

Variació Molecular en les Sintases d'Òxid Nítric en Poblacions Humanes i Susceptibilitat Cardiovascular



TESI DOCTORAL

Marc Via i García

2006

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA ANIMAL - UNITAT D'ANTROPOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT BIOLOGIA ANIMAL II: ANTROPOLOGIA
BIOLÒGICA (BIENNI 1998-2000)

**VARIACIÓ MOLECULAR EN LES SINTASES D'ÒXID NÍTRIC EN
POBLACIONS HUMANES I SUSCEPTIBILITAT CARDIOVASCULAR**

MEMÒRIA PRESENTADA PER

MARC VIA I GARCÍA

PER A OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

AMB EL VIST-I-PLAU DE:

EL DIRECTOR DE LA TESI

LA TUTORA

PEDRO MORAL CASTRILLO

CLARA GARCÍA MORO

Barcelona, Abril de 2006

Aquesta tesi ha estat elaborada gràcies al suport de:

Universitat de Barcelona, beca predoctoral de Recerca i Docència.
Setembre 2001 - Abril 2002.

Generalitat de Catalunya, beca predoctoral de Formació d'Investigadors
(2002FI 00516). 2002-2005.

Dirección General de Investigación (MCYT), projectes subvencionats PB98-
1235-C03-01 i BMC2002-01224. 1999-2002 i 2003-2005.

Generalitat de Catalunya, Grup de Recerca Consolidat "Biologia de les
Poblacions Humanes": 1998SGR 00129, 2000SGR 00033 i 2001SGR 00089.

Als meus pares

Publicamos para no pasarnos la vida corrigiendo borradores.

Jorge Luis Borges (1899-1986)

Las matemáticas no aman, pero tampoco fallan.

Mártires del Compás

AGRAÏMENTS

Per fi ha arribat el moment d'enllestir el treball de tots aquests anys i, en aquest moment, també és important fer balanç de totes les persones que han contribuït directa o indirectament a fer-lo real.

En primer lloc, gràcies al Pedro Moral. Per haver-me donat aquesta oportunitat i per tot el seu ajut, especialment en la recta final.

A la gent del grup. A la Neus per explicar-me què co... és un TDT. Al Toni, per introduir-me al laboratori i per ser una de les millors persones que conec. A l'Emili, per ser tan bon company dins i fora de la facultat. A l'Esther, per ser la germana gran ideal. A la Meri, pel meravellós món de la tTA. A la Nati (perdó, Nat), per la NOS1 i les seves arrecades de perletes. A les noves generacions, el Josep, la Magda i el Yorgos.

A tots els companys de la Unitat. Al Dr. Pons, *prócer* de l'antropologia, per ensenyar-nos la importància d'aprendre una cosa nova cada dia. Als biodemògrafs i craneòmics (la Mireia, el Joel, la Neus i la Marta), pels suports estadístics i personals. A les Lourdes' girls (la Barbie, la Blanca, l'Araceli, el Sergi, la Bea i la Mar) pel seu toc femení i el consol al laboratori. Al fondo sur (el Jordi, la Núria, l'Eva, la Laura i el Ferran), als sèniors (el Miquel, la Clara, el Txomin, la Lourdes i el Carles) i a la resta de companys de la Unitat.

Als exiliats i repatriats (el Rolo, la Silvina, la Mar Matarín, l'Alberto i l'Antonio), per que se us enyora des de la distància. Als psikolokos de la Vall d'Hebron (el David, la Imma i la Cristina), als de la Pompeu Fabra (el Jordi, el David, l'Eva, el Francesc, l'Elena, l'Anna, la Mònica i l'Aida) i als companys d'El-Jadida, Cagliari i Toulouse (el Nourdin, el Mustafá, el Giuseppe, la Carla, l'Alessandra, la Lucia, l'Helena, el Laurent, el Jean-Michel, l'Stéphane, la Clotilde i la Magda). A la gent de la Unitat de Genòmica dels SCT i de la Unitat de Lípids, per les contribucions tècniques.

A la gran família del Córner (o Monolito), que inclou diverses generacions de biòlegs i simpatitzants i que han contribuït més del que es pensen, amb converses trascendentals i mundanes, a que aquesta tesi tirés endavant.

A tota la gent anònima que ha donat generosament una mostra de la seva sang, sense les que aquest treball no hagués estat possible.

A la meva família. A l'Òscar, a l'Empar i a l'Eusebi. Aquestes grans persones que sempre han estat al meu costat, que sempre m'han ajudat i que sempre han cregut en el que estava fent, tot i que moltes vegades no hagin entès les coses rares que el seu fill (o germà) ha estat fent tots aquests anys.

A l'Eli, per tants moments. Per tot.

ÍNDIX

I. INTRODUCCIÓ.....	13
SALUT I MALALTIA A LES POBLACIONS HUMANES	15
MALALTIES INFECCIOSES I DIVERSITAT GENÈTICA	17
MALALTIES COMPLEXES I DIVERSITAT GENÈTICA	18
APROXIMACIONS A LES BASES GENÈTIQUES DE LES MALALTIES COMPLEXES	21
ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ	23
TEST DE DESEQUILIBRI DE LA TRANSMISSIÓ (TDT)	25
POBLAMENT HUMÀ DE LA MEDITERRÀNIA	27
MARC HISTÒRIC	27
GENÈTICA DE POBLACIONS HUMANES A LA MEDITERRÀNIA	31
CARDIOPATIA ISQUÈMICA	35
DEFINICIÓ DE LA MALALTIA	35
FISIOPATOLOGIA	38
FACTORS DE RISC	42
MORTALITAT PER CAI	45
HERETABILITAT DE LA CAI	47
ÒXID NÍTRIC	49
ÒXID NÍTRIC I SISTEMA CARDIOVASCULAR	52
LES SINTASES D'ÒXID NÍTRIC (NOS)	54
BIOSÍNTESI DEL NO	56
NOS1	59
NOS2	65
NOS3	72
II. OBJECTIUS.....	79
III. MATERIAL I MÈTODES.....	83
DESCRIPCIÓ DE LES MOSTRES ANALITZADES	85
MOSTRES POBLACIONALS	85
MOSTRA DE FAMÍLIES AMB CARDIOPATIA ISQUÈMICA	88
OBTENCIÓ DE LA MOSTRA	88

CARACTERÍSTIQUES DE LA MOSTRA DE FAMÍLIES	92
PROCESSAMENT DE LES MOSTRES	95
DETERMINACIONS GENÈTIQUES	96
POLIMORFISMES ANALITZATS PER ELECTROFORESI DIRECTA DEL PRODUCTE	
AMPLIFICAT	98
POLIMORFISMES DE LONGITUD DE FRAGMENTS DE RESTRICCIÓ (RFLPs)	99
POLIMORFISMES DE TIPUS MICROSATÈL·LIT ANALITZATS MITJANÇANT ANALITZADOR	
DE FRAGMENTS	100
POLIMORFISMES ANALITZATS PER PCR A TEMPS REAL (<i>REAL TIME-PCR</i>)	103
QUANTIFICACIÓ DE NITRATS I NITRITS EN PLASMA	106
DETERMINACIONS ESTADÍSTIQUES	107
DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT	107
ANÀLISI POBLACIONAL	108
ANÀLISI EPIDEMIOLÒGICA	109
IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ	113
RESULTATS ESTUDI POBLACIONAL	115
NOS1	115
VARIACIÓ AL·LÈLICA	115
DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT	123
VARIACIÓ HAPLOTÍPICA	125
NOS2	128
VARIACIÓ AL·LÈLICA	128
DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT	135
VARIACIÓ HAPLOTÍPICA	137
NOS3	139
VARIACIÓ AL·LÈLICA	139
DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT	145
VARIACIÓ HAPLOTÍPICA	147
ANÀLISI DE LA VARIACIÓ CONJUNTA EN LES NOS	150
RESULTATS ESTUDI EPIDEMIOLÒGIC	155
VARIACIÓ AL·LÈLICA I HAPLOTÍPICA	155
VARIACIÓ AL·LÈLICA	155

DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT	159
VARIACIÓ HAPLOTÍPICA	163
ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE LA TRANSMISSIÓ (TDT)	164
<i>Locus</i> NOS1	165
<i>Locus</i> NOS2	167
<i>Locus</i> NOS3	170
PODER ANALÍTIC DE LA MOSTRA	172
ANÀLISI DELS NIVELLS DE NITRATS I NITRITS EN PLASMA	174
DISCUSSIÓ	181
DIVERSITAT POBLACIONAL	181
ESTRUCTURACIÓ GEOGRÁFICO-POBLACIONAL DE LA VARIACIÓ GENÈTICA	182
VARIACIÓ GENÈTICA I SUSCEPTIBILITAT CARDIOVASCULAR	186
<i>Locus</i> NOS1	187
<i>Locus</i> NOS2	191
<i>Locus</i> NOS3	194
V. CONCLUSIONS.....	199
LLISTAT D'ABREVIATURES	205
LLISTAT DE FIGURES	206
LLISTAT DE TAULES	208
BIBLIOGRAFIA	211
ANNEXOS	225

INTRODUCCIÓ

SALUT I MALALTIA A LES POBLACIONS HUMANES

La malaltia ha acompanyat a l'home al llarg del seu viatge evolutiu fins a l'actualitat. Des de les primeres etapes del llinatge que ens separa dels nostres "parents" vius més propers, ximpanzès i bonobos, diferents evidències en les restes fòssils mostren la presència de malalties. Per exemple, són abundants els casos d'hipoplàxies durant el desenvolupament, i inclús s'han documentat casos de periodontitis en restes d'*Australopithecus africanus* (Ripamonti, 1988). Així, la malaltia ha estat una experiència habitual en la vida de les poblacions humanes, passades i actuals, que ha influït en la seva ecologia i en la seva demografia. Com a causa de mortalitat (o causant de diferències en la capacitat de deixar descendència) dels seus individus, la malaltia ha estat un dels factors moduladors del patrimoni genètic de l'espècie humana a través, sobretot, d'una pressió selectiva sobre les característiques que eren avantatjoses (o desavantajoses) davant uns condicionaments ambientals determinats.

En una concepció més àmplia, la malaltia no és sinó un tipus més de variació fenotípica, manifestada en un conjunt de característiques patològiques. Aquest fenotip, com qualsevol altre, ve determinat per una component ambiental i una de genètica. Així mateix, les complexes interaccions entre totes dues components al llarg del desenvolupament de l'individu, l'atzar i diferents aspectes del nostre passat evolutiu han anat modulant i influïnt la seva variació.

Com a espècie animal amb una aparició relativament recent en el planeta (100.000-200.000 anys abans del present), és remarcable la ràpida expansió per una extensió geogràfica pràcticament global. Aquesta ràpida expansió ha portat l'home a colonitzar ambients diversos entre si en molts aspectes: geològics, climatològics, ecològics, ... Entre els exemples clàssics d'adaptació a l'ambient es troba la variació latitudinal que presenta la pigmentació de la pell en un gradient directament relacionat amb la intensitat de la radiació solar.

Aquesta odissea per tots els continents ha travessat algunes etapes que han suposat un canvi important. Així, per exemple, el desenvolupament de l'agricultura i la ramaderia ha influït notòriament en el transcurs de la nostra història com a espècie. La revolució neolítica va comportar importants explosions demogràfiques i grans moviments migratoris. La domesticació d'animals va comportar l'aparició de noves malalties i la modificació de la dieta de les poblacions humanes.

La persistència lactàsica és un bon exemple d'adaptació al canvi de dieta per part de les poblacions humanes (Myles et al., 2005). En la majoria de poblacions humanes, així com en la resta de mamífers, la capacitat per digerir lactosa decreix després del deslletament matern per la caiguda dels nivells de l'enzim lactasa a l'intestí prim. Tot i així, hi ha individus adults que mantenen l'activitat lactasa de forma permanent encara que passin períodes llargs de temps sense consumir llet. Aquesta persistència lactàsica es distribueix geogràficament de forma molt particular. És molt prevalent (>70%) en poblacions d'origen europeu i en certes poblacions africanes amb una economia de pastoreig molt important (tuareg, tutsis, bejas, ...); mostra freqüències intermitges (30-70%) a la Mediterrània, a l'Orient Mitjà i a certes zones d'Àsia; i és poc freqüent a Amèrica, Pacífic i en moltes poblacions sud-saharianes i asiàtiques (veure figura I.1). A partir d'una anàlisi introduint filogènies genètiques i culturals, Holden i Mace (1997) van establir que la major part de la variança en els nivells de persistència lactàsica era atribuïble al pastoreig com a activitat productiva important. Així, pobles veïns com hutus i tutsis (tristament famosos per d'altres motius) arriben a mostrar nivells completament oposats de persistència pel seu diferent tipus d'economia (bàsicament agrícola i ramadera, respectivament).

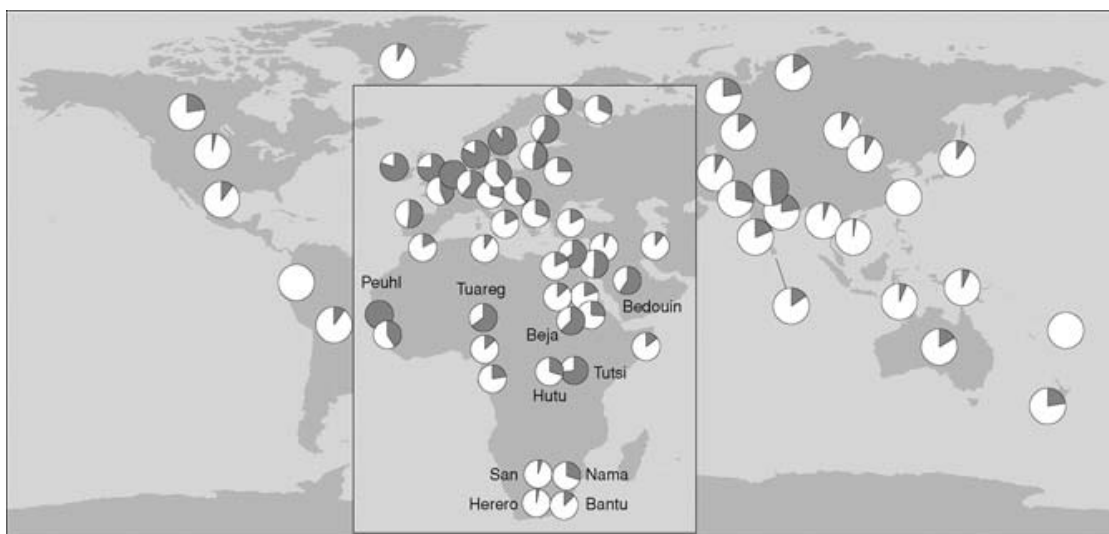


Figura I.1. Freqüència de l'al·lel de persistència a la lactasa (LCT*P) en diferents poblacions (marcat en gris fosc). Modificat a partir de la informació de Swallow i Hollox (2000).

Ja en temps històrics, grans moviments migratoris han posat en contacte poblacions que havien estat separades entre si durant un llarg període de temps. L'era de les grans expedicions geogràfiques i els imperis colonials conseqüents van crear fluxos migratoris a gran distància i van barrejar, en diferent grau segons cada cas particular, les poblacions autòctones, les provinents de les metròpolis europees i, en alguns casos, els contingents d'esclaus portats d'altres continents. Aquests moviments han evidenciat l'adaptació que les poblacions havien fet al seu entorn amb exemples com l'elevada incidència de melanoma en individus d'origen europeu residents a Austràlia (per un "dèficit" de pigmentació) i la de raquitisme en població afroamericana d'Estats Units (per un "excés" de pigmentació, unit molts cops a una pitjor situació social). Paral·lelament a aquests fluxes, diferents malalties infeccioses anteriorment acotades geogràficament s'estenen per diferents parts del planeta i fins a l'actualitat constitueixen la principal causa de mortalitat humana.

MALALTIES INFECCIOSES I DIVERSITAT GENÈTICA

Entre l'espectre possible de malalties, les infeccioses han estat les principals causants de mortalitat en les poblacions humanes en aquest viatge en el temps i l'espai. Al llarg del temps, canvis en el clima, en la demografia humana, en la concentració d'individus en grans nuclis i en les interaccions entre hoste i malaltia han anat alterant el panorama de malalties infeccioses.

Considerant els organismes responsables d'aquesta malaltia com a factors de pressió selectiva que poden influir en l'èxit reproductiu, poden observar-se genotips individuals que han estat seleccionats per la seva eficàcia davant de possibles infeccions. D'aquesta manera, alguns aspectes de la diversitat genètica humana actual han estat determinats per malalties que han estat actuant en temps prehistòrics i històrics.

El cas més evident és el que exemplifica la malària. La infecció per protozous del gènere *Plasmodium* (amb quatre espècies, *P. falciparum* la més important, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*) és encara actualment una de les malalties infeccioses més important del planeta. Segons les dades de l'OMS, l'any 2002 van morir 1.272.393 persones per malària a tot el món (<http://www.who.int>). La prevalença endèmica de malalties monogèniques com la talassèmia o l'anèmia falciforme en certes àrees geogràfiques va evidenciar una certa correlació amb l'àrea de

distribució de la malària. En determinades zones, al·lels associats amb certes patologies hematològiques s'han mantingut en equilibri en la població amb unes freqüències relativament elevades (Kwiatkowski, 2005). En el cas de variants al·lèliques protectores davant la infecció per malària i que no comporten cap tipus de patologia per si mateixes, aquestes s'han observat amb freqüències properes a la fixació en certes poblacions amb paludisme endèmic (per exemple, l'al·lel FY*O del *locus* Duffy en moltes poblacions sud-saharianes).

En algunes regions mediterrànies com el Delta de l'Ebre o la costa de Sardenya, la malària no va ser erradicada fins a principis del segle XX, i en tota la conca ha estat una malaltia infecciosa important al llarg de la història. Cal recordar, per exemple, la mort de Dante Alighieri a Ravenna (a prop de Bologna) l'any 1321, o la de Martí el Jove, rei de Sicília i fill de Martí I l'Humà, a Sardenya l'any 1409, tots dos per paludisme.

A l'actualitat, encara van apareixent indicis d'altres marcadors genètics implicats en la protecció davant de la malària. Gens tals com la sintasa 2 d'òxid nítric (NOS2) o el receptor de LDL (LDL-R) són objecte d'estudi per mostrar-se implicats en el procés d'infecció per *Plasmodium*, alguns amb variants polimòrfiques que protegeixen de la malaltia i/o produeixen una menor severitat. La substitució G-954C al promotor del gen NOS2, per exemple, confereix una certa resistència a la malària i ha estat detectada com a polimòrfica en població africana i afroamericana, però inexistent en poblacions ameríndies i d'origen europeu (Kun et al., 1998; Martin et al., 1999). Tot i així, zones europees mediterrànies com Sardenya o el Sud de la Península Ibèrica, amb un historial destacable de malària, han presentat aquesta substitució amb freqüències al voltant del 20% (Falchi, 2004).

MALALTIES COMPLEXES I DIVERSITAT GENÈTICA

Malgrat que les malalties infeccioses han estat les principals causes de mortalitat al llarg de la història evolutiva de les poblacions humanes, aquest panorama ha canviat en les anomenades societats occidentals. A finals del segle XIX i principis del segle XX els patrons demogràfics de moltes societats humanes han canviat. Les millores en les condicions de vida, en l'alimentació, en sanitat, descensos en la mortalitat infantil, així com les polítiques de control de la natalitat han portat

aquestes poblacions al que s'ha anomenat transició demogràfica. Aquesta transició ha canviat substancialment la demografia de les societats industrialitzades, especialment en la distribució per edats de les poblacions.

