

**FATTORI DI RISCHIO**

# I MARCATORI PROTEOMICI PLASMATICI OLTRE GLI ALGORITMI PER LA STIMA DEL RISCHIO CARDIOVASCOLARE: EVIDENZE E PROSPETTIVE

## Plasma proteomics beyond the algorithms to estimate the cardiovascular risk: Evidence and perspectives

**ANDREA BARAGETTI<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti", Università degli Studi di Milano, Milano;<sup>2</sup>IRCCS Multimedica, Milano**SUMMARY**

The accuracy and the sensitivity of the common methods used to predict the risk of developing cardiovascular and cerebrovascular events is still far from being optimal, due to criticism of applying the common clinical algorithms and risk charts on the subjects that, being exposed to a low number of risk factors, are generally considered "apparently healthy" and not deserving immediate preventive attention. Notwithstanding, epidemiological data indicate that a non-negligible proportion of these "apparently healthy" subjects yet display preclinical atherosclerotic lesions in multiple vascular districts and the common vascular imaging tools, which are underused in the most of them in clinical practice, cannot fully capture this evidence.

It becomes compelling the necessity to introduce novel diagnostic and prognostic weapons to overcome all these current shortcomings. Among the possibilities that have been explored so far, the analysis of an array of multiple proteins ("proteomics") in plasma appears the most sensitive, the most accurate, the most feasible to study the risk in multiple large populations, and the most affordable in terms of cost, as compared to the other "omics".

Furthermore, the advent of potent instruments to analyze a large quantity of data (artificial intelligence) can coordinate the information deriving from proteomics and that deriving from imaging ("radiomics"), upon the final perspective to generate ad hoc panels of markers that can be adapted for the identification of these same "apparently healthy" individuals and making the preventive approach more and more timely and effective.

**Key words:** *Cardiovascular risk, Proteomics, biomarkers, artificial intelligence, vascular imaging.*

Il concetto di medicina personalizzata prevede l'utilizzo di sempre più precisi strumenti per l'identificazione precoce di soggetti che sono a maggior suscettibilità di incorrere in un evento clinico avverso. Questa strategia è di ancor più interesse per la prevenzione delle malattie cardiovascolari e cerebrovascolari, che continuano a rappresentare oggi una delle principali cause di mortalità e morbilità nel mondo (1).

Il continuo aumento nell'incidenza di queste patologie è dovuto al fatto che, malgrado il meccanismo alla base di queste patologie, l'aterosclerosi, sia ben noto e ben studiato, la possibilità di identificare soggetti che, all'interno di ampie popolazioni, sono a più alto rischio rimane ad oggi ancora lontano dall'essere ottimale per una serie di motivazioni.

I comuni algoritmi tutt'oggi utilizzati nella pratica clinica per la stadiazione del rischio cardiovascolare (per esempio lo score della American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) oppure l'algoritmo SCORE europeo) forniscono delle stime sul rischio medio a dieci anni per alcuni "strati" della popolazione, e sono ancora ben lontani dal fornire una stima precisa, per ogni individuo, sul suo reale rischio di sviluppare un evento cardio- o cerebrovascolare, più o meno fatale, in un tempo più lungo. Questa mancata precisione compromette le *chances* di iniziare tempestivamente approcci terapeutici che permettano di raggiungere i goals proposti delle Linee Guida. A riguar-

do, è sufficiente considerare che studi di registro hanno evidenziato come meno della metà di pazienti che subiscono un evento cardiovascolare vengono opportunamente trattati con una terapia ipolipemizzante e/o antipertensiva nel tempo antecedente all'insorgenza dell'evento (2-4).

È altresì da sottolineare che recenti studi epidemiologici hanno chiaramente mostrato come il danno aterosclerotico preclinico sia già presente in più distretti vascolari anche in soggetti che non sono esposti a un numero significativo di fattori di rischio (5, 6); Ne deriva che questi stessi algoritmi, da soli, non siano in grado di catturare questa preziosa informazione proprio in questi soggetti, "apparentemente sani", senza avvalersi di opportune indagini di *imaging* vascolare.

