	9.76E-05	DOK4	intron
rs55704326	3	28534629	T	A	0.14	2.69	0.69	9.77E-05	ZCWPW2	intron
rs6700747	1	211431105	C	A	0.56	1.60	0.41	9.79E-05	RCOR3	upstream
rs1149050	1	31200342	G	A	0.22	2.11	0.54	9.81E-05	MATN1-AS1	downstream
rs784369	1	211558096	G	A	0.59	1.62	0.42	9.91E-05	LINC00467	intron

The results are ranked by p-value. LVMh^{2.7} association was evaluated using a linear regression analysis under an additive model, adjusting for ancestry principal components, sex, systolic and diastolic blood pressure, serum creatinine, 24-hour urinary sodium, plasma renin activity, body mass index, heart rate, and echocardiography operator. To retrieve information about SNPs and their genomic context (the nearest gene) we used the hg19 assembly (National Center for Biotechnology Information 37). Glossary: SNP, single nucleotide polymorphism; chr, chromosome; bp, base pair; SE, standard error.

Table S4: The loci of interest found in our study and their functional role in experimental setting.

Lead SNPs	Locus gene	Gene description (official gene name is reported in <i>Italic</i>)
rs35996865	ROCK1	<i>Rho-Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i> . Downstream mediator of RhoA playing a role in stress fiber formation, smooth muscle contraction, cell adhesion, membrane ruffling, cell motility, and apoptosis. Might have an <i>in vivo</i> role in the pathogenesis of cardiac hypertrophy and remodeling. ⁱ ROCK1 deficiency improves survival, inhibits cardiomyocytes apoptosis, and preserved LV dimension and function in mice. ⁱⁱ An effect of long-term inhibition of Rho-kinase has been demonstrated beneficial in animal models for the treatment of various cardiovascular diseases. ⁱⁱⁱ
rs79910493	IGF1	<i>Insulin-Like Growth Factor</i> . Neurohumoral factor that mediates cardiac growth and physiological hypertrophy. ^{iv,v} It induces cardiac hypertrophy by causing alteration in the potassium channels responsible for the generation of action potential repolarization. ^{vi}
rs183544012	CACNA1D	<i>Calcium Channel Voltage-Dependent L Type Alpha 1D Subunit</i> . Channel that mediates the entry of calcium ions into excitable cells and is involved in a variety of calcium-dependent processes, including cardiac and vascular smooth muscle contraction. It takes part into MAPK signaling pathway, and has a role in hypertrophic cardiomyopathy, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, and dilated cardiomyopathy.
rs2288696	FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i> . Receptor of fibroblast growth factors (FGFs), secreted proteins with diverse functions mainly in development and metabolism. Some FGFs, such as FGF2, FGF16, FGF21, and FGF23 have been shown to have pathophysiological roles in heart as cardiomyokines, and their biological effects in the myocardium are mediated by FGFR1, the major FGF receptor in the heart. ^{vii}
rs10863888	TRAF5	<i>TNF Receptor-Associated Factor 5</i> . Signal transducer of the tumor necrosis factor receptor family. TRAF5 deficiency induces cardiac hypertrophy, cardiac dysfunction, and fibrosis in response to pressure overload, thus TRAF5 plays a crucial role in the development of cardiac hypertrophy through the negative regulation of the MEK-ERK1/2 pathway. ^{viii}
rs7137607	SOX5	<i>SRY sex determining region Y-box 5</i> . Transcription factor involved in the regulation of embryonic development and in the determination of the cell fate. In addition, SOX5 plays a pivotal role in the expression of the muscle L-type Ca ²⁺ channel and variation in the expression of these channels is associated with cardiac hypertrophy. ^{ix}
rs12369523	KSR2	<i>Kinase Suppressor of Ras 2</i> . Essential scaffolding protein that coordinates the activation of Ras-Raf-MEK-ERK cascade in response to calcium signals. ^x Several studies provide strong evidence for an

Lead SNPs	Locus gene	Gene description (official gene name is reported in <i>Italic</i>)
		important role of the Ras-Raf-MEK-ERK cascade in the heart: a protective anti-apoptotic function as well as a hypertrophic function. ^{xi} Mutations in KSR2 have been associated with obesity, insulin resistance, and impaired cellular fuel oxidation. ^{xii}
rs78633628	WWOX	<i>WW Domain Containing Oxidoreductase</i> . Member of the short-chain dehydrogenases/reductases protein family. It has been associated to LV wall thickness, an echocardiographic trait that predicts cardiovascular disease events, ^{xiii} and has been also identified as hypertension susceptibility genes in Han Chinese. ^{xiv}
rs76472108	RGS7	<i>Regulator Of G-Protein Signaling 7</i> . Member of G-protein signaling regulator family that fine-tunes G protein-coupled receptor-induced signaling. Changes in the RGS protein expression and/or function in the heart often lead to pathophysiological changes and are associated with cardiac disease in animals and humans, including hypertrophy, fibrosis development, heart failure, and arrhythmias. ^{xv}
rs17068332 rs76156580	CSMD1	<i>CUB and Sushi multiple domains protein 1</i> . Transmembrane protein belonging to the vacuolar-protein-sorting-13 family. CSMD1 gene was associated with peripheral arterial disease and metabolic syndrome. ^{xvi,xvii} Moreover CSMD1 gene was associated with increased risk of hypertension in two case-control studies in Korean cohorts ^{xviii} .
rs6590636	CNTN5	<i>Contactin 5</i> . Member of the immunoglobulin superfamily, which mediates cell surface interactions during nervous system development and has been associated with atrial fibrillation and heart failure. ^{xix}
rs13023211	FIGN	<i>Fidgetin</i> . Member of a family of ATPases associated with diverse cellular activities. Variants at this locus have been associated with blood pressure regulation and with pulse pressure and mean arterial pressure ^{xx,xxi}
rs9284436	HCN2	<i>Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide-Gated Potassium Channel 2</i> . Voltage-gated potassium channel that contributes to spontaneous rhythmic activity in both heart and brain. HCN2 and HCN4 are the predominant HCN transcripts in ventricular cells under basal conditions. Several studies showed an increase in the mRNA levels of these two genes following the induction of hypertrophy, but other studies are in contrast with these results. ^{xxii}