L'envelliment d'aquestes societats, juntament amb el control a què les malalties infeccioses han estat sotmeses (especialment amb el descobriment i la difusió dels antibiòtics a partir de mitjans del segle XX) ha conduït a canvis en la mortalitat i morbiditat en una **transició epidemiològica**. Com a il·lustració, només cal comparar les 10 causes principals de mortalitat als Estats Units d'Amèrica els anys 1900 i 1990 (taula I.1). Mentre que a principis del segle XX les malalties infeccioses eren les principals causants de la mortalitat, noranta anys més tard les principals causes passaven a ser malalties no infeccioses clàssicament relacionades amb l'edat: ateroscлерòtiques, cerebrovasculars, neoplàsiques, pulmonars cròniques, neurològiques, ...

Moltes d'aquestes malalties tenen una component ambiental important relacionada amb el tipus de vida de l'individu afectat (consum de tabac, factors dietètics o inactivitat física, entre d'altres) que han fet que de vegades siguin anomenades "malalties de la civilització". Malgrat aquesta component ambiental, ha estat demostrada una base genètica important en patologies aterotrombòtiques com l'infart de miocardi (Grant, 2003), en el càncer de mama (Locatelli et al., 2004) o en diabetes de tipus 2 (Shaw et al., 1999).

	1900	1990
1	Pneumònia (tot tipus) i grip	Malalties coronàries
2	Tuberculosi (tot tipus)	Neoplàsies malignes
3	Diarrea, enteritis i úlceres intestinals	Traumatismes i accidents
4	Malalties coronàries	Malaltia cerebrovascular
5	Lesions intracranials d'origen vascular	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
6	Nefritis (tot tipus)	Pneumònia (tot tipus) i grip
7	Accidents (tot tipus)	Diabetes mellitus
8	Càncer i altres tumors malignes	Suïcidi
9	Senilitat	Homicidis i execucions
10	Diftèria	SIDA

Taula I.1. Principals causes de mortalitat als EUA els anys 1900 i 1990. Extret de Gerstman (2003).

Ràpidament sorgeix una pregunta: com pot ser que la selecció natural no hagi actuat sobre aquestes variants aparentment perjudicials? D'una banda, cal recordar que aquestes malalties acostumen a tenir, excepte en casos molt concrets com la hipercolesterolèmia familiar, una edat d'aparició a la que la majoria d'individus de la població ja han exercit la seva capacitat reproductora. Així, aquestes variants de susceptibilitat genètica han estat transmeses a la següent generació abans que la malaltia aparegui en l'individu que n'és portador, convertint-les en "invisibles" per la selecció natural.

A més, han sorgit algunes teories que suposen un caràcter adaptatiu d'algunes d'aquestes variants en el que s'ha anomenat teoria dels **genotips estalviadors** (de l'anglès *thrifty genotypes*), desenvolupada per Neel (1962) a partir de l'estudi de la incidència de diabetes en el indis Pima americans. Segons aquesta hipòtesi, aquestes variants aconseguirien aprofitar al màxim els recursos energètics dels aliments en ambients en els que aquests recursos no eren constants i hi havia una alternança de períodes amb aliment relativament abundant amb d'altres de fam. Aquesta és la situació nutricional que se suposa predominant durant, com a mínim, el Paleolític.

Quan aquesta "paleodieta" va canviar, aquestes variants van perdre el seu avantatge i actualment, amb l'augment de l'esperança de vida i una alimentació rica en greixos i en hidrats de carboni refinats, han provocat un fort augment de patologies com la diabetes i l'aterosclerosi per un suposat excés "d'aprofitament" dels recursos alimentaris.

Aquesta teoria ha de fer-nos reflexionar sobre el caràcter positiu o negatiu atorgat a determinades variants genètiques. Els condicionaments ambientals poden canviar al llarg del temps i determinar que les variants que ahir eren beneficioses avui puguin ser considerades perjudicials.

APROXIMACIONS A LES BASES GENÈTIQUES DE LES MALALTIES COMPLEXES

Amb la revolució que van suposar als anys 1970 i 1980, les innovacions en les tècniques de biologia molecular, van aparèixer en sèrie els treballs que identificaven els gens responsables de determinades malalties genètiques més o menys rares, que es produïen de forma endèmica a determinades poblacions humanes (generalment, d'origen europeu, per un clar enfocament etnocèntric de la recerca). Així, malalties que seguien un patró mendelià clar, com la fibrosi quística o la corea de Huntington, van tenir identificats els gens involucrats en els fenotips patològics clàssicament coneguts.

Com a conseqüència d'aquest èxit inicial, les esperances de la recerca es van dirigir cap a la determinació dels factors genètics involucrats en malalties complexes com la diabetes, les malalties cardiovasculars, diferents tipus de tumors, ... Moltes d'aquestes malalties mostraven una component hereditària important i les seves incidències a nivell poblacional són molt més elevades que en aquelles que segueixen un patró mendelià simple. La determinació d'aquests factors genètics s'ha demostrat molt més difícil del que les previsions indicaven, potser de forma massa optimista.

Aquestes malalties, a més de tenir una component genètica i ambiental heterogènia es caracteritzen per ser malalties comunes. El terme “comú” té una doble implicació: primer, que la malaltia és prevalent, i segon, que té una àmplia dispersió. Aquestes característiques de freqüència i distribució poden ser possibles si els al·lels de susceptibilitat per la malaltia eren prevalents en la població ancestral de la humanitat actual i van ser distribuïts amb la dispersió cap a la resta del planeta, que ha originat les poblacions actuals. Aquesta hipòtesi del *common disease:common variant* (Reich i Lander, 2001) ha resultat molt atractiva perquè suggereix que l'heterogeneïtat genètica subjacent a la susceptibilitat a la malaltia podria ser relativament petita.

Com a alternativa a aquesta hipòtesi, JK Pritchard (2001) va desenvolupar el **model de variants rares**, en què postula que les variants poc freqüents serien els factors genètics associats a les malalties complexes. Aquest model es basa en certes assumpcions sobre les taxes de mutació i la grandària efectiva de la població ancestral que, tot i ser plausibles, poden no ser certes.

Un primer enfocament per detectar aquestes variants de susceptibilitat genètica ha estat a partir d'**estudis de lligament** en *pedigrees* amb famílies que manifestaven la malaltia amb un patró d'herència bastant senzill. Aquesta aproximació metodològica ha permès la identificació de gens involucrats en subdivisions concretes, i poc freqüents, del fenotip de la malaltia. En general, els mecanismes moleculars detectats en gens com les presenilines (associades a l'Alzheimer a edat temprana) o l'ABC1 (associat a la hipercolesterolèmia familiar) només contribueixen a explicar una petita part dels casos.

D'altres estudis han decidit estudiar els fonaments de malalties complexes en poblacions concretes, generalment petites, aïllades o amb un efecte fundador clar. Aquests estudis pretenen reduir tant l'heterogeneïtat genètica com l'ambiental. Així, poblacions com els finesos, els sards o els islandesos han estat en el punt de mira d'aquesta aproximació metodològica.

El cas més curiós és, potser, el d'Islàndia. L'empresa deCODE Genetics ha reunit més de 100.000 mostres d'individus islandesos (més de la meitat de la població adulta), ha reconstruït les seves genealogies i les ha creuat amb els historials clínics disponibles per tots ells. Amb aquest enfocament, intenta identificar regions genòmiques involucrades en diferents malalties complexes (en l'actualitat són unes deu, des d'esquizofrènia fins a diferents malalties cardiovasculars). Com a exemple es pot observar la figura 1.2, on s'ha reconstruït la genealogia de 102 pacients islandesos afectats per asma.

La utilització de poblacions relativament aïllades i amb un efecte fundador important pretén augmentar en la mostra el grau de desequilibri de lligament entre els marcadors analitzats i el *locus* directament associat a la malaltia. Aquest enfocament, realitzat per exemple en poblacions sardes i fineses, ha aportat resultats contradictoris sobre la seva utilitat en els estudis de lligament i d'associació (Eaves et al., 1998; Eaves et al., 2000)

L'aproximació més habitual, però, ha estat la realització d'estudis d'associació, ja sigui a partir d'un disseny cas-control o a partir d'un disseny basat en famílies (a partir de mostres de parelles de germans o de famílies nuclears).

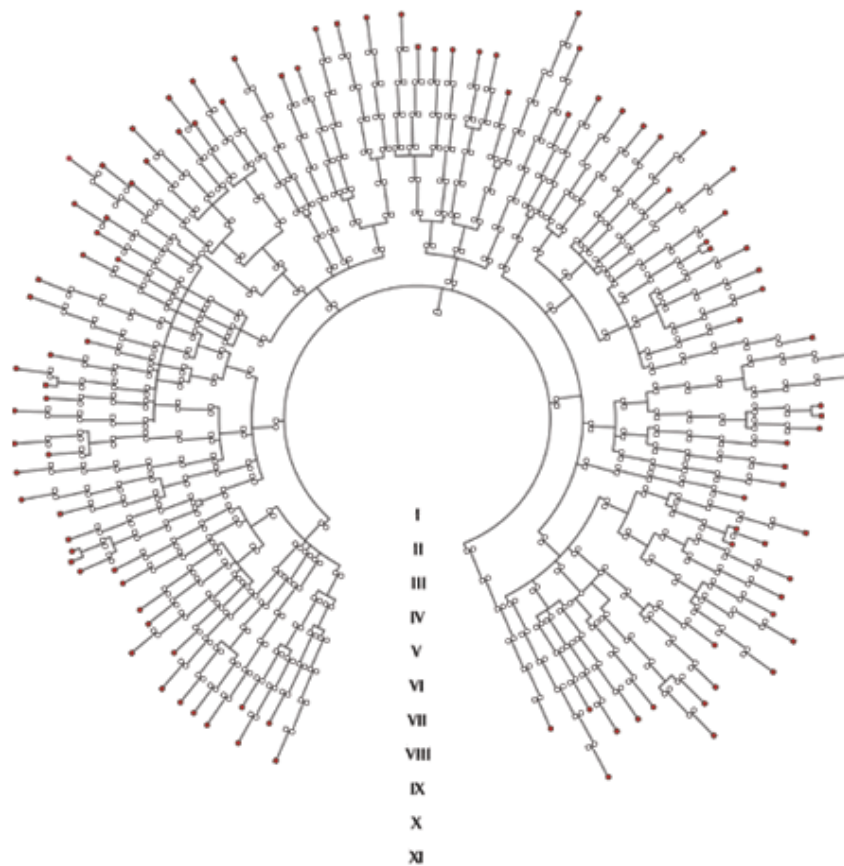


Figura 1.2. Cent dos pacients islandesos afectats per asma veuen com la seva genealogia conflueix en una parella fundadora nascuda a mitjans del segle XVII. Extret de <http://www.decode.com>.

ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ

Com a estudis per detectar les bases genètiques de malalties complexes, els estudis d'associació s'han mostrat més útils que els estudis de lligament en *pedigrees*. Amb tamanyos mostrals més petits aconsegueixen més poder per detectar associacions (Risch i Merikangas, 1996). A més, els estudis d'associació presenten una sensibilitat molt superior per detectar gens de susceptibilitat per a una malaltia complexa, especialment quan el risc relatiu associat al genotip de susceptibilitat és petit (Greenberg i Doneshka, 1996).

Mentre que els estudis de lligament pretenen identificar regions cromosòmiques que puguin estar implicades en la malaltia estudiada, els estudis d'associació es basen en l'aproximació de **gens candidats** (*candidate genes*). L'anàlisi de gens candidats es fonamenta en l'estudi de polimorfismes en gens identificats que

codifiquen per productes implicats en vies metabòliques que, en cas de ser alterades, poden participar en l'aparició de la malaltia. Així, per exemple, el gen d'un enzim involucrat en el metabolisme de les lipoproteïnes podria ser un gen candidat per estudiar malalties d'origen ateroscleròtic, o un d'involucrat en la reparació del DNA podria ser un gen candidat per determinats tipus de càncer.

L'anàlisi d'associació tracta d'establir una co-ocurrència entre un al·lel d'un polimorfisme determinat i la malaltia. Tot i trobar una relació estadística, les explicacions genètiques que justifiquin aquesta relació poden ser diferents. L'explicació més simple és que el marcador analitzat proporcioni per si mateix un risc augmentat (o disminuït) per la malaltia, encara que molts cops només indica la presència d'un *locus* involucrat en la malaltia que presenta desequilibri de lligament amb el marcador analitzat. A més, d'altres explicacions són possibles: el marcador pot estar interaccionant epistàticament amb un segon *locus*, o l'associació detectada pot ser falsa per errors en la mostra, en la definició de la malaltia o per la presència de factors interferidors.

L'aproximació més senzilla són els **estudis d'associació cas/control**. Aquests estudis comparen les freqüències d'al·lels o genotips entre una mostra d'individus afectats (casos) i una de no afectats per la malaltia (controls). Diferències significatives entre les mostres estarien indicant la implicació com a factor de risc o com a factor protector de l'al·lel o genotip analitzat. El principal inconvenient d'aquests estudis són els possibles problemes d'estratificació de la població. Si la població en la que estem recollint les mostres cas i control està subdividida en grups que difereixen en la freqüència del marcador o en la incidència de la malaltia, les associacions detectades poden ser errònies. A més, existeix el problema de la definició de la majoria de malalties complexes, ja que és impossible saber si una persona aparentment sana (susceptible de ser inclosa en la mostra control) està desenvolupant la malaltia de forma asimptomàtica.

Com a complement dels estudis cas/control, a finals dels anys 80 i principis dels 90 van desenvolupar-se els **estudis d'associació basats en famílies**. Aquests estudis empen controls emparentats genèticament amb els individus cas per evitar els problemes d'estratificació que poden afectar els estudis cas/control.

La primera aproximació a aquest disseny mostral va ser la d'incloure als germans dels casos, tenint en compte la concordança o no del fenotip de la malaltia entre els germans. Més endavant es van començar a utilitzar mostres de famílies nuclears

(l'individu afectat i els dos pares) i es comparava les freqüències dels al·lells dels fills afectats (els transmesos pels progenitors) amb les dels no transmesos pels pares. Aquesta metodologia es basa en el fet demostrat de què els al·lells no transmesos són equivalents a les freqüències poblacionals (Rubinstein et al., 1981). Tot i que es segueixen utilitzant aquestes aproximacions, el test que més habitualment s'utilitza en estudis d'associació basats en famílies és el test de desequilibri de la transmissió (TDT).

TEST DE DESEQUILIBRI DE LA TRANSMISSIÓ (TDT)

Aquest test estadístic va ser desenvolupat per Spielman i col·laboradors (1993) i només utilitza la informació aportada pels pares heterozigots. En aquest test s'analitza les vegades (t_{M_1}) que un pare heterozigot per un al·lel determinat M_1 transmet aquest al·lel a un descendent afectat en comparació amb les vegades (t_{M_x}) que no es transmet aquest al·lel, sinò un de diferent (M_x). A partir d'aquestes dades, es calcula el desequilibri en la transmissió d'un al·lel determinat d'un *locus* mitjançant l'expressió:

$$TDT = \frac{(t_{M_1} - t_{M_x})^2}{t_{M_1} + t_{M_x}}$$

que presenta una distribució χ^2 amb 1 grau de llibertat.

La freqüència de la transmissió paterna d'un al·lel determinat al fill malalt és comparada amb la freqüència de la seva absència de transmissió. Si l'al·lel analitzat es transmet significativament més sovint del que és esperat sota el model mendelià, aquest al·lel (o algun altre estretament lligat) pot predisposar per a la malaltia. Si l'associació es produeix per un dèficit de transmissions de l'al·lel analitzat, aquest (o un altre en desequilibri de lligament) pot constituir un factor de protecció enfront la malaltia.

La primera forma descrita del TDT només permetia analitzar marcadors bial·lèlics, però més endavant s'han fet adaptacions que permeten l'ús de marcadors altament polimòrfics. Sham i Curtis (1995) van dissenyar l'ampliació del TDT per marcadors multial·lèlics i, posteriorment, s'han presentat noves aproximacions al test TDT que permeten l'anàlisi de múltiples marcadors lligats, considerant els haplotips com al·lells d'un marcador (Clayton i Jones, 1999), i la reconstrucció dels genotips dels progenitors absents, per probabilitats, amb la informació dels altres

membres de la família (Clayton, 1999). Totes aquestes modificacions del test TDT han estat implementades al programa TRANSMIT, dissenyat pel Dr. David Clayton, del Cambridge Institute for Medical Research (<http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/>).

POBLAMENT HUMÀ DE LA MEDITERRÀNIA

La variabilitat humana actual en general, i la variabilitat genètica en particular, ha estat modulada per factors molt diferents. D'una banda, i tal com hem vist al capítol anterior, diferents factors de pressió selectiva, com poden ser les malalties, l'ambient climàtic, la dieta, etc., han anat influint en aquest patrimoni genètic al llarg del temps i de la geografia. A més, la variabilitat presentada per les diferents poblacions humanes actuals ha estat afectada per les seves històries demogràfiques. Migracions, expansions o processos d'aïllament han contribuït a la diversitat genètica actual dels grups humans. La comprensió d'aquests processos del passat pot ajudar-nos a entendre la distribució geogràfica que trobem en aquesta diversitat.

Aquest capítol pretén fer una breu referència a la història i als estudis de genètica de poblacions humanes de la regió mediterrània, per tal de contextualitzar les anàlisis poblacionals realitzades en aquest treball. Aquesta aproximació s'ha realitzat amb un especial èmfasi a la vessant Occidental d'aquesta àrea geogràfica, que és la que inclou les mostres humanes analitzades en el present treball.

MARC HISTÒRIC

La mar Mediterrània i la seva zona d'influència han estat el marc de nombrosos esdeveniments poblacionals remarcables. Grans moviments demogràfics associats a revolucions tecnològiques i a la formació de grans civilitzacions han tingut lloc en aquesta regió i han deixat el seu rastre en l'arqueologia, però també en el patrimoni genètic de les poblacions actuals.

El **Neolític** pot considerar-se com el primer gran esdeveniment migratori de la història més recent de les poblacions euroasiàtiques actuals. Va començar fa uns 10000 anys al Pròxim Orient i d'allà es va anar estenent per la resta del planeta, arribant a Europa fa uns 7000-8000 anys. L'expansió del Neolític en aquest continent es va fer, molt probablement, tant per via terrestre com marítima. Així, per exemple, trobem la ràpida difusió de tècniques com la ceràmica gravada cardial des de les costes de l'Adriàtic fins a Portugal al llarg de la costa

mediterrània. A la riba sud, al Nord d'Àfrica les restes d'aquesta època també inclouen ceràmica gravada, però amb d'altres tècniques.

Posteriorment a l'agricultura i la ramaderia, apareixen les tecnologies de l'ús de metalls. El **Calcolític** o Edat del Coure s'inicia al Pròxim Orient fa 5000-5500 anys amb el treball del coure i l'or. A Europa, s'estén primer per Valàquia i Bulgària i, més tard, es tornen a detectar contactes poblacionals per via marítima que s'evidencien en les restes trobades a Itàlia, Còrsega, Sardenya i Sud d'Espanya. Cal destacar, dins del Calcolític, l'aparició del moviment megalític que es caracteritzava per les construccions amb grans blocs de pedra i del que es troben restes arreu de la Mediterrània (les Illes Balears, Còrsega, Nord d'Àfrica i, inclús, Orient Mitjà).

L'**Edat del Bronze** s'inicia fa uns 4500 anys a Orient Mitjà. L'illa de Creta juga un paper fonamental en la dispersió d'aquesta tecnologia cap a tota l'Europa Occidental, paper que posteriorment assumeix Micenes, quan Creta perd la seva hegemonia. És en aquesta època en la que es comencen a detectar importants fluxos de comerç al llarg de tota la Mediterrània, tant de recursos agrícoles com miners. A les illes de la Mediterrània Occidental apareixen poblats fortificats amb torres de planta circular com els talaiots de Mallorca, els *nuraghes* de Sardenya o les torres megalítiques de Còrsega, totes elles entre 2300 i 3500 anys abans del present. Paral·lelament, al Centre i Nord d'Europa, incloent la part nord de la Península Ibèrica, es desenvolupa la cultura dels Camps d'Urnes, associada a l'expansió dels pobles protoceltes.