In aggiunta a queste criticità, la valutazione vascolare rimane ad oggi ancora problematica nella pratica clinica per una serie di motivazioni. Innanzitutto, le tecniche di diagnostica vascolare, non soltanto quelle più complesse che permettono una quantificazione infiammatoria vasculotropica (ad esempio la risonanza magnetica oppure la tomografia a emissione di positroni) ma anche quelle strutturali più comuni (come, per esempio, la tomografia assiale oppure la ultrasonografia), non sono sempre disponibili. Inoltre, va anche ricordato che, anche quando queste metodiche sono disponibili, vi è sempre un considerevole livello di variabilità inter-operatore, il che rende difficoltosa la comparazione dei dati derivanti da queste analisi, non soltanto nella pratica clinica ma nella formulazione di studi epidemiologici multi-centro. Da ultimo, rimane da ricordare che queste stesse metodiche, *in primis* la più comune indagine attraverso ultrasonografia dei tronchi sopraortici, non vengono applicate regolarmente proprio su quei soggetti "apparentemente sani", non permettendo di su-

#### *Indirizzo per la corrispondenza*

Andrea Baragetti, PhD  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche  
e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti"  
Università degli Studi di Milano  
Via Balzaretto, 9 - 20133 Milano  
E-mail: andrea.baragetti@unimi.it

perare le sopracitate barriere degli algoritmi clinici.

Linee guida dedicate per l'utilizzo della diagnostica vascolare carotidea sono state proposte da società internazionali, includendo l'analisi di parametri vascolari che riflettano l'entità, il grado e la stabilità della lesione ateromastica; queste includono, per esempio, la misurazione dell'area di placca e l'ecolucescenza, ovvero il numero di pixels che compongono l'immagine ultrasonografica assemblata dagli strumenti di ecografia, e che è compreso tra 0 (totalmente nero) a 255 (totalmente bianco). Software sempre più specializzati sono inclusi nelle macchine ultrasonografiche oggi in commercio e sono utilizzati nella indagine vascolare carotidea, sfruttando algoritmi di intelligenza artificiale (A.I.) al fine di aumentare la qualità dell'immagine e di includere le informazioni vascolari sopra citate che, ancillari all'immagine, informino sullo stato di avanzamento del fenomeno aterosclerotico ("radiomica" (7)). Inoltre, altrettanti software sono stati oggi sviluppati per integrare le informazioni precedentemente acquisite dall'operatore in precedenti analisi, utilizzandole successivamente per aumentare le possibilità di identificare caratteristiche vascolari (come, per esempio, le ateromasie più precoci) che altresì non verrebbero identificate dall'operatore stesso (concetto di "deep learning") (6).

Tutte queste possibilità tecnologiche sono solo recentemente proposte e non ancora dettagliatamente sfruttate su più ampia scala al fine di testare il loro contributo per l'identificazione di soggetti a più alto rischio cardio- e cerebrovascolare nella popolazione.

Emerge, pertanto, sempre più urgente la necessità di trovare delle nuove strategie di predizione del rischio, che includano delle metodiche sensibili, riproducibili, alla

portata della pratica clinica per un utilizzo su ampie popolazioni, e che permettano di superare le attuali problematiche diagnostiche. Tra le strategie possibili, la quantificazione di nuovi biomarcatori può essere ragionevole ma, considerando la complessa multifattorialità del fenomeno aterosclerosi, questa non può essere perseguita con una ricerca basata su una ipotesi, a priori, di uno o pochi meccanismi. Per contro, è necessario un approccio "unbiased" che includa, in maniera "olistica", un più ampio spettro di biomarcatori misurati simultaneamente su una stessa matrice e con un elevato grado di sensibilità (8). Con questa prospettiva, la proteomica sul plasma rappresenta il candidato migliore per rispondere, in maniera positiva, a tutte le necessità appena citate.