Cap al 1200 a.C., la caiguda de l'imperi micènic, que havia dominat la Mediterrània Oriental, permet l'apogeu dels fenicis. Els fenicis, organitzats en ciutats-estat independents com Tir, Sidon, Arados o Biblos, controlen el comerç a tota la Mediterrània fins a la seva caiguda davant la influència assíria durant els segles VIII-VI a.C. Cartago, fundada al Nord d'Àfrica l'any 814 a.C. per habitants de Tir, passa a controlar l'Oest de la Mediterrània amb una xarxa de ports comercials estesos pel Sud de la Península Ibèrica, les Balears, Sardenya, Còrsega, Sicília i el Nord d'Àfrica.

L'**Edat del Ferro** a Europa comença fa uns 2800 anys com a herència de les cultures de camps d'urnes, amb abundants restes a Bòsnia, Croàcia, Alemanya i Nord de la Península Ibèrica. És en aquesta edat on trobem l'expansió dels pobles genets

(escites, cimeris i tracis) a la zona central i oriental del continent europeu, i els primers indicis de la cultura íbera a la Península Ibèrica (cap al s. VII a.C.).

L'anomenada **segona Edat del Ferro** sorgeix a Europa a partir del 450 a.C. associat a les invasions de pobles celtes indoeuropeus que sorgeixen del Sud d'Alemanya. Aquestes invasions, produïdes en diferents onades, s'estenen fins a la Península Itàlica, França, els Balcans i la Península Ibèrica.

Aquest és el context històric i poblacional que ens descriuen les restes arqueològiques, i a partir d'aquest moment apareixen les primeres cròniques escrites, una nova font d'informació sobre els pobles i la seva posterior història.

Circumscriuint-nos més detalladament al cas de la Mediterrània Occidental, les dades disponibles semblen indicar que la Península Ibèrica estava habitada principalment per dos pobles: celtes i íbers. Els íbers estaven influenciats pel contacte amb fenicis, grecs i cartaginesos, i es situaven al llarg de la costa mediterrània de la Península Ibèrica, arribant en el seu esplendor (al s. VI a.C.) fins al Llenguadoc. Els celtes tenien una clara influència indoeuropea i habitaven el centre i nord peninsulars. Dels contactes entre tots dos grups, van aparèixer els celtíbers, amb elements de les dues cultures anteriors.

En aquesta època, al Nord d'Àfrica es troben societats que havien quedat relativament aïllades de la resta del continent africà per la formació del desert del Sàhara fa uns 3000-4000 anys. Aquest aïllament, òbviament, no va ser complet i s'evidencien contactes amb l'Àfrica Sud-sahariana a través de les rutes per la costa i pels oasis. Per l'extrem nord, diferents moviments posen en contacte poblacions de les dues ribes de la Mediterrània que s'accentuen amb l'hegemonia marítima que exerceixen primer els fenicis i més endavant els cartaginesos.

L'any 750 a.C. es funda Roma, que amb la seva progressiva expansió arriba a controlar un vast imperi organitzat al voltant d'aquest mar (*Mare Nostrum*). Amb la derrota dels cartaginesos a les guerres púniques, l'Imperi Romà controla ràpidament la Mediterrània Occidental i s'expansiona cap a la riba oriental i el Centre i Nord d'Europa (figura I.3)



Figura 1.3. Extensió de l'Imperi Romà. En color clar es mostra l'extensió màxima de l'imperi (corresponent al període 98-117 d.C.). Modificat a partir de <http://www.theart.com.br>.

La caiguda de l'Imperi Romà d'Occident va anar associada a les **invasions de pobles germànics**. Aquests pobles són originaris del Nord d'Alemanya i Dinamarca i, en diferents onades, substitueixen les restes de l'Imperi Romà per regnes germànics independents. Així, per exemple, llombards, ostrogots i hugonots instal·len regnes a la Península Itàlica. Els vàndals controlen algunes de les grans illes de la Mediterrània Occidental i, l'any 409, atravesen la Península Ibèrica i instal·len un regne vàndal al Nord d'Àfrica (del 429 al 507 d.C.). Darrera els vàndals, els visigots penetren a la Península Ibèrica l'any 416 d.C. i hi instal·len un regnat relativament estable fins a la invasió àrab.

La **invasió àrab** del Nord d'Àfrica i de la Península Ibèrica ha estat un dels últims grans esdeveniments migratoris que pot haver contribuït a la configuració genètica actual dels pobles de la Mediterrània Occidental. Hi ha indicis de l'existència de grups de cultura àrab al desert de Síria i de la Península Aràbiga al s. IX a.C. que posteriorment es van estendre cap a Egipte i Mesopotàmia, tot i que la gran expansió d'aquest poble no es produeix fins al sorgiment de l'Islam com a religió. L'any 632 d.C., mor Mahoma deixant un imperi que domina tota la Península Aràbiga i d'allà s'expandeix cap al Nord d'Àfrica, conquerint el Magrib berber entre el 647 i el 700 d.C. Entre els anys 711 i 713, controla la pràctica totalitat de la

Península Ibèrica (amb l'excepció de les serres càntabres i del Pirineu Occidental) i instal·len un emirat dependent de la cort de Damasc.

Aquesta dominació àrab de la Península és protagonitzada per unes èlits àrabs que comanden un contingent de tropes formades fonamentalment per berbers islamitzats, que arriben a exercir la seva hegemonia en algunes zones de la Península fins l'any 1492. Durant aquest període de més de 750 anys, comparteixen el mateix territori els anteriors habitants d'herència romana i visigòtica amb grups d'àrabs i berbers. Els primers conformaven la majoria de la població i alguns van islamitzar-se (muladí), mentre que molts van continuar sent cristians (mossàrabs). A aquests grups cal afegir grups de jueus (nombrosos des de l'època visigòtica) i petits grups de soldats i esclaus d'origen sud-saharià.

Els contactes entre banda i banda de l'estret de Gibraltar van anar-se succeint, amb diferents expansions des del Nord d'Àfrica com la dels Almoràvides (s. XI) i la dels Almohades (s. XII). A més, també cal destacar les invasions sarraïnes que, des del Nord d'Àfrica, van controlar bona part de la mar Mediterrània, arribant a conquerir territoris de la Itàlia peninsular, Còrsega i Sardenya durant els segles IX i X.

GENÈTICA DE POBLACIONS HUMANES A LA MEDITERRÀNIA

Aquest és el marc en el que es situa el poblament humà de la Mediterrània a partir de les informacions que han estat aportades per arqueòlegs i historiadors. La biologia, i en concret la genètica de poblacions humanes, poden aportar noves dades que ajudin a explicar com va poder succeir aquest poblament. Les expansions culturals i les conquestes territorials, eren processos de substitució cultural o de substitució demogràfica? Com han estat d'intensos, a nivell genètic, aquests contactes poblacionals? Malgrat que els primers estudis de genètica de poblacions humanes ja van començar a analitzar la Mediterrània com una regió d'especial interès antropològic, a l'actualitat continuen havent-hi moltes preguntes encara per respondre.

D'una banda, encara continua oberta la discussió sobre com es va produir la difusió de la tecnologia del Neolític. A l'actualitat, hi ha dos models principals que intenten explicar aquest procés: la difusió dèmica i la difusió cultural. El model de **difusió dèmica** considera que l'expansió del Neolític es va produir en migracions

progressives de grups agricultors des del Pròxim Orient que van substituir els grups preexistents. D'altra banda, la **difusió cultural** postula que l'intercanvi i assimilació de les noves tecnologies entre grups veïns va ser el principal vehicle de difusió, sense moviments substancials de poblacions.

L'any 1994, Cavalli-Sforza i col·laboradors van analitzar la variació de marcadors clàssics com els grups sanguinis o els enzims eritrocitaris, juntament amb datacions arqueològiques dels principals jaciments neolítics i van postular que l'expansió del Neolític s'havia produït segons el model anomenat de difusió dèmica. L'aparició de posteriors estudis realitzats sobre els llinatges del DNA mitocondrial (mtDNA) i del cromosoma Y han aportat resultats contradictoris sobre quin pot haver estat el model més plausible depenent de com s'analitzen les dades i quines són les assumpcions que es realitzen (com a exemples, Torroni et al., 2001; Richards, 2003; Semino et al., 2000). Molt probablement, l'onada neolítica es va produir per algun tipus de model intermig en què la substitució poblacional va ser més intensa al sud-est i centre d'Europa i la difusió cultural més important a l'extrem occidental.

Al Nord d'Àfrica, també s'ha debatut com s'ha donat aquest procés de neolització. Segons la majoria d'estudis, la difusió del Neolític es va donar en un procés paral·lel al detectat a la riba nord del Mediterrani en què els moviments poblacionals des del Pròxim Orient potser van ser importants en la part més oriental, però més aviat escassos a l'extrem occidental, on la difusió cultural hauria estat el principal factor d'expansió (Bosch et al., 1997; Flores et al., 2000; Esteban et al., 2004). Aquests resultats, juntament amb d'altres estudis semblen indicar una relativa discontinuïtat genètica entre les poblacions del nord-oest africà (Marroc, Algèria i Tuníssia) i les del nord-est (Líbia i Egipte) que podria relacionar-se amb la invasió àrab del s.VII d.C. (Harich et al., 2002; Bosch et al., 2000). Així, aquesta islamització del Magrib hauria estat fonamentalment cultural a l'extrem occidental i més demogràfica a l'extrem oriental.

Un altre tema d'ampli debat científic és el del grau de **flux genètic a través de l'estret de Gibraltar**. A nivell geogràfic, és evident que el Nord d'Àfrica es troba situat en paral·lel a dues potencials barreres geogràfiques: el Mediterrani al nord i el desert del Sàhara al sud. Al llarg de la història, han estat nombrosos els

moviments humans que han mostrat la permeabilitat d'aquestes possibles barreres, però fins a quin punt aquests contactes han deixat la seva empremta genètica?

D'una banda, els estudis genètics basats en marcadors clàssics van concloure que les afinitats genètiques entre el nord i el sud de l'estret eren baixes (Bosch et al., 1997; Harich et al., 2002), mentre que els basats en el sistema HLA i en el mtDNA semblen advocar per un *pool* comú entre les poblacions de la Península Ibèrica i grups berbers del Magrib (Izaabel et al., 1998; Arnaiz-Villena et al., 2002; Plaza et al., 2003).

Cal destacar que aquesta presència/absència destacable de flux genètic a través de l'estret de Gibraltar va alternant-se en diferents estudis, tot i que alguns d'ells utilitzen el mateix tipus de marcadors. Així, per exemple, l'anàlisi d'haplotips *Alu*/STR al *locus* CD4 ha revelat un flux genètic important des de poblacions sud-saharianes al Nord d'Àfrica, però les conclusions sobre el fluxe a través de l'estret difereixen entre els estudis (Flores et al., 2000; Esteban et al., 2004). Un altre exemple és l'aportat per dos estudis que analitzen bateries de polimorfismes *Alu* en poblacions nord-africanes i ibèriques, i que extreuen conclusions relativament oposades sobre la permeabilitat de l'estret tal com pot veure's resumit en la figura 1.4 (Comas et al., 2000; González-Pérez et al., 2003). Mentre que els resultats de Comas i col·laboradors indiquen l'existència d'una barrera genètica consistent a l'estret de Gibraltar, l'estudi de González-Pérez et al. no detecta aquesta barrera i troba una major consistència amb un patró de diferenciació per distància geogràfica.

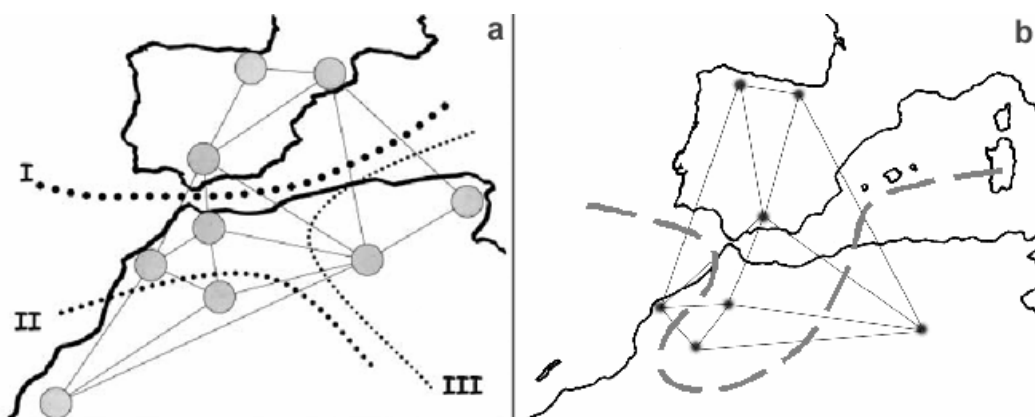


Figura 1.4. Anàlisi de barreres genètiques al Mediterrani Occidental a partir de la determinació d'una sèrie de polimorfismes *Alu*. Modificat a partir de Comas et al., 2000 (a) i de González-Pérez et al., 2003 (b).

Els estudis de genètica de poblacions humanes s'han caracteritzat també per una anàlisi detinguda de certes poblacions que han mostrat una variabilitat genètica peculiar. Aquestes poblacions solen correspondre a grups amb una història particular que ha propiciat l'acció de processos d'aïllament i deriva genètica (com els exemples típics dels bascos o els saami). D'entre aquests aïllats poblacionals val la pena destacar el cas dels **sards**. Les primeres restes documentant presència humana a Sardenya han estat datades en gairebé 9000 anys. Pobles de cultura nuràgica van habitar l'illa i els contactes costaners van anar-se establint amb grecs, fenicis i cartaginesos. L'ocupació de Sardenya per l'Imperi Romà (238 a.C.) va forçar el desplaçament de part dels seus habitants cap a les zones muntanyoses de l'interior de l'illa, on el control de l'imperi mai va establir-se. És aquesta regió interior la que, encara en l'actualitat, s'ha conservat més aïllada tant lingüística com genèticament (Francalacci et al., 2003).

Existeix un marcat aïllament de les poblacions sardes, que s'ha evidenciat en nombrosos estudis de genètica de poblacions (Morelli et al., 2000; Francalacci et al., 2003), motiu pel qual també ha estat una població d'interès en l'estudi de malalties complexes (Eaves et al., 2000; Angius et al., 2001). Tot i aquest aïllament, també s'han detectat evidències que indiquen contactes amb poblacions de la Península Ibèrica (Cao et al., 1989).

CARDIOPATIA ISQUÈMICA

L'espectre de malalties complexes que afecten els grups humans abarca un immens ventall de patologies diferents, que impliquen alhora un gran nombre de sistemes fisiològics diferents. D'entre les més importants, tant pel nombre de patologies diferents que inclouen com per la importància poblacional que tenen, destaquen les malalties cardiovasculars o malalties del sistema circulatori i dins d'aquestes, destaca la cardiopatia isquèmica.

DEFINICIÓ DE LA MALALTIA

La cardiopatia isquèmica (CAI) és una malaltia que s'inclou en les "malalties del sistema circulatori" tal com recull la 10^a Revisió de la *Classificació Internacional de Malalties*, en la versió de l'any 2003 (consultable *online* a l'adreça <http://www3.who.int/icd/vol1htm2003/fr-icd.htm>). Les malalties del sistema circulatori corresponen a la categoria IX dins de la classificació i agrupa una gran quantitat de patologies diferents categoritzades pels codis I00 a I99. D'aquests codis, les cardiopaties isquèmiques (en anglès, *ischaemic heart diseases*) corresponen els codis I20 a I25. En la classificació del MedDRA 8.0 (*Medical Dictionary for Regulatory Activities*), la CAI és classificada amb el LLT 10023024 dins del gran grup dels "trastorns cardíacs" (SOC primari 10007541)

Aquesta patologia té un origen ateroscleròtic, que afecta les artèries coronàries. Aquest procés, segons els vasos que afecti pot produir diferents manifestacions clíniques (figura I.5). Si les afectades són artèries perifèriques o l'aorta, estarem davant d'una malaltia vascular perifèrica, i si s'afecten artèries caròtides, cerebrals o basilar, es produirà una malaltia cerebrovascular isquèmica (comunment coneguda com embòlia).

L'**aterosclerosi** es defineix com una lesió de l'arbre arterial localitzat, en gran part, dins de la capa íntima de la paret arterial. En aquesta lesió participen diversos tipus cel·lulars (entre els que cal destacar macròfags reclutats del corrent circulatori i cèl·lules musculars llises provinents de la capa mitja del vas), acúmuls de lípids, diferents macromol·lècules i elements generats en els processos de necrosi cel·lular que es produeixen a la lesió. No s'han de confondre els termes

aterosclerosi (del grec *atero* = lípids i *sclero* = dur) i **arteriosclerosi** (del grec *arterio* = artèria i *sclero* = dur), encara que molt sovint siguin emprats indiferentment. Arteriosclerosi és un terme que inclou totes aquelles lesions en què es produeix un engruiximent de la paret vascular, indiferentment de quin sigui el causant d'aquest engruiximent. Així, l'aterosclerosi no és sinò un tipus d'arteriosclerosi consistent en una coberta de teixit conjuntiu en l'interior de la qual proliferen cèl·lules musculars llises. El prefixe *atero* s'utilitza per destacar la presència d'acúmuls lipídics i productes de necrosi.

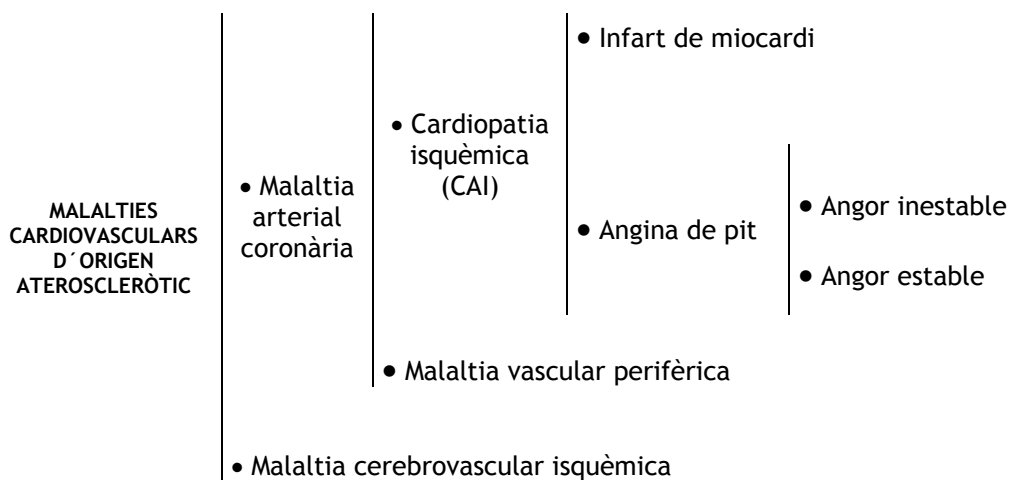


Figura 1.5. Classificació de les malalties d'origen ateroscleròtic.

La **cardiopatia isquèmica (CAI)** es defineix estrictament com la isquèmia del miocardi, és a dir, la mancança (total o parcial) d'aport d'oxigen a la musculatura que constitueix el miocardi. Aquesta alteració és provocada per una disminució del fluxe sanguini a les artèries coronàries i sol ser la conseqüència de lesions ateroscleròtiques, encara que, rarament, també pot estar causada per espasme o arteritis de les mateixes artèries. L'infart agut de miocardi i l'angina de pit són les dues manifestacions clíniques principals de la CAI.

Infart de miocardi és el nom que rep la necrosi aguda del miocardi d'origen isquèmic i que generalment està causada per l'obstrucció trombòtica d'una artèria coronària. El quadre clínic es caracteritza per:

- Dolor, similar al de l'angina de pit, però de més intensitat i duració, no manté correlació amb l'extensió de la necrosi i no respon a l'administració

de nitroglicerina sublingual. Sol venir acompanyat per nàusees, vòmits, sudoració freda, sensació de mort imminent, angúnia i debilitat.

- Necrosi isquèmica del miocardi. La zona necrotitzada pot abarcar tot l'espessor de la paret (infart transmural) o pot estar limitat al terç o meitat interna de la paret (infart subendocàrdic o no transmural).
- Oclusió de l'artèria coronària que irriga la zona infartada mitjançant un trombe fresc de 2 a 3 cm de diàmetre. Aquest trombe es troba adherit a una lesió ateromatosa obstructiva que mostra lesions agudes com fissuració, trencament de l'íntima i hemorràgies.
- Presència d'un quart soroll en l'auscultació acompanyat per una davallada de la intensitat dels altres sorolls.
- Alteracions a l'electrocardiograma, que afecten al segment ST i a les ones Q.
- Increment dels nivells plasmàtics d'enzims alliberats al torrent circulatori per la zona del miocardi afectada per la necrosi. Entre aquests enzims destaquen la creatinquinasa (CK), la transaminasa glutàmicoxalacètica (ASAT) i la deshidrogenasa làctica (LDH).

Durant els primers dies es poden presentar una sèrie de complicacions que fan que l'infart de miocardi presenti una mortalitat d'entre el 20 i el 50% (complicacions elèctriques i mecàniques, insuficiència cardíaca, trencament del miocardi, aneurisme o dilatació circumscrita a la zona necròtica). En els 6 mesos posteriors a l'infart la mortalitat és del 10%, estabilitzant-se posteriorment fins a un 3 a 4% anual. L'evolució a llarg plaç depèn del grau de disfunció ventricular, nombre d'artèries afectades i presència d'arrítmies ventriculars greus.

El terme **angina de pit** designa un concepte exclusivament clínic definit per les sensacions de dolor, opresió o malestar toràcic que es poden atribuir a una isquèmia transitòria del miocardi. Aquesta pot venir causada per un increment en el consum d'oxigen per part del miocardi d'un individu, afectat per lesions ateroscleròtiques prèvies, com a conseqüència d'una emoció intensa o de la realització d'un esforç físic que comporta un increment de la pressió arterial o del ritme cardíac. Els trets necessaris per diagnosticar aquesta patologia es resumeixen en:

- Presència de dolor a la regió retrosternal o bé en tota la part anterior del tòrax que es pot irradiar cap als braços, coll o mandíbula i que, fins i tot,

pot localitzar-se únicament a aquestes últimes zones o als canells; pot tenir una durada de 1-30 minuts. Aquest dolor sol desaparèixer al finalitzar l'activitat que el va provocar o per l'administració de nitroglicerina sublingual en situació de repòs.

- Frequent aparició d'un tercer i quart sorolls en l'auscultació i desdoblament del segon soroll, podent aparèixer els anomenats bufs sistòlics d'insuficiència mitral.
- Alteracions de l'electrocardiograma que afecten al segment ST. En absència de dolor quasi la meitat dels pacients presenten electrocardiogrames normals.
- Resultats positius en proves d'esforç i proves isotòpiques.
- Presència d'alguna estenosi en el tronc comú o en alguna de les artèries coronàries. Aquesta estenosi ha d'ésser de més del 50% per considerar-se clínicament significativa.

Donada la multiplicitat de formes sota les quals pot presentar-se i evolucionar l'angina de pit, el seu diagnòstic pot ser concretat en base a l'evolució del dolor en el temps. Així, l'angina pot ser estable (o crònica) o inestable (o evolutiva).

L'angina de pit és la forma inicial més freqüent de la cardiopatia coronària (45% dels afectats), li segueixen l'infart de miocardi en un 42% i la mort súbita en un 13%.

FISIOPATOLOGIA

En el desenvolupament i progressió de les lesions ateroscleròtiques es pot apreciar l'entrada contínua de monòcits/macròfags en la lesió, així com proliferació de macròfags i cèl·lules musculars llises. Paral·lelament, aquest darrer tipus cel·lular genera una extensa matriu de teixit conjuntiu fibrós. A més, s'observa dipòsit intracel·lular i extracel·lular de lípids, especialment en forma de colesterol lliure i esterificat. Aquest procés té lloc, sobretot, a les artèries de calibre mitjà, com les coronàries, caròtides, renals, basilar, cerebrals i també a l'aorta, així com a les artèries ilíacques i femorals.

S'han elaborat diverses hipòtesis per explicar aquest conjunt de fenòmens i, per tant, l'origen de la malaltia. En l'actualitat la hipòtesi més acceptada és l'anomenada **hipòtesi de resposta a lesió**. Aquesta hipòtesi va ser formulada per

Ross i Glomset (1973) i es fonamentava en què alguna forma de lesió en l'endoteli arterial jugava un paper fonamental en el desenvolupament de l'aterosclerosi. Aquesta hipòtesi, la idea central de la qual ja havia estat formulada per Virchow (1856), ha patit en els darrers 20 anys nombroses modificacions.

L'endoteli és la capa de l'artèria que sembla jugar un paper més important en l'inici del procés ateroscleròtic. Aquest epitel·li especialitzat revesteix l'interior dels vasos sanguinis i té funcions molt importants:

- a) manté l'equilibri dinàmic trombotic-antitrombotic podent segregar antiagregants plaquetaris i molècules que inhibeixen les cascades de coagulació o desencadenar una resposta protrombotic activa;
- b) impedeix l'adhesió de leucòcits i trombòcits;
- c) constitueix una barrera de permeabilitat que controla l'intercanvi de substàncies entre la sang i els teixits;
- d) controla el to arterial mitjançant la formació de substàncies vasodilatadores o vasoconstrictores, com òxid nítric (NO), prostaciclina o endotelina;
- e) sintetitza i segrega citoquines i molècules estimulants i inhibidores del creixement cel·lular;
- f) intervé en la formació i manteniment del col·lagen i del proteoglicà que formen la membrana basal sobre la que descansen les cèl·lules endotelials.

L'any 1987, Mora i col·laboradors van demostrar que tots els factors de risc coneguts per a l'aterosclerosi afecten de forma directa o indirecta tant les cèl·lules endotelials com les cèl·lules de múscul llis de les capes íntima i mitja arterials. Així, i segons la hipòtesi de resposta a lesió, en el desenvolupament d'una lesió ateroscleròtica tindrien lloc de manera consecutiva els següents processos fisiològics (resumits en la figura 1.6):

1. **Lesió en l'endoteli vascular.** En determinades circumstàncies pot produir-se una lesió a l'endoteli, caracteritzada per la formació d'una mono o bicapa de plaquetes sense arribar a constituir un trombe. Aquestes lesions tendeixen a produir-se en les bifurcacions i en les vies del fluxe de sortida, que són els llocs on la turbulència és màxima, i es veuen estimulades per determinats factors metabòlics (hiperlipidèmia), mecànics (hipertensió), immunològics (immunocomplexes) o químics (monòxid de carboni).

- 2. Acúmulo de lípids i monòcits per sota de l'endoteli.** La lesió inicial provoca un increment de la permeabilitat de la paret arterial als lípids i diverses proteïnes plasmàtiques (p. ex. albúmina, fibrinogen i Apo B), així com un augment en l'adhesió i permeabilitat de monòcits i limfòcits T circulants. El transport de LDLs a través de l'endoteli augmenta, patint una gran part d'elles modificacions per oxidació o glicosilació (especialment en situacions de glucèmia elevada com la diabetes). Aquests dos processos contribueixen a la formació de radicals lliures a partir de les LDLs donant lloc a LDLox, que tenen efecte tòxic i possiblement lesionin l'endoteli i les cèl·lules musculars llises adjacents. Aquest fet provoca una resposta inflamatòria que inicia l'adherència d'agregats de monòcits i limfòcits que migren cap a l'interior de la paret arterial. Aquesta adhesió i migració és possible perquè les LDLox indueixen a les cèl·lules endotelials a expressar molècules d'adhesió a leucòcits. D'altres molècules quimiotàctiques i adhesives són produïdes per les plaquetes que s'havien dipositat en la lesió arterial en agregar-se i formar microtrombes.
- 3. Resposta inflamatòria i proliferació cel·lular.** Els monòcits que han entrat a dins de la lesió s'activen a macròfags i expressen gens de citoquines i molècules estimuladores i inhibidores del creixement (PDGF, IL-1, TNF- α , etc.). Aquestes substàncies poden estimular a les cèl·lules de múscul llis a canviar de fenotip passant a ser cèl·lules que migrin i proliferin. A més, els macròfags actuen com a cèl·lules depuradores endocitant LDLox a través de receptors de LDLox o receptors *scavenger*, transformant-se en cèl·lules escumoses amb un alt contingut lipídic intracel·lular.
- 4. Resposta fibroproliferativa.** La concentració de cèl·lules pot anar creixent amb el temps. Els macròfags, que han estat endocitant LDLox i restes derivades de la mort cel·lular, poden retornar al torrent sanguini per tal d'eliminar, en els centres del sistema mononuclear fagocític, tot el material fagocitat. Aquest retorn al torrent circulatori el fan entre les cèl·lules endotelials suprajacents podent provocar la formació de trombes murals per agregació plaquetària, quan es dona en branques i bifurcacions amb fluxe sanguini irregular. Aquestes plaquetes poden arribar a trencar el macròfag i alliberar el seu contingut al torrent sanguini. A més, en produir molècules d'adhesió per intentar reparar la lesió, poden establir xarxes intercel·lulars enllaçant macròfags, limfòcits T, cèl·lules de musculatura llisa i cèl·lules

endotelials. Aquesta resposta inflamatòria especialitzada i crònica pot establir-se, i fins i tot reduir-se, si s'eliminen els agents nocius o intervenen factors protectors que inverteixin el procés inflamatori.

Si la inflamació persisteix i provoca un efecte tòxic en l'artèria, sobretot quan intervenen crònicament factors genètics o ambientals de risc, es genera una resposta fibroproliferativa per recobrir la lesió, que esdevé fibrosa. Malgrat que la resposta inflamatòria i fibroproliferativa està dissenyada per protegir (i en molts casos pot establir la lesió), pot culminar en una lesió oclusiva amb conseqüències clíniques desastroses.

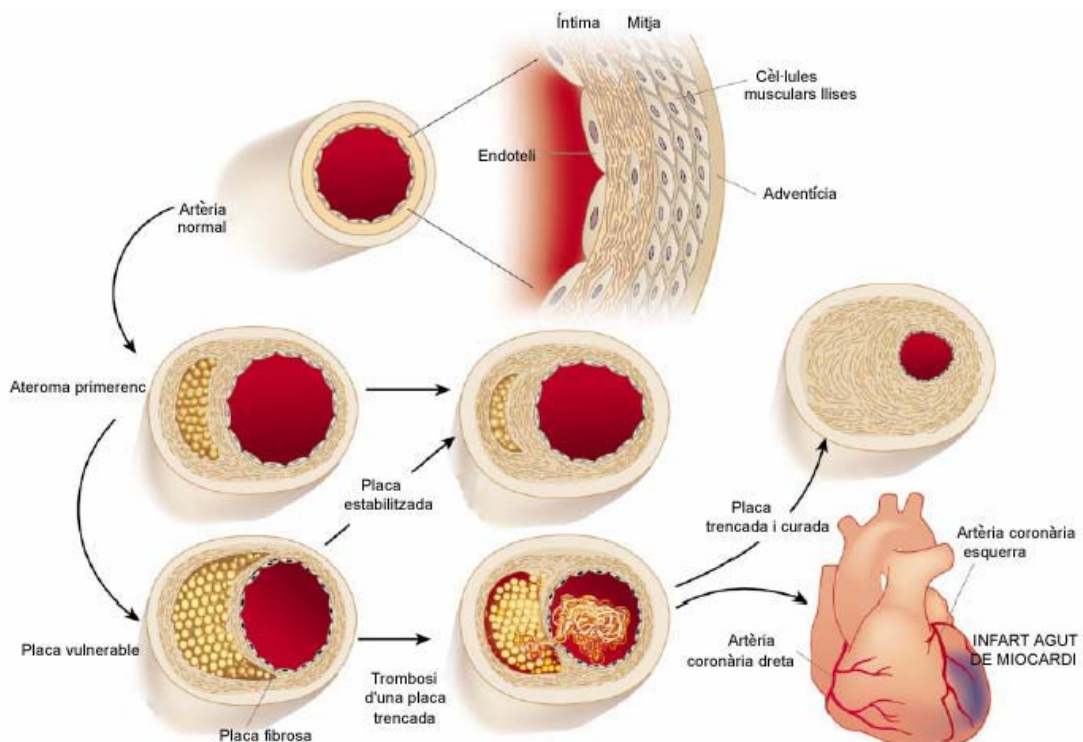


Figura 1.6. Evolució d'una placa d'aterosclerosi. Modificat a partir de Libby (2002).

FACTORS DE RISC

Un **factor de risc** és qualsevol característica o tret mesurable d'un individu que prediu la probabilitat individual de manifestar clínicament una malaltia. La CAI és una malaltia complexa en la que, conceptualment, podem considerar dos grans grups de factors de risc: els **factores ambientals** i els **factores genètics**.

A partir dels anys cinquanta es van iniciar una sèrie d'estudis epidemiològics de gran abast per tal de quantificar el paper real que jugaven els factors de risc en la malaltia i quantificar la magnitud del seu efecte sobre la mortalitat. D'entre aquests grans estudis, cal destacar el *Framingham Study* (Kannel et al.1988), el *Seven Countries Study* (Keys et al. 1986) i el *MONICA* (WHO-MONICA, 1988).

Els factors ambientals es troben molt millor clarificats que no pas els genètics. Només en el cas de patologies hereditàries que influeixen clarament en el desenvolupament de la CAI es pot parlar de gens causants (per exemple la hipercolesterolèmia familiar). Malgrat tot, en la majoria dels casos es desconeix la base genètica del risc i el possible mecanisme d'actuació. Probablement el risc genètic es deu a la interacció de molts gens, i dels seus productes, alguns d'ells encara per descobrir (com a revisió, consulteu Grant (2003)).

Una altra aproximació a la classificació dels factors de risc té en compte la capacitat de poder modificar-los i d'aquesta manera poder atenuar les manifestacions clíniques de la CAI. Aquest enfocament, emprat sobretot en les polítiques de prevenció, classifica els factors en **potencialment modificables** i **no modificables** (edat, sexe i antecedents familiars).

A continuació es descriuen els principals factors de risc per la CAI, en funció de la seva importància relativa associada al desenvolupament de la malaltia:

1. **Edat.** La incidència en la CAI comença a augmentar als 35-44 anys en homes i als 45-54 en dones. A partir d'aquest moment, va incrementant progressivament al llarg de tota la vida (Kannel et al., 1988).
2. **Sexe.** El sexe masculí presenta una major predisposició clara per la CAI. Aquest fet s'atribueix al suposat paper protector dels estrògens, i explicaria la desaparició de les diferències sexuals quan les dones han entrat en la menopausa. A Espanya el risc relatiu s'aproxima a 3.

3. **Antecedents familiars.** És un indicador indirecte dels factors genètics implicats en la malaltia. Un historial familiar de cardiopatia isquèmica, especialment en edats precoces, és un element important de predicció del risc.

4. **Tabaquisme.** L'hàbit de fumar incrementa el risc de patir qualsevol de les manifestacions clíniques de la CAI excepte l'angina de pit. Aquest risc es dona tant en homes com en dones i augmenta en funció de la quantitat de cigarrets fumats (fins a 4,8 en homes i 7 en dones). En dones, el risc relatiu augmenta fins a 39 si, a més, prenen anticonceptius orals. El mecanisme proposat per aquesta associació és divers ja que fumar disminueix el nivell d'HDL-C i augmenta l'agregabilitat plaquetària i la carboxihemoglobina, entre d'altres factors. Aquest efecte reverteix en deixar l'hàbit de fumar.

5. **Dieta.** La relació dieta-CAI ve donada directament per la relació que hi ha entre dieta i nivells de colesterol plasmàtics en les seves diferents formes (encara que el 50% de la variabilitat en els nivells de colesterol té component hereditària). Els components de la dieta que més influeixen en els lípids plasmàtics són: els àcids grassos (diferenciant entre saturats, mono i poliinsaturats) i l'alcohol (Keys et al. 1986; Hegsted i Ausmann, 1988).

6.- **Estrès.** S'ha establert una associació entre la CAI i l'estrès entès com un estat psíquic mantingut en el temps de tensió nerviosa i ansietat. Dins de la complexitat que suposa la definició i mesura d'aquest factor, s'han establert riscos relatius de 2 (per malalties coronàries) i de 3 (per angina de pit) en dones amb personalitat de tipus "A", entesa aquesta com agressivitat, ambició, competitivitat i sensació d'urgència (Haynes et al., 1980).

7. **Anticonceptius orals.** Els anticonceptius orals augmenten 2-3 cops el risc de patir CAI, però aquest risc augmenta molt més si la dona és fumadora, hipertensa o té nivells elevats de colesterol.

8. **Hipertensió.** La hipertensió és un factor risc clau per la CAI, i encara més per la malaltia cerebrovascular, amb un risc relatiu de 2,56. El motiu causal se suposa que és la hiperplàsia de la musculatura vascular llisa i les lesions induïdes a les cèl.lules endotelials (Lusis et al., 2004).

9. **Colesterol en sèrum.** Tal com s'ha dit, el 50% de la variabilitat interindividual en els nivells de colesterol plasmàtic té causes genètiques. L'altre 50% ve donat per causes ambientals (bàsicament dieta, tabaquisme i estrès). Tanmateix, s'ha de

tenir en compte la repartició d'aquest colesterol en les dos principals lipoproteïnes que el porten: LDL i HDL. Així, mentre que l'HDL-C correlaciona negativament amb la CAI, l'LDL-C ho fa de manera positiva. Aquests dos paràmetres són independents entre si i venen influenciats per d'altres factors tant genètics com ambientals.

10. **Triglicèrids.** Donada la variabilitat al llarg del dia que hi ha en els nivells de triglicèrids circulants en sèrum, no hi ha resultats definitius sobre una possible associació. Hi ha estudis que indiquen associació positiva només en dones (per exemple l'estudi Framingham) i d'altres ho postulen pels dos sexes.

11. **Homocisteïna.** La variació normal en els nivells plasmàtics d'aquest aminoàcid ha estat relacionada amb la CAI (Stampfer et al., 1992). La hiperhomocisteïnèmia és un factor de risc fàcil de controlar ja que l'administració de folat la redueix.

12. **Diabetes.** La malaltia cardiovascular és la major causa de mortalitat en diabètics. Encara que no s'ha provat que una reducció del nivell de glicèmia per si sola disminueixi el risc, cal controlar aquest paràmetre en els individus afectats per aquest transtorn conjuntament amb altres factors de risc amb els que es troba interrelacionat metabòlicament com ara l'obesitat, els nivells de lípids sanguinis i la pressió arterial que fan que la *diabetes mellitus* es trobi associada a un excés de risc per la CAI.

13. **Obesitat.** Sembla ser que l'obesitat, entesa com un sobrepès de més del 20%, confereix un risc relatiu proper a 2 per la CAI. El que no està clar és si el sobrepès n'és el motiu o, per altra banda, ho són certes anomalies metabòliques associades (diabetes, hipertensió, dislipèmies, ...). El que sí és evident és que l'obesitat suposa una sobrecàrrega hemodinàmica pel cor.

MORTALITAT PER CAI

Actualment, les malalties del sistema cardiovascular són una de les primeres causes de mortalitat a nivell mundial (WHO Mortality Database: <http://www3.who.int/whosis/menu.cfm?path=mort>). L'any 2002, aquestes patologies van provocar 16.7 milions de defuncions (un 29.34% del total). Aquesta mortalitat assoleix freqüències més elevades encara en els països desenvolupats. En el cas del continent europeu, per exemple, van ser 4.9 milions (un 51.5% del total de defuncions).

D'aquest gran espectre que suposa la categoria de “malalties cardiovasculars”, les *malalties isquèmiques del cor* (CAI) van suposar més de 7 milions de defuncions a tot el món l'any 2002.