L'analisi di più proteine circolanti ha infatti recentemente dimostrato un significativo potere predittivo di eventi cardio- e cerebrovascolari incidenti, di gran lunga superiore rispetto ai comuni algoritmi di stima e ai singoli fattori di rischio classici. In particolare, utilizzando la tecnologia Proximity Extension Assay (PEA), che sfrutta reazioni mediate da anticorpi e oligonucleotidi per quantificare simultaneamente 368 proteine e per raggiungere anche quelle con concentrazioni comprese tra i nanogrammi e i picogrammi per millilitro (9), sono state recentemente identificate cinquanta proteine (attraverso analisi di A.I.) che, con maggiore sensibilità rispetto agli algoritmi clinici (SCORE e Framingham) identificavano soggetti "apparentemente sani" alla visita basale, ma che erano esposti a un maggiore rischio di sviluppare eventi cardiovascolari in un follow-up ventennale (10).

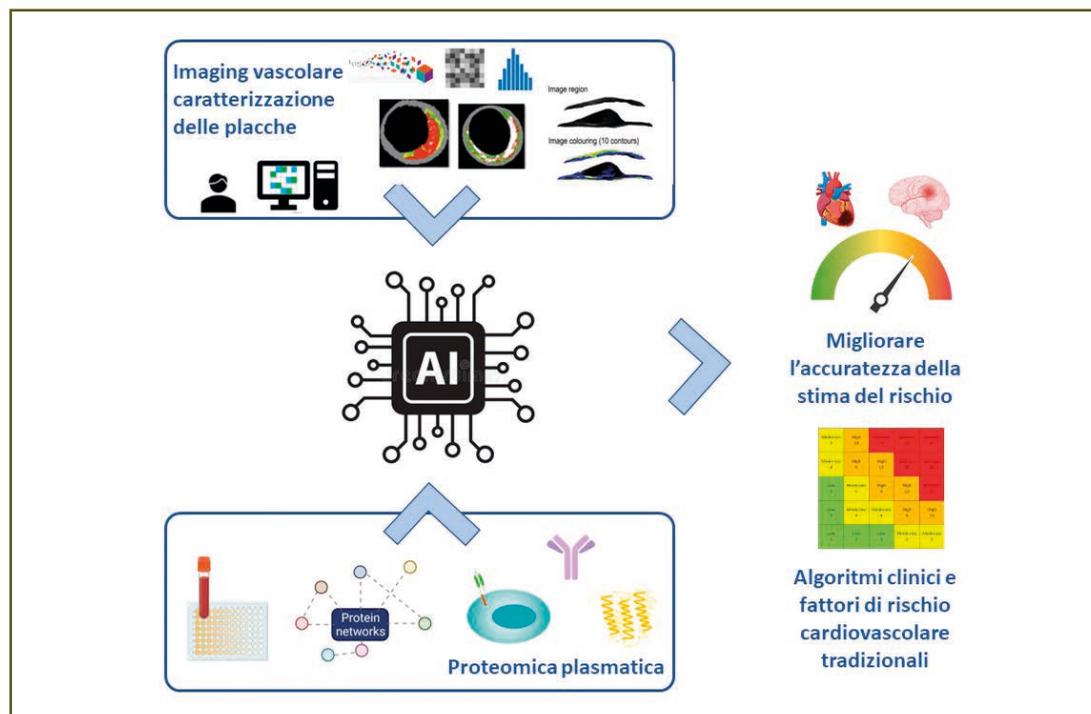
In uno studio successivo condotto su altrettanti soggetti "apparentemente sani", ma che non presentavano ateromasie pre-cliniche carotidee documentate da indagi-

ni diagnostiche ultrasonografiche, erano state identificate sette proteine di natura infiammatoria, che predicavano l'insorgenza di ateromasie carotidee pre-cliniche, valutate tramite ultrasonografia dopo un follow-up decennale, con maggiore sensibilità rispetto agli algoritmi clinici e ai fattori di rischio (abitudine al fumo, sovrappeso/obesità, ipertensione, elevati livelli di trigliceridi a digiuno e bassi livelli di colesterolo nelle lipoproteine a alta densità "HDL") (11). Nello stesso studio è inoltre utile sottolineare che altre tre proteine, indipendenti dalle precedenti sette, predicavano la progressione dello spessore medio-intimale carotideo (fattore che più dipende, rispetto alla placca focale, di fattori emoreologici) nel gruppo di soggetti che non ave-

vano sviluppato placca carotidea, suggerendo che specifici marcatori plasmatici possono informare sulla progressiva evoluzione del fenomeno aterosclerotico.

Quale è il messaggio finale suggerito da queste evidenze?

La proteomica plasmatica ha il potenziale di ridisegnare la "roadmap" per una più accurata definizione del rischio cardio- e cerebrovascolare individuale rispetto agli attuali approcci che partono dalla valutazione dei singoli fattori di rischio clinici. Vi è effettivamente la fattibilità di questo approccio, considerando che questi risultati da studi epidemiologici, dove ampi numeri di proteine sono state misurate su vaste coorti, rappresentano dei punti di partenza per validare, solo le proteine più importan-



**Figura 1** - Integrazione dei dati di proteomica plasmatica con i dati "radiomici" per aumentare l'accuratezza della stima del rischio cardiovascolare.

Lo schema riassume quanto riportato nel testo, suggerendo che l'integrazione, mediante intelligenza artificiale, dei dati di imaging (relativi a presenza, morfologia e composizione della placca ateromasica) con i dati di proteomica plasmatica può migliorare l'accuratezza nell'identificare un maggior numero di soggetti che, seppur "apparentemente sani" secondo i classici algoritmi di rischio, sono già esposti a un maggior rischio cardiovascolare. Nella figura: "AI" = Intelligenza Artificiale.

ti, su altre coorti, e per proporre queste stesse come futuri biomarcatori, determinabili su scala clinica, con metodiche più economiche e con minimi volumi di plasma.

Per arrivare a questo livello e per fornire delle informazioni che siano degne di traslazione clinica, vi è però la necessità di unire più coorti epidemiologiche indipendenti e di analizzare questo ampio spettro di informazioni mediante avanzate tecniche di analisi dati. A riguardo, l'A.I. permetterebbe anche di integrare i dati di proteomica con quelli radiomici e di imaging vascolare, così da identificare marcatori "vasculotropici" che meglio possano informare sull'evoluzione del danno d'organo preclinico (*Figura 1*).

L'identificazione di panelli "ad hoc", per specifici strati della popolazione, ha un immediato risvolto dal punto di vista interventistico, al fine di avvicinarsi alla "personalizzazione" di interventi farmacologici preventivi. Di questa tangibile possibilità, né è un esempio lo studio CANTOS, in cui i soggetti che erano maggiormente esposti a un rischio "infiammatorio" residuo (ovvero che presentavano livelli plasmatici di proteina C reattiva) erano anche coloro che, già esposti alla più aggressiva terapia ipolipemizzanti, avevano più beneficiato della neutralizzazione dell'interleuchina 1beta (Canakinumab) (12).

È altrettanto vero che, ad ogni modo, questa ipotesi non deve indurre il clinico a ritenere che le terapie antinfiammatorie, di elevato costo e la cui traslazione nella pratica comune è questionabile, debbano diventare delle armi terapeutiche di prima linea; per contro, questa ipotesi deve suggerire che l'identificazione di un effettivo "rischio infiammatorio residuo" in alcuni soggetti "apparentemente sani" sia lo spunto per ridefinire le priorità di strategie tempestive. Questa possibilità racchiude anche la prospettiva, di ottimizzare le risorse e le risorse terapeutiche messe a disposizione dal nostro Servizio Sanitario per la cura della popolazione.

#### *Ringraziamenti*

A. Baragetti è supportato da: Ministero della Salute - Ricerca Corrente - IRCCS MultiMedica (GR-2011-02346974); "Cibo, Microbiota, Salute" by "Vini di Batasiolo S.p.A" AL\_RIC19ABARA\_01; finanziamento da Peanut Institute Foundation (2021); Ministero dell'Università e della ricerca (PRIN 2017H5F943); Commissione Europea (ERANET ER-2017-2364981); Commissione Europea ("PNRR M4C2-Investimento 1.4-CN00000041", European Union-NextGeneration EU).

Non si riportano conflitti di interesse rilevanti per i contenuti e per la stesura di questo manoscritto.