La mortalitat per la CAI no es distribueix uniformement a nivell mundial. D'una banda, les diferències entre països desenvolupats i subdesenvolupats marquen, fins a cert punt, una distinció en els patrons de mortalitat, principalment per diferències en l'esperança de vida i en la distribució per edats. A més d'aquestes diferències, dues zones del món resalten pels seus baixos valors respecte d'altres. Es tracta dels països de la zona Mediterrània (França, Espanya, Itàlia i Grècia) i els països del centre-Est d'Àsia (Xina, Corea del Sud i Japó). Les taxes de mortalitat per malaltia coronària expressades en número de defuncions/100.000 habitants per l'any 2002 es mostren a la taula I.2. Encara que no es disposa de les taxes de mortalitat estandaritzades (expressades en funció d'una població estàndard), que són les que permeten comparacions directes entre països, es poden observar unes diferències regionals en aquesta mortalitat.

Cal destacar les baixes taxes de mortalitat sobretot en països asiàtics com Japó, Xina i Corea del Sud (tots tres estats amb taxes clarament inferiors a 100). Aquestes diferències són difícilment atribuïbles al nivell de desenvolupament del país, sobretot en el cas de Japó i Corea, i s'han proposat factors dietètics per explicar-les. El Japó, per exemple, és un gran consumidor de peix, aliment especialment ric en àcids grassos ω -3, que tenen un demostrat efecte protector per l'aterosclerosi. La Xina, per la seva banda, presenta un nivell de consum d'àcids grassos saturats dels més baixos del món.

Mentre que la majoria d'estats centre i nord-europeus presenten taxes de mortalitat per malaltia coronària al voltant de 200, els països europeus

mediterranis presenten taxes properes a 100 (excepte Itàlia i Grècia, que presenten valors intermitjos). També s'han proposat explicacions nutricionals per explicar aquestes incidències més baixes. La dieta mediterrània i el consum d'oli d'oliva (amb elevat contingut d'àcids grassos monoinsaturats) explicarien, en part, aquestes diferències tot i que caldria explicar l'anomenada *paradoxa francesa* (França té una dieta més semblant a la del centre d'Europa i consumeix poc oli d'oliva).

Aquests valors baixos es confirmen a l'altra riba del Mediterrani (a Algèria i Marroc) i en la majoria d'estats de l'Àfrica Sudsahariana. Encara que la manca de taxes estandaritzades de mortalitat no permet establir comparacions, sembla ser que aquests països presenten una menor mortalitat per aquestes malalties (Muna, 1993).

PAÍS	TAXA	PAÍS	TAXA
Espanya	109.86	Estats Units	196.76
Itàlia	161.66	Alemanya	209.57
Grècia	153.37	Regne Unit	204.05
França	77.08	Xina	58.12
Portugal	108.74	Japó	70.75
Marroc	99.54	Corea del Sud	33.34
Algèria	47.81	Camerun	60.04

Taula 1.2. Taxes brutes de mortalitat per malaltia coronària a diferents països l'any 2002. La taxa de mortalitat està expressada com a número de defuncions per 100000 habitants.

Així doncs, la dieta sembla jugar un paper important en el desenvolupament de l'aterosclerosi, tal com s'exposa en l'apartat de factors de risc per a la CAI. També és cert que aquesta variable per si sola no explica totes les diferències poblacionals existents i els factors genètics tenen també un gran interès a nivell poblacional. És probable l'existència de diferents *backgrounds* genètics protectors en determinats grups poblacionals que es superposin a les diferències ambientals. Les taxes de mortalitat cardiovascular de grups d'emigrants de poblacions de "baix risc" a poblacions d'"alt risc" augmenten amb el canvi ambiental i dietètic, però no arriben a assolir els nivells de la població receptora (Fuster et al., 1997).

HERETABILITAT DE LA CAI

La cardiopatia isquèmica presenta grans dificultats per a l'anàlisi genètica ja que és una malaltia complexa, amb múltiples components genètics i ambientals. A diferents nivells de regulació, cal presuposar la intervenció de molts gens, interaccions gen-gen, fenòmens de penetrança incompleta, interaccions gen-ambient i heterogeneïtat gènica que encara compliquen més la seva anàlisi.

L'heretabilitat de la CAI ha estat demostrada mitjançant estudis de bessons, estudis de segregació en famílies i estudis de risc relatiu en immigrants. En relació a la CAI, els principals **estudis de bessons** realitzats han estat els portats a terme en els registres del *Danish Twin Registry* i del *Swedish Twin Registry* (Harvald i Hauge, 1970; Marenberg, 1992). En aquests dos estudis es pot apreciar una major concordança per CAI entre bessons monozigòtics que entre bessons dizigòtics. Aquestes diferències, que són estadísticament significatives, són d'una major magnitud com abans es manifesti la malaltia i es mostren superiors en dones, suggerint que en aquestes els factors genètics són més importants. Malgrat tot, no tots els estudis d'aquest tipus han enregistrat aquestes diferències. És el cas del *NHLBI Twin Study* (Reed et al, 1991), on la diferència entre ambdós tipus de bessons només apareixia en considerar individus amb risc extremadament alt o baix, limitant a aquests extrems de la incidència la determinació genètica de la malaltia. Per tal de corregir la possible sobreestimació de les influències genètiques es van realitzar estudis d'adopció de bessons en els que es comparaven bessons criats conjuntament i criats per separat. Un estudi d'aquest tipus, el *Swedish Adoption/Twin Study of Aging* (Pedersen et al. 1991), va trobar correlacions genètiques similars a les citades, constatant de nou que les concordances entre bessons eren més elevades en grups més joves (de 52 a 65 anys) que en els més grans (de 66 a 86 anys).

En els **estudis de segregació familiar** s'aprecia que la CAI apareix amb major freqüència en unes famílies que en altres (existeix una agregació familiar), però no segueix un patró d'herència definit que pugui predir la seva aparició (Sing i Moll, 1990). Molts estudis han corroborat l'augment del risc relatiu en familiars d'afectats per la CAI, especialment en els casos d'aparició prematura. En base a aquest tipus d'estudis, l'heretabilitat per a la CAI s'ha pogut estimar en un 60 - 70% (Goldbourt et al, 1994).

Una participació genètica en l'etiologia de la malaltia ha estat demostrada pels **estudis de risc relatiu en immigrants**, en observar que els col·lectius d'immigrants mostren taxes d'incidència de CAI similars a les del país d'origen dels individus malgrat haver estat vivint sota les condicions de vida (nutricionals, econòmiques i socials) del país receptor durant molts anys (Groen et al. 1968; Fuster et al., 1997).

ÒXID NÍTRIC

L'òxid nítric (NO) és un metabolit gasós amb una solubilitat en medi aquós similar a la de l'oxigen. Actua com a segon missatger cel·lular en solucions fisiològiques amb un espectre d'activitats molt ampli. Endògenament, és produït per la sintasa de l'òxid nítric (NOS), que en l'espècie humana presenta tres isoformes, codificades per gens diferents.

No va ser fins als anys 80 que es va descobrir que les cèl·lules de mamífer sintetitzaven de forma endògena NO (Ignarro, 1989a), i de llavors ençà s'ha anat identificant un ventall de funcions i mecanismes de regulació diferents que van fer que molts equips de tot el món es centressin en el seu estudi. Fins i tot la revista *Science* la va fer sortir en portada amb el títol de "Molècula de l'any 1992".

Aquesta diversitat de rols pot ser exercida gràcies a les particulars característiques moleculars que presenta. Al seu orbital $2p-\pi$ antienllaçant, presenta un electró desaparellat que li dona certes propietats de radical lliure (la nomenclatura NO^\cdot és emprada moltes vegades). Aquesta característica li permet participar en reaccions de transferència d'electrons amb determinades molècules que presenten electrons desaparellats (com ara els radicals lliures). A més, la seva neutralitat de càrrega li possibilita la difusió lliure en medi aquós i a través de membranes cel·lulars.

Aquest electró desaparellat fa que les transferències d'electrons en què participa puguin ser tant cedint aquest electró com acceptant-ne un altre d'una altra molècula. Els ions formats a partir de l'oxidació (NO^+ o catió nitrosòni) o reducció (NO^- o anió nitrosil) tenen un ampli ventall de molècules diana amb les que poden reaccionar (Stamler et al, 1992). Així, les reaccions i les funcions biològiques del NO han de ser estudiades a partir de la integració de les propietats i reactivitats dels tres estats redox del NO.

Les funcions biològiques del NO, així com les molècules que li són diana, poden ser classificades en efectes directes i indirectes. Els efectes directes són aquells resultants de les reaccions directes entre el NO i molècules biològiques concretes, mentre que els indirectes seran aquells resultants de les reaccions de RNOS (*reactive nitrogen oxide species*) derivades de l'autooxidació del NO amb diverses dianes biològiques. L'avantatge de fer aquesta classificació és que la cinètica de l'autooxidació del NO queda limitada a situacions en què hi hagi concentracions de

NO molt elevades. Així, a concentracions baixes de NO predominaran els efectes directes i a concentracions elevades predominaran els indirectes. Es consideren concentracions baixes en el rang de nanomolar i concentracions elevades a escala de micromolar (Weyrich et al., 1994; Joshi et al., 1999).

És important aquesta distinció entre concentracions baixes i elevades perquè de les tres isoformes d'enzim NOS, dues són constitutives (NOS1 i NOS3) i produeixen concentracions baixes de NO, i l'altra és induïble (NOS2) i produeix concentracions elevades de NO en determinades circumstàncies.

Els **efectes directes** són principalment dos:

- Reacció amb metalls. L'òxid nítric pot reaccionar amb alguns metalls de transició per formar compostos nitrosilats. Proteïnes que contenen grups hemo (com la guanilat ciclasa o el citocrom P₄₅₀) i certs factors de transcripció (com NF-κB, c-fos o b-jun), que contenen dits de zinc per interaccionar amb el DNA, són dianes del NO i poden veure estimulada o inhibida la seva activitat. A més, el NO reacciona amb l'oxihemoglobina per formar metahemoglobina, en una reacció que es considera clau per regular els nivells de NO a nivell del torrent circulatori.
- Reaccions amb radicals lliures. Com que disposa d'un electró desaparellat, el NO reacciona ràpidament amb d'altres espècies reactives com l'hidroxil, el superòxid o diferents tipus de peròxids. Els compostos resultants d'aquestes reaccions acostumen a ser molècules oxidants menys reactives que els radicals lliures dels que provenen. Així, el NO actua com a mecanisme de detoxificació d'espècies reactives.

D'altra banda, quan les concentracions de NO són molt més elevades, es produeix l'oxidació d'aquest NO per formar RNOS. Un dels principals productes d'aquesta oxidació aeròbica és el peroxinitrit (OONO⁻).

Aquests productes són els que produeixen els **efectes indirectes**, consistents molts cops en la inhibició de diferents gens. L'afinitat d'aquests productes d'oxidació per formar complexes S-nitrosotiol fa que les proteïnes que contenen zones riques en grups tiol siguin dianes apropiades. La DNA alquiltransferasa, per exemple, conté un grup tiol al seu centre actiu i la seva activitat disminueix quan és exposada a les RNOS (Laval i Wink, 1994).

Les proteïnes que tenen zones riques en grups tiol i metalls (com les que tenen dits de zinc o les metal·lotioneïnes) són especialment sensibles a l'acció de les RNOS. Aquestes formen complexos S-nitrosotiol i afecten l'estructura de la proteïna, trencant, per exemple, els dits de zinc (fig. 1.7).

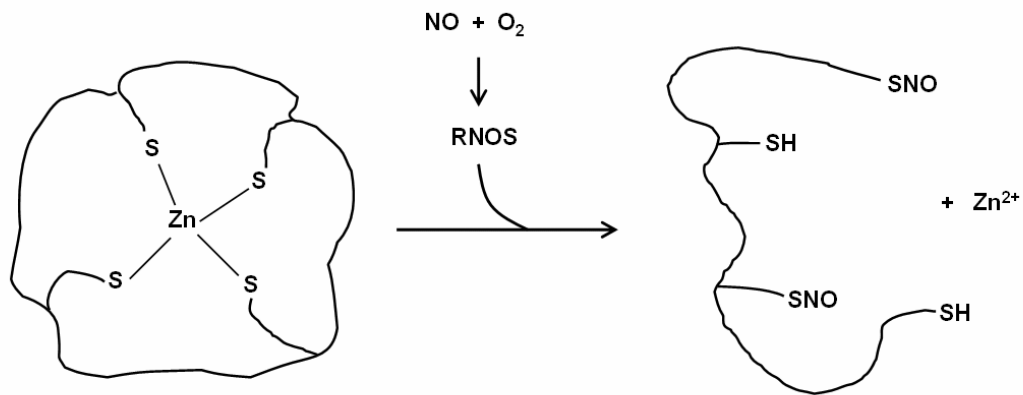


Fig. 1.7. Efecte del NO en proteïnes amb dits de zinc.

Aquest gran potencial de reactivitat tant del NO com dels seus derivats, juntament amb l'existència de tres sintases diferents que el produeixen, fa que l'òxid nítric jugui un paper molt destacat en nombrosos sistemes biològics: cardiovascular, immunitari, neurotransmissió, aparell excretor, ... A més, aquestes tres sintases regulen la seva transcripció i traducció de forma diferent i s'expressen de forma diferent en diferents teixits, fent que el rang d'activitats possibles i de vies de regulació d'aquestes activitats sigui encara més ampli i complex.

D'altra banda, aquest paper regulador pot desencadenar processos fisiopatològics. Davant determinats estímuls com la presència de bacteris gramnegatius, endotoxines o citokines proinflamatòries, pot produir-se una sobreproducció de NO, mediada principalment per la sintasa induïble. Aquesta sobreproducció acaba produint una hipotensió per vasodilatació crònica, malfuncionament general i, inclús, la mort per shock sèptic (Burgner et al., 1999).

ÒXID NÍTRIC I SISTEMA CARDIOVASCULAR

El 1867, sir Lauder Brunter va introduir en medicina l'ús del nitrat d'amil pel tractament simptomàtic de l'angina de pit. Tretze anys més tard, Murrel va introduir la nitroglicerina com a medicament per la mateixa patologia. Tots dos compostos, juntament amb d'altres derivats com el nitroprussiat sòdic, s'han anat usant com a part de la teràpia de l'angina de pit fins als nostres dies, en què s'usen habitualment pastilles de nitroglicerina i pegats amb nitrats orgànics.

Aquests principis actius, descoberts de forma empírica, efectuen l'acció vasodilatadora desitjada mitjançant l'alliberament de NO. Tot i així, el mecanisme molecular concret pel qual es genera NO a partir de nitroglicerina no ha estat identificat fins gairebé 130 anys més tard (Chen et al, 2002).

Aquesta vasodilatació induïda exògenament reflecteix una de les accions endògenes més conegudes del NO: la vasodilatació de la musculatura vascular llisa. Aquesta és exercida fonamentalment per una interacció amb l'enzim guanilat ciclasa. La guanilat ciclasa és l'enzim que produeix guanilat monofosfat cíclic (GMP_c) a partir de guanilat trifosfat (GTP). Aquest GMP_c és un segon missatger intermediari en nombroses funcions biològiques com la relaxació de la musculatura vascular llisa i la inhibició de l'agregació plaquetària.

Hi ha dos famílies de guanilat ciclases: receptors transmembrana i solubles al citoplasma. La forma soluble posseeix un grup hemo que, com tots els grups hemo, és diana del NO. Aquesta unió NO-hemo allibera un residu d'histidina que estava unit al grup hemo i que pot participar en la catàlisi enzimàtica per produir GMP_c (Ignarro, 1989b). A la figura 1.8 pot veure's el model d'activació de la guanilat ciclasa pel NO.

Apart d'aquesta activitat vasodilatadora, el NO té altres múltiples funcions al sistema cardiovascular, amb una regulació complexa i a molts nivells. Segons Balligand i Cannon (1997), els principals papers del NO al múscul cardíac són:

- inhibició tant de l'agregació plaquetària com de l'adhesió de les plaquetes a les cèl.lules endotelials;
- reducció de l'adhesió dels monòcits a l'endoteli;
- relaxació de la musculatura vascular llisa;

- reducció de l'expressió de la proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1), implicada en processos aterogènics de reclutament de monòcits;
- reducció de la inducció per citoquines i LDL-oxidades de molècules d'adhesió leucocitària (VCAM-1) en cèl.lules endotelials;
- inhibició, *in vitro*, de la proliferació i migració de cèl.lules musculars vasculares llises.

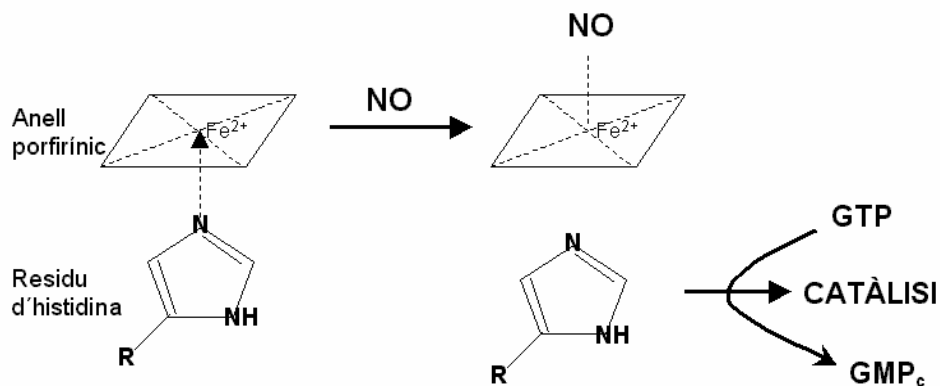


Figura 1.8. Model d'activació de la guanilat ciclasa pel NO.

El paper del NO sobre els processos ateroescleròtics ha estat objecte de controvèrsies sobre els papers pro o antiateroescleròtics atribuïts a ell (com a revisió del tema, Patel et al., 2000). Diferents estudis postulen un paper prooxidant i proateroescleròtic de l'òxid nítric mitjançat per alguns dels compostos que se'n deriven, com ara el peroxinitrit. D'altra banda, d'altres autors atribueixen al NO el paper de regulador dels radicals lipídics, impedit la propagació de la peroxidació lipídica de forma més eficient que el α -tocoferol. Alguns estudis *in vivo* han evidenciat que animals hipercolesterolèmics que sobreexpressaven alguna isoforma de NOS reduïen, i inclús revertien, els processos aterogènics (Cooke, 1996; Qian et al., 1999).

La importància dels descobriments associats a l'òxid nítric en el sistema cardiovascular ha arribat a suposar la concessió l'any 1998 del Premi Nobel en Fisiologia o Medicina als doctors RF Furchgott, LJ Ignarro i F Murad, pel seu treball en *Nitric Oxide as a Signalling Molecule in the Cardiovascular System*.

LES SINTASES D'ÒXID NÍTRIC (NOS)

Tal com s'havia introduït en l'apartat anterior, l'òxid nítric és sintetitzat endògenament per una família de tres enzims: les sintases d'òxid nítric (NOS, EC 1.14.13.39). Aquestes tres sintases són codificades per tres gens diferents localitzats en diferents cromosomes. Segons sembla ser, han estat originades a partir d'un gen ancestral comú per mecanismes de duplicació i es troben equivalents en mamífers com la vaca, la rata o el ratolí (Nathan i Xie, 1994). Dins de l'espècie humana, els tres enzims comparteixen un 51-57% d'homologia.

Aquestes isoformes han anat rebent diferents nomenclatures segons el tipus cel·lular en què van ser descrites, segons l'ordre en què van ser identificades, segons si han estat considerades constitutives o induïbles, etc... En aquest treball de tesi s'ha seguit una nomenclatura numèrica segons l'ordre en què van ser descrites i que correspon també als noms oficials dels tres gens corresponents segons la base de dades del *HUGO Gene Nomenclature Committee* (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>). En la taula I.3 es resumeixen les principals característiques de les tres sintases humanes.

Sintasa	Altres noms	Estructura gen	Localització cromosòmica	Tamany proteïna	Accés Genbank	Referència
NOS1	nNOS, NOS-I	29 exons >240 Kb	12q24.2-q24.3	1434 aa 161 kDa	L02881 U11422	Hall et al., 1994
NOS2	iNOS, NOS-II, NOS2A	26 exons 37 Kb	17cen-q11.2	1153 aa 131 kDa	L09210 L24553 X73029	Chartrain et al., 1994
NOS3	eNOS, NOS-III	26 exons 21-22 Kb	7q35-q36	1203 aa 133 kDa	M93718, M95296	Marsden et al., 1993

Taula I.3. Característiques principals de les tres isoformes de NOS humanes.

L'homologia existent en l'estructura primària de les tres NOS es constata en veure l'homologia estructural que comparteixen (veure figura I.9). Les NOS posseeixen dos dominis estructurals:

- **domini oxigenasa N-terminal:** amb zones d'unió a L-arginina (el substrat de la reacció), tetrahidrobiopterina (BH₄, cofactor de la reacció), i un grup hemo;
- **domini reductasa C-terminal:** amb zones d'unió a flavina adenina dinucleòtid (FAD), flavina mononucleòtid (FMN) i nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH).

Aquests dos dominis estan units per una zona més petita que conté regions d'unió a complexes Ca²⁺-calmodulina (CaM). A més, a l'extrem N-terminal hi ha una extensió de la proteïna que no intervé de cap manera en la síntesi de NO, sinó que es considera relacionada amb la localització intracel·lular de l'enzim. Una particularitat de la proteïna NOS1, en aquesta regió N-terminal, és la presència d'una regió PDZ (també anomenada GLGF, per la seqüència aminoacídica Gly-Leu-Gly-Phe que conté). Aquesta regió es caracteritza per estar present en proteïnes associades a membrana (Ponting et al., 1997).

Al domini reductasa de NOS1 i NOS3 existeix un *loop* de 52-55 aminoàcids que no està present en NOS2. Aquest bucle de la proteïna té una funció d'autoinhibició i la seva eliminació en models *in vitro* fa que augmenti l'activitat enzimàtica (Nishida i Ortiz de Montellano, 1999).

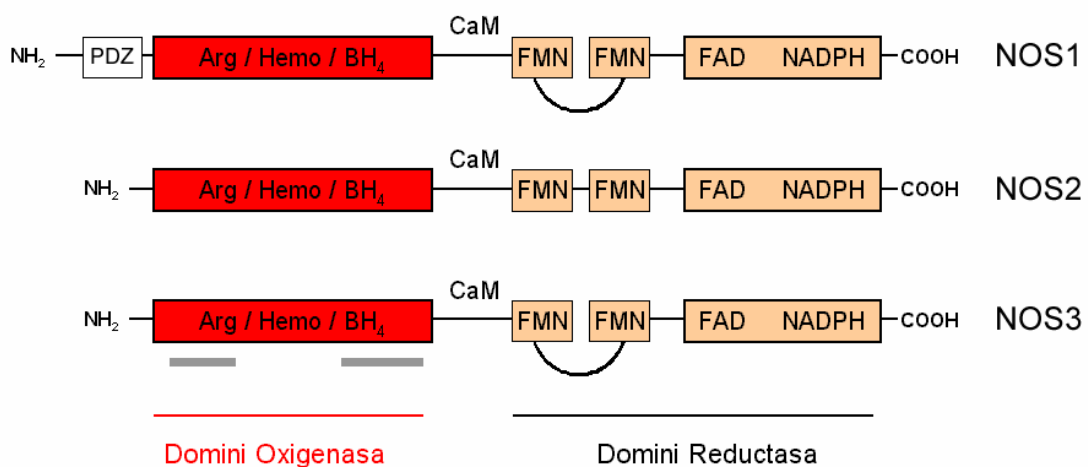


Figura 1.9. Dominis estructurals de les tres NOS humanes. Poden observar-se els dominis oxigenasa i reductasa, amb les zones d'unió a L-Arg, hemo, BH₄, FMN, FAD, NADPH i CaM. En gris es resalten les zones implicades en la dimerització. Basat en Alderton et al. (2001).

La catàlisi comença per la formació d'un homodímer, a partir de dos monòmers de NOS, sense el qual l'enzim roman inactiu. Aquesta dimerització implica la intervenció d'una part del domini oxigenasa, repartida en dos seccions de l'estructura primària de la proteïna (assenyalades en gris a la figura I.9) que inclouen la zona d'unió de BH_4 . Segons alguns estudis, la NOS2 només emprava els dominis oxigenasa per dimeritzar, mentre que NOS1 i NOS3 dimeritzen amb interaccions entre tots els dominis (Venema et al., 1997).

La dimerització ve promoguda per la unió del grup hemo. Aquest és imprescindible perquè s'ajuntin els monòmers, i la tetrahydrobiopterina i l'arginina semblen estabilitzar aquesta unió. A més, l'extrem N-terminal té un domini en ganxo (*N-terminal hook domain*) que enllaça els dos monòmers quan el dímer ja s'ha format, per estabilitzar-ne la unió (Crane et al., 1999).

BIOSÍNTESI DEL NO

Hi ha certa controvèrsia sobre si les NOS produeixen directament òxid nítric o si generen alguna espècie reactiva de nitrogen que després serà convertida en NO per algun altre mecanisme (com a revisió del tema, consulteu Alderton et al., 2001). Tot i així, pot considerar-se en termes globals que el producte final de les NOS és NO.

El mecanisme de producció consta de dos fases. En la primera, una molècula de L-arginina és hidroxilada a N^{ω} -hidroxi-L-arginina (NOHA) que, en una segona fase, serà oxidada a NO i L-citrulina (figura I.10). Aquesta catàlisi consisteix en l'oxidació de cinc electrons de la L-arginina. Els electrons són aportats pel NADPH, en primer terme, i transportats per les flavines (FAD i FMN) fins al grup hemo, al domini oxigenasa. La reacció també és dependent de BH_4 , que actua com a font d'electrons, oxidant-se per produir BH_2 . Aquest BH_2 és reciclat per la dihidrofolat reductasa i la dihidropteridina reductasa (Gross i Levi, 1992).

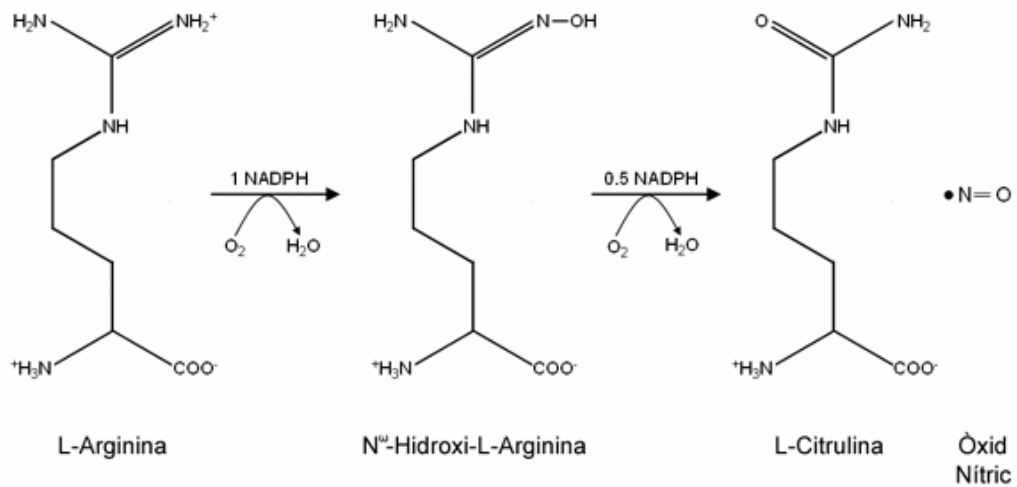


Figura I.10. Reacció de formació d'òxid nítric.

El vehiculador d'aquesta activitat oxidativa és, en realitat, el grup hemo. En rebre el primer electró de les flavines (aportat pel NADPH) transforma el grup hemo-fèrric en un grup hemo-fèrric-superoxi (figura I.11). Aquest grup no pot reaccionar encara amb l'arginina ni el NOHA, fins que no rep més electrons del BH₄, i llavors ja pot reaccionar amb els substrats de la reacció (Stuehr et al., 2004). És interessant resaltar que el primer producte de la catàlisi de les NOS és un complex hemo-NO fèrric i no directament NO, que serà alliberat posteriorment.

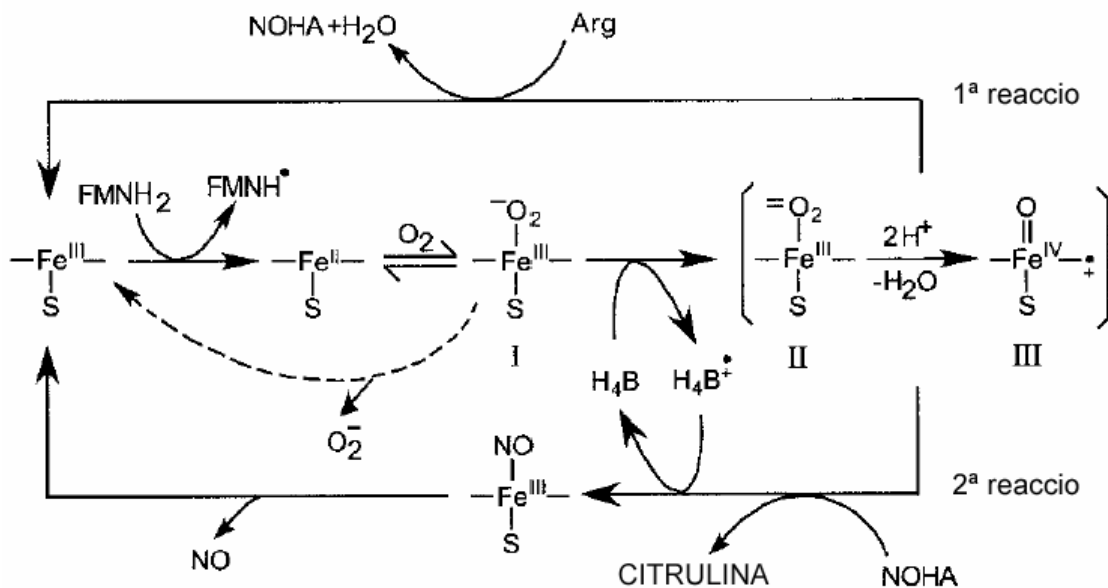


Figura I.11. Model de la biosíntesi de NO.

En contra de què durant molts anys s'havia postulat que l'única isoforma independent de les concentracions de Ca^{2+} era la NOS2, s'ha demostrat que totes tres requereixen de la unió del complex CaM per iniciar la producció de NO, encara que difereixen considerablement en les concentracions necessàries.

NOS1

La NOS1, generalment anomenada *sintasa neuronal* en la literatura, està codificada per un dels gens de regulació més complexa que es coneixen. En la taula 1.3 pot apreciar-se que, només comparant-la amb les altres dues isoformes, presenta una seqüència 6-10 cops més llarga que només es tradueix en una proteïna un 16-20% més gran.

Expressió de NOS1

L'expressió d'aquest gen va ser caracteritzada primer en neurones i després va anar-se estenent el nombre de tipus cel·lulars del sistema neurològic on es detectava la seva presència. Malgrat això, no pot circumscriure's a aquests tipus cel·lulars l'expressió de la NOS1. Miòcits, cèl·lules epitelials, cèl·lules de la màcula densa, mastòcits o neutròfils són alguns dels tipus cel·lulars que expressen proteïna NOS1 funcional en l'espècie humana (com a revisió, Förstermann et al., 1998).

Aquesta expressió presenta alhora variacions d'uns tipus cel·lulars a uns altres en la forma en què es troba localitzada la proteïna: soluble o unida a membrana. Les neurones, per exemple, presenten la NOS1 en les dues fraccions, mentre que en múscul esquelètic i en cèl·lules renals de la màcula densa la presenten bàsicament associada a membrana (Tojo et al., 1994). Aquesta localització és deguda, molt probablement, al motiu PDZ de la regió N-terminal de la proteïna (Schepens et al., 1997).

Diferents estímuls físics poden modular aquesta expressió. Diferents factors d'estrès (hipòxia, immobilitat en animals, calor, ...) actuen incrementant els nivells de mRNA, encara que en molts casos no està clar si és part d'una resposta inespecífica a l'estrès o per una activació directa de la transcripció. Elements putatius d'unió a HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) han estat detectats al llarg de la seqüència del gen, però no s'ha testat la seva funcionalitat. D'altra banda, s'ha observat una activació específica de la NOS1 en cèl·lules musculars llises d'aorta humana en situacions d'estrès de fregament per un flux incrementat del vas (Papadaki et al., 1998).

A més, l'expressió de NOS1 pot venir regulada per hormones sexuals i neurotransmissors. Factors com l'embaràs i tractaments amb estradiol o testosterona fan augmentar l'expressió de NOS1, així com també la inhibició de la transmissió glutaminèrgica (Baader and Schilling, 1996)

Estructura del gen NOS1

Aquest gen es troba situat al braç llarg del cromosoma 12 (12q24.2-q24.3), ocupant una regió superior a les 240 Kb i està format per 29 exons (figura I.12). D'aquesta gran superfície genòmica, la major part correspon a la regió 5' que presenta fins a 9 variants d'exó 1 diferents, cadascun dels quals va precedit per una regió promotora particular (Wang et al., 1999). A més, molts trànscrips del gen incorporen combinacions de més d'un exó 1 diferent per complexos processos d'*splicing*. Aquests mRNAs s'expressen de forma diferent en diferents teixits.

Tot i aquesta diversitat en la transcripció, la proteïna codificada per tots ells és exactament la mateixa perquè l'inici de la traducció es troba situat en l'exó 2. Així, aquesta variació en la regió promotora correspon a mecanismes complexos de regulació: eficiència de transcripció, estabilitat del mRNA, especificitat de tipus cel·lular, especificitat d'estímul, etc (Wang et al., 1999). S'ha descrit, per exemple, una regió situada entre els diferents exons 1 i l'exó 2 que, si és transcrita, pot formar un bucle de RNA que reprimeix la traducció (Newton et al., 2003).

En alguns casos s'han descrit promotors interns entre els exons 3 i 4 que produeixen alteracions a la proteïna, que passa a assumir rols específics, com succeeix en cèl·lules musculars esquelètiques diferenciades (Silvagno et al., 1996). Una d'aquestes modificacions és la pèrdua de la seqüència PDZ i de la conseqüent localització citoplasmàtica de l'enzim codificat. A més, d'altres variants que només inclouen part del domini reductasa han estat descrites en diferents línies cel·lulars humanes i de rata (Alderton et al., 2001).

En aquesta regió promotora, a més, s'han descrit dos microsatèl·lits (un $(GT)_n$ i un $(CG)_n$) amb variació polimòrfica. Els diferents al·lels d'aquests polimorfismes poden presentar diferències en l'activitat basal dels promotors. Aquesta possibilitat és bastant probable en el dinucleòtid que conté el motiu GT/AC, donat que les repeticions amb aquests motius afavoreixen la formació de Z-DNA. Les seqüències

de Z-DNA estan presents en regions gèniques crítiques per la regulació de la transcripció i la replicació (Rich i Zhang, 2003).

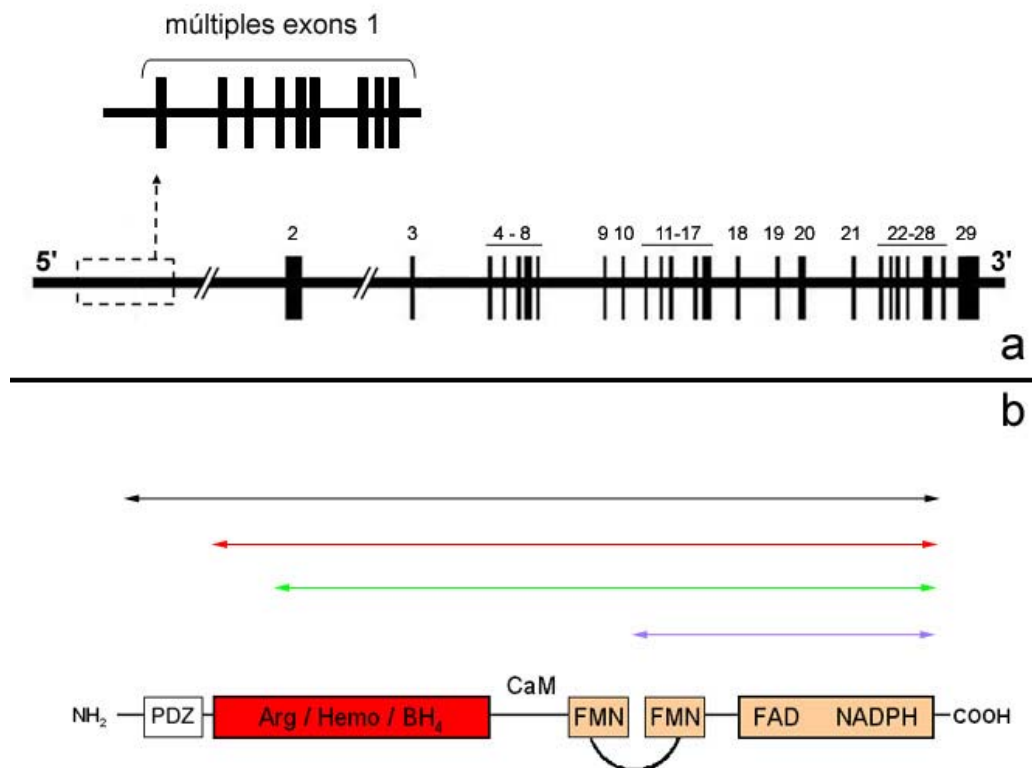


Figura I.12. a) Estructura del gen NOS1. Les línies diagonals indiquen parts omeses de la seqüència per facilitar la il·lustració. La multiplicitat d'exons 1 a la regió 5' està representada pel quadrat de línia discontinua. b) Estructura total de la proteïna NOS1. A sobre es representen en diferents colors el producte gènic codificat per diferents variants de mRNA detectades en humans (modificat a partir d'Alderton et al., 2001).

Polimorfismes analitzats i estudis previs

En el present treball de tesi s'ha analitzat la variació polimòrfica de quatre marcadors del gen NOS1 (figura I.13). S'han analitzat tres microsatèl·lits (un dinucleòtid (GT)_n a la regió promotora abans d'un exó 1; un trinucleòtid (AAT)_n a l'intró 13; i un dinucleòtid (GT)_n a l'exó 29, a la regió no codificant) i un SNP (una substitució C/T a la posició 3391 de l'exó 18, que produeix un canvi sinònim).

L'elecció d'aquests polimorfismes ha volgut incloure marcadors en les zones de regulació 5' i 3' (els dos dinucleòtids), que poden tenir un possible rol en la regulació de la transcripció. Els altres dos polimorfismes estan immersos en la seqüència del gen i, en principi, no afecten la proteïna resultant ni la seva expressió.



Figura I.13. Localització dels quatre polimorfismes analitzats en el gen NOS1. A la part inferior es mostren les distàncies físiques (en Kb) entre els marcadors, inferits a partir de la seqüència AY445095 del GenBank.

La NOS1, tot i ser la primera NOS en ser identificada i caracteritzada, és la isoforma amb la variació genètica menys analitzada. La literatura científica que descriu i estudia aquesta variació és relativament escassa i s'ha limitat durant molts anys a un petit nombre de polimorfismes (principalment els analitzats en aquest treball). Molt recentment ha augmentat la informació de polimorfismes tipus SNP amb l'aparició de grans bases de dades de diferents consorcis: *NIEHS Environmental Genome Project* (<http://egp.gs.washington.edu>), *HapMap Project* (<http://www.hapmap.org>), *NCBI Entrez SNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ...