#### **RIASSUNTO**

L'accuratezza e la sensibilità delle comuni metodiche per la predizione del rischio di sviluppare eventi cardiovascolari e cerebrovascolari è ancora ben lontana dall'essere soddisfacente, date alcune criticità nell'applicare le comuni carte di rischio a quei soggetti che, essendo esposti a un basso numero di fattori di rischio, sono generalmente considerati "apparentemente sani" e che, pertanto, non rientrano tra le casistiche a più alta priorità di intervento preventivo. Pur tuttavia, studi epidemiologici indicano che vi è una significativa proporzione di questi soggetti che già presentano lesioni aterosclerotiche precliniche in più distretti cardiovascolari e le più comuni metodiche di imaging, che sono anche spesso sottoutilizzate in questi soggetti, non riescono a catturare questa evidenza.

Vi è quindi la necessità di introdurre nuovi strumenti diagnostici e prognostici che superino tutte queste barriere. Tra tutti quelli sino ad oggi esplorati, l'analisi di più proteine ("proteomica") nel plasma sembra essere quella più sensibile, più accurata, più fattibile per la stima del rischio su ampie casistiche e, al contempo, anche più abbordabile dal punto di vista economico rispetto ad altre strategie "omiche".

Inoltre, l'avvento di potenti strumenti per l'analisi di ampie quantità di dati (intelligenza artificiale) ha la possibilità di coordinare i dati derivanti dalle analisi proteomiche con quelle derivante dalle analisi di imaging ("radiomica"), al fine di generare dei pannelli di marcatori adattabili per l'identificazione di quegli stessi soggetti "apparentemente sani" e per rendere sempre più tempestivo ed efficace il trattamento preventivo.

**Parole chiave:** *Rischio cardiovascolare, proteomica, biomarcatori, intelligenza artificiale, imaging vascolare.*

## Bibliografia

1. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Carter A, Casey DC, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388: 1459-544.
2. Turner GM, Calvert M, Feltham MG, Ryan R, Fitzmaurice D, et al. Under-prescribing of Prevention Drugs and Primary Prevention of Stroke and Transient Ischaemic Attack in UK General Practice: A Retrospective Analysis. *PLoS Med*. 2016; 13.
3. Wu J, Zhu S, Yao GL, Mohammed MA, Marshall T. Patient factors influencing the prescribing of lipid lowering drugs for primary prevention of cardiovascular disease in UK general practice: a national retrospective cohort study. *PLoS One*. 2013; 8.
4. Ko DT, Mamdani M, Alter DA. Lipid-lowering therapy with statins in high-risk elderly patients: the treatment-risk paradox. *JAMA*. 2004; 291: 1864-70.
5. Ibanez B, Fernández-Ortiz A, Fernández-Friera L, García-Lunar I, Andrés V, Fuster V. Progression of Early Subclinical Atherosclerosis (PESA) Study: JACC Focus Seminar 7/8. *J Am Coll Cardiol*. 2021; 78: 156-79.
6. Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, et al. Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation*. 2015; 131: 2104-13.
7. Saba L, Saam T, Jäger HR, Yuan C, Hatsukami TS, Saloner D, et al. Imaging biomarkers of vulnerable carotid plaques for stroke risk prediction and their potential clinical implications. *Lancet Neurol*. 2019; 18: 559-72.
8. Joshi A, Rienks M, Theofilatos K, Mayr M. Systems biology in cardiovascular disease: a multiomics approach. *Nat Rev Cardiol*. 2021; 18: 313-30.
9. Unterhuber M, Kresoja KP, Rommel KP, Besler C, Baragetti A, Klötting N, et al. Proteomics-Enabled Deep Learning Machine Algorithms Can Enhance Prediction of Mortality. *J Am Coll Cardiol*. 2021; 78: 1621-31.
10. Hoogeveen RM, Pereira JPB, Nurmohamed NS, Zampoleri V, Bom MJ, Baragetti A, et al. Improved cardiovascular risk prediction using targeted plasma proteomics in primary prevention. *Eur Heart J*. 2020.
11. Baragetti A, Mattavelli E, Grigore L, Pellegatta F, Magni P, Catapano AL. Targeted Plasma Proteomics to Predict the Development of Carotid Plaques. *Stroke*. 2022; 53.
12. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*. 2017; 377: 1119-31.