En la taula I.4 es resumeix la informació dels principals treballs descrivint la variació o realitzant estudis d'associació amb aquests marcadors. S'ha de destacar que els estudis d'associació realitzats fins al moment s'han focalitzat en malalties que no són del sistema cardiovascular (Parkinson, asma, estenosi pilòrica, etc...), amb alguna excepció que n'estudia la relació amb hipertensió (Takahashi et al., 1997b; Iwai et al., 2004).

Marcador	Mostra	N	Resultats destacables	Referència
5'-(GT) _n (AAT) _n	Famílies - UK Estenosi pilòrica	229	5'-(GT) _n s'associa positivament (p=0.006), al·lel 30 és factor de risc (p=0.0006). No hi ha desequilibri de lligament entre tots dos.	Chung et al., 1996
5'-(GT) _n	C/C - França Fibrosi quística	59/59	No s'associa amb la malaltia, però al·lells >27 produeixen més NO exhalat (p=0.008).	Texereau et al., 2004
(AAT) _n	Famílies - Cuba Atàxia cerebelospinal Població francesa	108 58	No s'associa amb la malaltia. Descriuen freqüències.	Twells et al., 1995
(AAT) _n	Malalt fibros. quístic. US-whites	75	Homozigots ≥12/≥12 produeixen menys NO exhalat (p=0.027).	Grasemann et al., 2000
(AAT) _n 3'-(GT) _n	Població Caucàsica Població Afroameric.	305 105	Descriuen freqüències i comparen poblacions.	Grasemann et al., 1999a
C3391T	C/C - USA Asma	410/228	No s'associa amb la malaltia.	Grasemann et al., 1999b
C3391T	Sib-pair - Alemanya Asma	415	No s'associa amb la malaltia, però sí amb fenotips concrets (p=0.0086)	Immervoll et al., 2001
C3391T	C/C - França Parkinson	209/488	No s'associa amb la malaltia.	Levecque et al., 2003
3'-(GT) _n	Població Japó	125	Descriuen freqüències.	Takahashi et al., 1997a
3'-(GT) _n	C/C - Japó Hipertensió	131/147	No s'associa amb la malaltia.	Takahashi et al., 1997b

Taula I.4. Estudis realitzats en els polimorfismes del gen NOS1 analitzats en aquest treball de tesi. Els al·lells estan mencionats pel nombre de repeticions del motiu (en el cas dels microsatèl·lits) i pel nucleòtid que presenten (pel C3391T). C/C: estudi cas control.

Els resultats d'aquests estudis no aporten massa informació sobre el paper que aquests polimorfismes poden jugar en l'expressió de la NOS1. El dinucleòtid 5'-(GT)_n, per exemple, mostra el seu al·lel de 30 repeticions associat a un major risc de patir estenosi pilòrica segons el treball realitzat per Chung i col·laboradors (1996). Aquesta associació, segons postulen, reflexaria l'associació d'aquest al·lel amb variants menys eficients de NOS1 o amb una menor expressió del gen. Per contra, els resultats obtinguts per Texereau et al. (2004) semblen indicar que els

al·lels de més de 27 repeticions produeixen més NO exhalat d'una manera dosi-dependent. Part d'aquestes diferències podrien ser explicades pels diferents teixits implicats en aquestes malalties, que podrien expressar mRNAs diferents que són afectats de forma diferent pels al·lels d'aquest polimorfisme.

De la resta d'estudis aquí mencionats, només cal destacar que cap d'ells ha reportat associacions significatives entre les diferents malalties i els polimorfismes analitzats. Malgrat tot, el microsatèl·lit (AAT)_n mostra diferències en la producció de NO exhalat en individus malalts de fibrosi quística (Grasemann et al., 2000). En 75 malalts analitzats, troben que els homozigots per al·lels de 12 repeticions o més produeixen menys NO que la resta.

A més, també cal destacar que, encara que no s'ha associat amb l'asma, la substitució C3391T s'ha associat amb el recompte d'eosinòfils ($p=0.0086$), que és un dels indicadors de severitat de la malaltia (Immervoll et al., 2001).

NOS2

La NOS2 és descrita habitualment a la literatura com la sintasa induïble (d'aquí la nomenclatura d'iNOS emprada molts cops), en contrast amb l'apelatiu de constitutives a les isoformes NOS1 i NOS3. Aquesta inducció de l'expressió ve determinada per les característiques particulars de la seva regió promotora.

Expressió de NOS2

La primera descripció d'aquesta isoforma va realitzar-se en macròfags i la seva expressió acostuma a associar-se a tipus cel·lulars i processos del sistema immunològic. Tot i això, entre les línies cel·lulars amb capacitat d'expressar NOS2 trobem també hepatòcits, cèl·lules musculars vasculars llises, queratinòcits, miòcits, fibroblasts, ... (Balligand i Cannon, 1997).

Una de les diferències entre aquesta variant i NOS1 i NOS3 és la relativa independència dels nivells intracel·lulars de calci. Així, s'ha observat que la NOS2 necessita la presència de calci, tot i que pot unir-se establement a calmodulina a concentracions de calci molt més baixes que les altres dues isoformes (Chartrain et al., 1994).

L'absència de regulació de l'activitat enzimàtica a través dels nivells de calci contrasta amb l'elevat nivell de regulació que s'observa a través de citoquines i determinats productes bacterians. Els liposacàrids (LPS) de bacteris gramnegatius i citoquines com l'interferó- γ (IFN- γ), la interleuquina-1 β (IL-1 β) o el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α) indueixen la transcripció del gen NOS2 a través de la unió a decenes d'elements específics presents al llarg de 16 Kb de la regió promotora 5' (De Vera et al., 1996). S'ha descrit que aquesta inducció necessita la presència de més d'un d'aquests inductors, així com de la unió del factor de transcripció NF- κ B, mentre que en d'altres mamífers la inducció és més inespecífica (Spitsin et al., 1997). Contràriament, d'altres citoquines com el factor de creixement transformant- β (TGF- β), IL-4 o IL-10 reprimeixen aquesta inducció (Nunokawa et al., 1994).

Les citoquines no només indueixen l'expressió del NOS2 a nivell transcripcional, sinó que també estimulen la unió d'una proteïna anomenada HuR al mRNA, augmentant-li la vida mitjana (Rodríguez-Pascual et al., 2000).

Aquesta inducció és la responsable de les funcions que la NOS2 juga en la resposta immune i inflamatòria, però en determinats casos pot participar en patologies com el shock sèptic (Burgner et al., 1999). Models animals *knocked-out* pel gen NOS2 són fenotípicament indistingibles dels ratolins salvatges, però presenten disminuïda la resposta immune davant d'infeccions i la mortalitat per sepsis (Papapetropoulos et al., 1999).

Estructura del gen NOS2

El gen NOS2 es troba localitzat al cromosoma 17, a la regió 17cen-q11.2. S'estén al llarg de 37 Kb i conté 26 exons (figura I.14). Aquesta seqüència codifica per la més petita de les tres sintases: una proteïna de 131 KDa.

Tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, la regió promotora 5' d'aquest gen ocupa 16 Kb i conté molts elements específics d'unió a diferents factors de transcripció i citoquines diferents. S'ha descrit també la presència d'elements responsius d'estrès per fregament (SSRE), que es troben també presents en el promotor del gen NOS3, i indueixen la transcripció del gen en resposta a un estrès de fregament en un vas per un augment del flux sanguini (Nunokawa et al., 1994). A més, una seqüència *AP1-like* del promotor exerceix una repressió en la transcripció, tant en estat basal com quan s'indueix la transcripció amb citoquines (Pance et al., 2002).

L'anàlisi de diferents mRNAs de diferents teixits ha evidenciat l'existència de processos de *splicing* específics de determinats tipus cel·lulars que afecten la proteïna codificada produint tant variants amb una activitat més elevada com proteïnes truncades inactives, encara que no es formen heterodímers entre variants truncades i variants amb la seqüència complerta (Park et al., 1996; Eissa et al., 1996).

La regió 3'-UTR és rica en determinades seqüències AUUUA, que desestabilitzen el mRNA, reduint-li la vida mitjana. És en aquesta regió on s'uneix la proteïna HuR per estabilitzar el trànscrip quan existeix estimulació per citoquines (Rodríguez-Pascual et al., 2000).

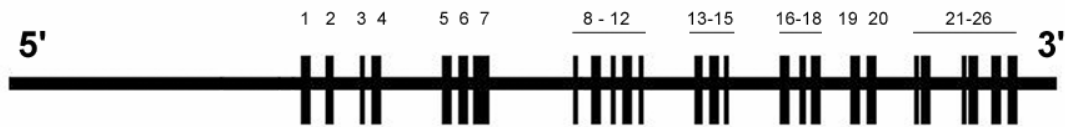


Figura I.14. Estructura del gen NOS2.

Polimorfismes analitzats i estudis previs

La variació molecular d'aquesta regió cromosòmica ha estat analitzada mitjançant el genotipat de cinc polimorfismes (figura I.15). Aquests inclouen dos microsatèl·lits (un pentanucleòtid (CCTTT)_n i un tetranucleòtid (AAAT)_n a la regió promotora 5' del gen) i tres SNPs (les substitucions G-954C a la regió promotora 5', A300G a l'intró 8 i C150T a l'exó 16).

Aquests polimorfismes han estat escollits per l'existència d'estudis previs que en descriuen la variació, així com pel possible paper funcional que tots ells poden tenir. D'una banda, la variació dels tres marcadors de la regió promotora (els dos microsatèl·lits i la substitució G-954C) pot estar implicada en la regulació de la transcripció, especialment en un gen com el NOS2, que presenta una elevada complexitat de regulació a aquest nivell.

Els altres dos marcadors analitzats pretenen descriure part de la variabilitat intragènica i poden estar implicats en variacions en l'expressió de la proteïna. La substitució A300G es troba a l'intró 8 en una zona implicada en complexos processos de *splicing* alternatiu que originen variants de la proteïna amb delecions internes (Eissa et al., 1996). L'altre SNP, C150T a l'exó 16, produeix un canvi de serina a leucina en la posició aminoacídica 608 (Ser608Leu), la funcionalitat del qual no ha estat avaluada (Johannesen et al., 2001).

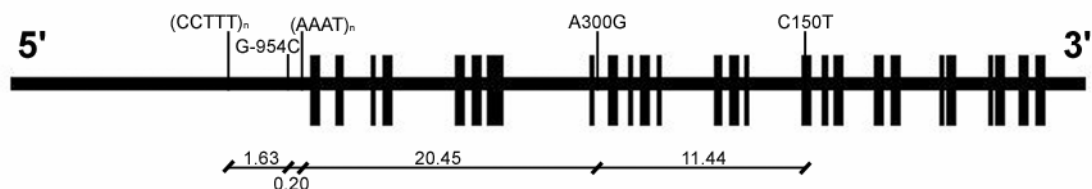


Figura 1.15. Localització dels cinc polimorfismes analitzats en el gen NOS2. A la part inferior es mostren les distàncies físiques (en Kb) entre els marcadors, inferits a partir de la seqüència AC130289 del GenBank.

La disponibilitat d'estudis previs varia ostensiblement depenent del marcador analitzat. La majoria de treballs analitzen principalment la variació polimòrfica associada a la regió promotora, donat que les característiques de regulació del gen suggereixen que pot ser crítica. Així, per exemple, es disposa d'una àmplia literatura descrivint la variació del pentanucleòtid (CCTTT)_n en diferents grups poblacionals, en estudis d'associació amb patologies molt diferents, i inclús en diferents primats no humans (taula 1.5). En l'altre extrem es situen els dos SNPs intragènics, pels quals es disposa de molt poques dades prèvies.

La següent taula resumeix els principals estudis que han analitzat aquests polimorfismes, amb un especial èmfasi en aquells que en descriuen variació en poblacions o que realitzen estudis d'associació amb malalties del sistema cardiovascular. S'ha de remarcar, però, que no s'ha realitzat cap estudi de genètica de poblacions i que la majoria d'estudis d'associació han intentat relacionar la variació del gen NOS2 amb malalties infeccioses (principalment malària) o amb una component autoimmune (diabetes, lupus eritematós, ...).

El pentanucleòtid (CCTTT)_n es troba a unes 2.5 Kb de l'inici de transcripció del gen. La seva variació ha estat analitzada inclús en els primats filogenèticament més propers a l'espècie humana (Xu et al., 1997). Macacs i orangutans són monomòrfics per aquest polimorfisme, mostrant 1 i 3 còpies del motiu consens, respectivament. Ximpanzès, goril·les i humans són polimòrfics per aquesta repetició, amb un patró en la distribució d'al·lels més semblant entre goril·les i humans, que amb ximpanzès. Dins de l'espècie humana, s'ha observat una diversitat poblacional en les freqüències al·lèliques, i es disposa de dades per la variació d'aquest marcador en població de la Península Ibèrica (Xu et al., 2000; López-Nevot et al., 2003; González-Gay et al., 2004).

Marcador	Mostra	N	Resultats destacables	Referència
(CCTTT) _n	Macac Orangutà Goril·la Ximpanzè Humà (UK)	5 5 2 31 101	Descripció del polimorfisme i de les freqüències. Polimòrfic en goril·la, ximpanzè i humà.	Xu et al., 1997
(CCTTT) _n	Gàmbia Carib Caucàsics Japó Índia	933 77 101 210 72	Descriuen freqüències. Troben diferències entre poblacions en la distribució d'al·lels.	Xu et al., 2000
(CCTTT) _n	C/C - Espanya Artritis reumatoide	200/251	Al·lels ≤11 repeats presenten major risc (p=0.021)	González-Gay et al., 2004
(CCTTT) _n	C/C - Lugo Lupus eritematòs	117/199	No troben cap associació.	López-Nevot et al., 2003
(CCTTT) _n	C/C - Gàmbia Malària	657/276	Homozigots <11/<11 incrementen el risc i la severitat.	Burgner et al., 1998
(CCTTT) _n G-954C	C/C - Tailàndia Malària severa	256/179	Al·lels ≥15 incrementen el risc. G-954C no és polimòrfic.	Ohashi et al., 2002
(CCTTT) _n G-954C	C/C - Tanzània Malària	178	No troben cap relació ni amb severitat de malaltia, ni amb [NO _x], ni amb nivells de proteïna NOS2.	Levesque et al., 1999
(CCTTT) _n G-954C	C/C - Tanzània/Kenya Malària		No troben associació. Descriuen el desequilibri de lligament.	Hobbs et al., 2002
(CCTTT) _n (AAAT) _n	C/C - Caucàsics Hipertensió	112/164	No troben cap associació. (AAAT) _n presenta freqüències diferents en hipertensos vells.	Glenn et al., 1999
(AAAT) _n	Africans Hindús Europeus	801 589 35	Descriuen freqüències.	Bellamy i Hill, 1997
(AAAT) _n	Malalts - Caucàsics CAD	856	Al·lel 5 s'associa amb factors de severitat de la malaltia.	Morris et al., 2001
(AAAT) _n	Sib-pair - UK Hipertensió	177	Al·lel 5 incrementa el risc d'hipertensió (p=0.034).	Rutherford et al., 2001
A300G C150T	Famílies - Dinamarca IDDM	1143	C150T associat amb la malaltia en determinats subtipus (p=0.024),	Johannesen et al., 2001
C150T	C/C - Xina Càncer gàstric	93/246	Al·lel T incrementa el risc en determinats subtipus de malalts.	Shen et al., 2004

Taula 1.5. Estudis realitzats en els polimorfismes del gen NOS2 analitzats en aquest treball de tesi. Els al·lels estan mencionats pel nombre de repeticions del motiu (en el cas dels STRs) i pel nucleòtid que presenten (pels SNPs). C/C: estudi cas control.

Aquest marcador ha estat estudiat, principalment, en treballs que analitzen la seva variació lligada al risc d'infecció i severitat per malària. Malgrat que alguns d'ells reporten associacions significatives, els resultats no concorden entre els diferents estudis probablement perquè aquest polimorfisme no sigui el causant directe de les diferències i el desequilibri de lligament entre el veritable causant i el pentanucleòtid sigui diferent en diferents grups poblacionals.

L'únic estudi d'expressió *in vitro* realitzat sobre aquest marcador ha descrit que l'al·lel de 14 repeticions presenta uns nivells de transcripció més elevats quan s'estimulen les cèl·lules amb citoquines (Warpeha et al., 1999). A més, Levesque et al. (1999) no van trobar relació entre la variació del pentanucleòtid i de la substitució G-954C, i els nivells en plasma de proteïna NOS2 i de nitrats i nitrits (indicadors de la producció de NO).

El marcador G-954C ha estat objecte de diferents estudis d'associació en poblacions africanes i afroamericanes. Els estudis que l'han analitzat en poblacions europea, tailandesa i ameríndia han revelat l'especificitat africana d'aquest marcador (Levesque et al., 1999; Ohashi et al., 2002; Martin et al., 1999).

El STR (AAAT)_n presenta una variació molt baixa pel que s'esperaria d'un polimorfisme tipus microsatèl·lit. Només s'observen dos al·lells, de 4 i 5 repeticions del motiu consens, amb freqüències relativament homogènies en les diferents poblacions. L'al·lel de 5 repeticions ha estat associat amb hipertensió i determinats subtipus de malaltia arterial coronària (CAD) (Morris et al., 2001; Rutherford et al., 2001), tot i que un altre estudi no ha revelat cap associació (Glenn et al., 1999). A més d'aquests estudis d'associació, cal destacar el treball de Morris et al. (2002), on associen l'al·lel de 5 repeticions amb complicacions derivades de la diabetes de tipus 2 i realitzen models d'expressió *in vitro* d'aquest polimorfisme. Segons els seus resultats, l'al·lel de 5 repeticions promou una transcripció 25 cops més elevada que el seu homòleg de 4 *repeats*.

La variació dels altres dos SNPs (A300G i C150T) ha estat molt menys estudiada que la dels polimorfismes de la regió promotora. Les úniques dades disponibles per aquests dos marcadors només han revelat una relativa associació de l'al·lel T del marcador C150T amb determinats subtipus de càncer gàstric i de diabetes de tipus 1. Segons suggereixen els autors, aquesta variant seria més eficient produint òxid nítric i aquest excés de NO estaria implicat en una major propensió a patir aquestes

malalties. L'absència d'altres tipus d'estudis no permet aclarir la funcionalitat d'aquestes variants.

NOS3

La NOS3 és anomenada molts cops sintasa endotelial (o eNOS) per haver-se aïllat inicialment en cèl·lules endotelials, i per haver estat la més implicada en la regulació del sistema circulatori. Per aquest motiu també és la que ha estat més analitzada i de la que es coneix millor la seva variació genètica.

Expressió de NOS3

La tercera de les isoformes de la NOS ha estat detectada en molts tipus cel·lulars, molts d'ells relacionats amb el sistema cardiovascular. Cèl·lules de l'endocardi, de l'epiteli d'artèries, venes i capil·lars, miòcits, epitelials del ronyó, cèl·lules piramidals de l'hipocamp, etc... expressen enzim NOS3 de forma constitutiva (Balligand i Cannon, 1997).

És aquesta expressió constitutiva la que fa que, de vegades, sigui anomenada conjuntament amb la NOS1 com a cNOS (NOS constitutives), en contraposició amb el caràcter induïble de la NOS2 (iNOS).

La regulació d'aquest gen es realitza a diversos nivells. A nivell transcripcional, la regió promotora 5' conté diferents regions de control en *cis* incloent, per exemple, seqüències Sp-1, AP-1, AP-2, NF-1, AMPc, GATA, i SSRE (com a revisió del tema, Papapetropoulos et al., 1999). En aquesta regió promotora, hi ha una regió crítica a -144/-95 pb (respecte l'inici de transcripció) a la que s'hi uneixen diferents proteïnes que formen un complex multiproteic que estimula la transcripció (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999).

A més d'aquesta regulació transcripcional, hi ha d'altres mecanismes que regulen l'expressió a nivell post-transcripcional i post-traducciona. La vida mitjana del mRNA és regulada, per exemple, a través de la unió d'una proteïna nuclear a una seqüència de 43 pb a la regió 3'-UTR del mRNA (Searles et al., 1999) o a través de citoquines com el TNF- α , que desestabilitza el mRNA en propiciar la unió de proteïnes citosòliques (Alonso et al., 1997).

Un cop traduït, l'enzim NOS3 es troba localitzat al plasmalemma de les caveoles cel·lulars, on s'ancora mitjançant l'acilació per palmitat i miristat que es produeix durant i després de la traducció (Förstermann et al., 1998).

A més, l'activitat de la NOS3 pot ser estimulada per la fosforilació del residu Ser¹¹⁷⁷. Aquesta fosforilació és produïda específicament per la quinasa Akt, que reacciona davant d'estímuls d'estrès de flux i davant de l'exercici físic (Hambrecht et al., 2003).

En rates hipertensives, s'ha observat que la teràpia gènica amb NOS3 fa disminuir la pressió sanguínia i, de la mateixa manera, fa augmentar els nivells de nitrats i nitrits (NO_x) en plasma i orina (Lin et al., 1997).

Estructura del gen NOS3

El gen que codifica per l'enzim NOS3 (figura I.16) està constituït per 26 exons que ocupen unes 22 Kb del braç llarg del cromosoma 7 (7q35-q36), i que codifiquen per una proteïna de 133 KDa.

La regió promotora no és tan llarga com en NOS1 i NOS2, i això fa que la NOS3 tingui el gen més petit, en extensió, de les tres sintases. El gran interès que va despertar l'estudi de l'òxid nítric a principis dels anys 90 va portar a que, en menys d'un any, tres equips independents publicuessin la seqüència completa de la NOS3 (Marsden et al., 1993; Nadaud et al., 1994; Miyahara et al., 1994). Tots ells evidencien l'existència dels elements reguladors del promotor mencionats a l'apartat anterior. Segons sembla, l'element Sp-1 més proximal és necessari per la transcripció i un element GATA a -254 pb és mandatori per l'activitat del promotor (German et al., 2000)

Aquests primers estudis ja destaquen la presència dels primers polimorfismes dins la seqüència del gen: un minisatèl·lit de 27 pb a l'intró 4 i un dinucleòtid (CA)_n a l'intró 13. Aquest darrer polimorfisme s'ha vist recentment implicat en la regulació de l'eficàcia d'*splicing*, que depèn del número de repeticions CA que conté (Hui et al., 2003b). Aquest microsatèl·lit exerceix aquesta funció a través d'una ribonucleoproteïna anomenada hnRNP L, que s'hi uneix específicament (Hui et al., 2003a).

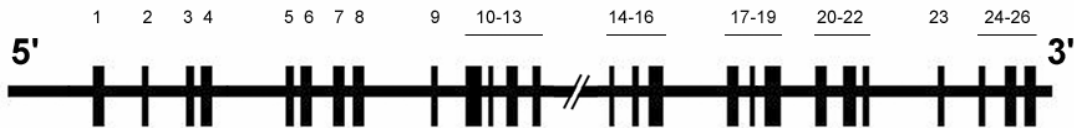


Figura 1.16. Estructura del gen NOS3. Les línies diagonals indiquen parts omeses de la seqüència per facilitar la il·lustració.

Polimorfismes analitzats i estudis previs

La variació genètica del gen NOS3 ha estat analitzada a través de la determinació genètica de cinc polimorfismes (figura 1.17). Aquests cinc marcadors inclouen tres SNPs (les substitucions T-786C a la regió promotora, G894T a l'exó 7 i A27C a l'intró 18), el minisatèl·lit de 27 pb a l'intró 4 (ecNOSa/b) i el dinucleòtid (CA)_n a l'intró 13.

Aquests polimorfismes han estat àmpliament estudiats en relació a diferents patologies, principalment del sistema circulatori, i alguns d'ells posseeixen un probable paper funcional. D'una banda, s'ha evidenciat que l'al·lel T de la substitució T-786C influeix en la transcripció, reduint un 50% l'activitat (Nakayama et al., 1999). El polimorfisme G894T provoca un canvi de glutamat a aspartat en la posició aminoacídica 298 (Glu298Asp) del que encara no es té clar quin paper pot exercir en la proteïna. En un principi, un estudi realitzat per Tesauro et al. (2000) postulava que l'al·lel T codificava per una proteïna més susceptible a ser trencada espontàniament i que, per tant, tindria una vida mitjana més curta. Més tard, però, va descobrir-se que aquesta proteolisi era deguda a un artefacte metodològic (Fairchild et al., 2001).

A més, i com ja s'ha comentat a l'apartat anterior, s'ha establert una relació entre el nombre de repeticions del motiu CA del dinucleòtid i l'eficiència d'*splicing*, relació que tal com conclouen els mateixos autors "augmenta la possibilitat de que la inducció d'*splicing* de l'intró 13 estigui involucrada en el mecanisme molecular de l'aterosclerosi" (Hui et al., 2003a i 2003b).

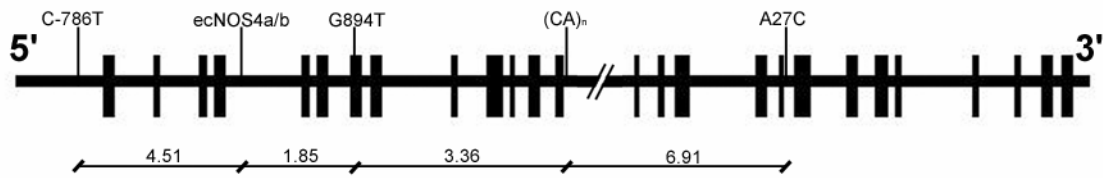


Figura 1.17. Localització dels cinc polimorfismes analitzats en el gen NOS3. A la part inferior es mostren les distàncies físiques (en Kb) entre els marcadors, inferits a partir de la seqüència D26607 del GenBank.

Pel fet d'expressar-se a l'endoteli vascular, la NOS3 ha estat objecte recurrent d'estudis d'associació amb malalties del sistema circulatori, amb un especial èmfasi en la hipertensió i els polimorfismes estudiats en aquest treball inclouen els que han estat més abastament estudiats. Els resultats obtinguts pels diferents estudis han mostrat discrepàncies sobre la possible implicació d'aquests polimorfismes en diferents malalties i, inclús en els casos en què detectaven associació, sobre quins al·lels dels polimorfismes confereixen un risc incrementat.

En primer terme, cal destacar el treball de Wang i Wang (2000), en què analitzen els resultats obtinguts pels diferents estudis d'associació realitzats sobre la variació genètica del NOS3. Evidencien la inconsistència entre diferents estudis i malalties i postulen que aquestes discrepàncies podrien ser explicades, en part, per factors específics de població i factors específics de malaltia.

La recent publicació d'una meta-anàlisi sobre la variació molecular al gen NOS3 i el risc per CAI ha reunit les dades de 26 estudis (Casas et al., 2004). Aquesta publicació reuneix totes les dades disponibles fins l'any 2003 dels estudis d'associació cas-control entre la CAI i els polimorfismes T-786C, ecNOS4a/b i G894T i conclou que els al·lels *a* i T (dels marcadors ecNOS4a/b i G894T, respectivament) s'associen significativament amb un major risc per CAI (OR=1.34 i OR=1.31, respectivament). Els resultats d'aquesta meta-anàlisi han estat discutits per possibles problemes metodològics (Rossi i Maiolino, 2004).

La següent taula (taula 1.6) resumeix els principals estudis realitzats sobre aquests marcadors i la seva relació amb la CAI. És interessant remarcar que, tot i ser la sintasa més estudiada, no hi ha estudis de genètica de poblacions realitzats sobre aquests marcadors (si descomptem la publicació derivada de l'anàlisi parcial de les dades d'aquesta tesi, que es recull a l'annex 5), malgrat que sí que existeix algun

estudi que n'analitza la variació en grans grups poblacionals (Tanus-Santos et al., 2001).

Marcador	Mostra	N	Resultats destacables	Referència
T-786C	C/C - Austràlia CAD	633/160	No troben associació ni amb la malaltia, ni amb activitat del promotor, ni amb nivells de NO _x .	Sim et al., 1998
T-786C ecNOS4ab	C/C - Espanya CAD	170/300	Homozigots CC tenen major risc (p=0.039; OR=1.67)	Álvarez et al., 2001
T-786C G894T	C/C - França/Belfast Infart de miocardi	531/610	Al·lel G s'associa amb elevat risc només en francesos (p<0.009)	Poirier et al., 1999
T-786C ecNOS4ab G894T	C/C - Corea Sud CAD	110/128	No troben cap associació	Yoon et al., 2000
T-786C ecNOS4ab G894T	C/C - Meta-anàlisi CAI	2377/7702 6212/6737 6036/6106	Els al·lells a i 894T s'associen significativament amb un risc incrementat per la CAI.	Casas et al., 2004
ecNOS4ab	C/C - Austràlia CAD	549/153	Homozigots a/a tenen major risc de CAD en fumadors (p=0.0043).	Wang et al., 1996
ecNOS4ab	C/C - Japó Infart de miocardi	455/550	Al·lel a augmenta el risc per infart (p=0.007; OR=1.52).	Ichihara et al., 1998
ecNOS4ab G894T	C/C - UK CAD Infart de miocardi	298/138 249/183	Homozigots T/T mostren risc incrementat per la malaltia (OR=4.2 i OR=2.5).	Hingorani et al., 1999
ecNOS4ab G894T	C/C - Japó Infart de miocardi	226/357	Homozigots T/T tenen risc incrementat (p=0.0085).	Hibi et al., 1998
(CA) _n	C/C - Alemanya CAD	1000/1000	Al·lells ≥38 repeticions augmenten el risc (p=0.001; OR=1.94).	Stangl et al., 2000
(CA) _n	Malalts - Alemanya CAD	1000	Interacció entre repeticions del (CA) _n i homocisteïnèmia en el risc per complicacions de CAD en dones.	Laule et al., 2003
(CA) _n A27C	Sib-pair - França Hipertensió	346	No troben cap associació.	Bonnardeaux et al., 1995
ecNOS4ab G894T A27C	2 C/C - Japó Hipertensió	218/240 187/223	Al·lel G s'associa amb la malaltia en les dos mostres (p<0.0017).	Miyamoto et al., 1998

Taula I.6. Estudis realitzats en els polimorfismes del gen NOS3 analitzats en aquest treball de tesi. Els al·lells estan mencionats pel nucleòtid que presenten (pels SNPs), pel nom convencional dels al·lells (en el cas dels minisatèl·lit) i pel nombre de repeticions del motiu (en el cas del dinucleòtid). C/C: estudi cas control.

La variació molecular del polimorfisme A27C en relació a la CAI no ha estat avaluada fins al moment i només es disposa d'estudis que l'analitzen en relació a la hipertensió essencial (Bonnardeaux et al., 1995; Miyamoto et al., 1998).

També són nombrosos els estudis que intenten relacionar la variació genètica en el gen NOS3 amb la seva implicació funcional, a partir de l'anàlisi de diferents paràmetres: quantificació de nitrats i nitrits (NO_x) (estimadors de la producció de NO); activitat enzimàtica; quantificació de proteïna NOS3; etc...

L'any 1997, Wang i col·laboradors van observar en una mostra de 108 famílies (428 individus australians) que els homozigots *a/a* del marcador ecNOS4a/b presentaven nivells de NO_x significativament superiors que els *b/b* ($p=0.0002$). Yoon et al. (2000) no van replicar els resultats en una mostra del Japó, però van associar nivells elevats de NO_x amb CAD ($p<0.001$), hipertensió ($p<0.001$) i l'al·lel G del polimorfisme G894T. En afroamericans sans, Li et al. (2004) no troben cap relació entre els polimorfismes T-786C, ecNOS4a/b i G894T i la variació en els nivells de NO_x.

La heterogeneïtat dels resultats obtinguts en aquests i d'altres estudis, han portat a alguns investigadors ha estudiar la influència sobre l'expressió i l'activitat enzimàtica dels polimorfismes en el gen NOS3 en models cel·lulars. Song et al. (2003) han analitzat l'acció dels polimorfismes T-786C, ecNOS4a/b i G894T sobre els nivells de NO_x, de mRNA de NOS3, de proteïna NOS3 i d'activitat enzimàtica en cultius de cèl·lules endotelials de cordó umbilical de coreans. L'única associació detectada és la dels homozigots *a/a* del polimorfisme ecNOS4a/b, que mostren nivells més baixos de proteïna NOS3 ($p=0.030$) així com d'activitat enzimàtica ($p=0.0197$).

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Els antecedents dels que parteix aquest treball, en el marc evolutiu, històric i molecular presentat a la Introducció d'aquest treball, poden concretar-se en diferents aspectes:

- Estudis previs sobre la variació molecular de regions genòmiques nuclears associada a variacions funcionals han evidenciat que aquesta variació està relacionada amb la història demogràfica de les poblacions humanes. Així, l'anàlisi de la variació molecular de les NOS pot proporcionar informació adicional sobre la història genètica de les poblacions de la Mediterrània.
- Estudis epidemiològics han suggerit la relació de determinades variants dels gens productors de NO amb la resistència a la malària. La prevalença en el passat d'aquesta malaltia a la regió mediterrània podria haver suposat una modulació particular de les freqüències de les variants d'aquests gens en els grups humans d'aquesta àrea geogràfica, tal com s'ha observat per d'altres mutacions en els gens de les globines o d'enzims eritrocitaris.
- La funcionalitat dels gens productors de NO permet considerar-los com a bons gens candidats per l'exploració del risc genètic a malalties cardiovasculars. El paper del NO com a regulador del sistema circulatori així com la seva intervenció en processos fisiopatològics com l'aterosclerosi fa probable que variants de les NOS amb una diferent funcionalitat puguin jugar un paper com a factors genètics de risc per malalties cardiovasculars.
- A la conca mediterrània, el risc de malalties cardiovasculars és relativament baix. Aquesta baixa incidència no és explicable únicament per factors ambientals, sinó que poden trobar-se implicats factors genètics particulars. El manteniment d'aquestes particularitats genètiques és molt improbable que es degui a processos de deriva genètica o migració, donada la intensa història de contactes i mestissatge que ha caracteritzat la Mediterrània. Una altra possibilitat per explicar les diferències genètiques associades a la susceptibilitat cardiovascular podria ser la selecció natural relacionada amb aquestes malalties. Tot i així, l'efecte selectiu de les malalties cardiovasculars no sembla ser important donada la seva aparició en el període post-reproductiu i la seva molt recent importància epidemiològica. Una explicació selectiva alternativa

podria estar relacionada amb la malària al passat que, a través de la seva influència sobre la diversitat dels gens reguladors del NO, entre d'altres, hauria contribuït a la configuració d'un *pool* gènic mediterrani relativament protector enfront de les malalties cardiovasculars actuals.

En el marc d'aquests antecedents, el present treball té com a **objectiu principal** explorar la variació genètica en els gens relacionats amb la síntesi d'òxid nítric en poblacions humanes i determinar la seva possible implicació com a factor de risc genètic per la susceptibilitat a malalties cardiovasculars en la Mediterrània.

Per tal d'assolir aquest objectiu principal, es proposen els següents **objectius específics**:

- Analitzar la variació de 13 polimorfismes de DNA en els gens NOS1, NOS2 i NOS3 en nou poblacions humanes de la Mediterrània i del Centre d'Europa.
- Comparar les distribucions poblacionals d'aquests polimorfismes entre la Mediterrània i el Centre d'Europa, poblacions amb diferents incidències de malalties cardiovasculars.
- Comparar la informació sobre la història de les poblacions humanes dels marcadors analitzats amb la proporcionada per d'altres tipus de marcadors.
- Determinar la implicació de les regions gèniques analitzades en la susceptibilitat cardiovascular mitjançant una anàlisi d'associació genètica basada en famílies.
- Avaluar la influència de les variants genotipades sobre els nivells plasmàtics de nitrats i nitrits (NO_x) a fi de poder proposar mecanismes fisiològics per les possibles associacions genètiques.
- Discutir integradament els resultats poblacionals amb els epidemiològics i les anàlisis quantitatives a la llum de la genètica particular de les poblacions mediterrànies.

MATERIAL I MÈTODES

DESCRIPCIÓ DE LES MOSTRES ANALITZADES

MOSTRES POBLACIONALS

En el present treball s'han analitzat 9 mostres de poblacions humanes de la Mediterrània Occidental, que comprenen un total de 889 individus. Amb la intenció d'obtenir una mostra homogènia i representativa de les poblacions que es volien estudiar van establir-se uns criteris de mostreig comuns (antropològics, biològics i ètics) per a totes les mostres.

En tots els casos, els individus eren donants de sang d'ambdós sexes, aparentment sans i no emparentats entre si. El criteri per definir a l'individu com a autòcton de la població va ser confirmar que els seus ascendents fins a dues generacions (és a dir, els quatre avis) fossin també nascuts en la zona. A més, les mostres pertanyien a zones rurals per intentar reduir en la mesura del possible individus provinents de les migracions que, al llarg del segle XX, s'han produït cap a les ciutats.

Els individus mostrejats van donar el seu consentiment per a l'estudi mitjançant una entrevista personal amb la persona responsable present en el moment de l'extracció de la mostra i el projecte va comptar amb l'aprovació del Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona.

Les 9 poblacions analitzades han estat triades per intentar representar la variació genètica humana de l'oest de la Mediterrània incloent mostres de: Península Ibèrica (representada per tres poblacions), Berbers del Nord d'Àfrica (amb dues mostres), Sardenya (dues poblacions) i Sud de França (una mostra). S'ha inclòs, a més, una mostra d'individus alemanys com a grup extern amb la intenció de representar part de la variació genètica en la Europa no Mediterrània. A la figura III.1 es localitza l'origen geogràfic de les mostres analitzades.

NORD PENÍNSULA IBÈRICA

La mostra d'individus del nord de la Península Ibèrica està constituïda per 114 individus (93 homes i 21 dones) d'entre 21 i 82 anys d'edat provinents de zones rurals de la província d'Astúries. Aquesta mostra va ser recollida en col·laboració amb l'*Hospital Central de Asturias* d'Oviedo sota el control directe de la Dra. M^a Carmen Rodríguez.



Figura III.1. Localització geogràfica de les mostres poblacionals analitzades.

CENTRE PENÍNSULA IBÈRICA

Un total de 120 individus d'entre 18 i 60 anys van ser mostrejats a zones rurals de la Serra de Gredos, a la província d'Àvila. Aquestes mostres van ser recollides en el marc del projecte subvencionat PB88-0119 (DGCYT), coordinat per la Dra. M^a Soledad Mesa (*Universidad Complutense de Madrid*), i del que el Dr. Pedro Moral formava part com a investigador.

SUD PENÍNSULA IBÈRICA

El sud de la Península Ibèrica es troba representat per una mostra d'individus de l'Alpujarra de la província d'Almeria. L'Alpujarra és una regió muntanyosa al sud del massís de Sierra Nevada que ha estat refugi en les diferents invasions (tant del nord com del sud) que ha sofert l'actual Andalusia. Han estat inclosos 120 individus (64 homes i 56 dones) d'entre 25 i 54 anys. Les mostres van ser recollides pels Drs. Francisco Luna, Pedro Moral i Ana Fernández-Santander (*Universidad Complutense de Madrid*), amb la col·laboració del *Departamento de Hematología* i la *Hermandad de Donantes de Sangre* de l'*Hospital de Torrecárdenas* d'Almeria.

MIG ATLES

La mostra d'individus del Mig Atlas marroquí ha inclòs només individus del grup etnolingüístic berber per un mínim de tres generacions. Un total de 120 individus (59 homes i 61 dones) d'entre 20 i 66 anys van ser recollits a l'hospital de Khénifra,

capital de les tribus berbers del Mig Atlas. El responsable de la recol·lecció va ser el Dr. Nourdin Harich de la *Université Chouaib Doukkali*, d'El-Jadida (Marroc).

ALT ATLES

La vall d'Amizmiz, a l'Alt Atlas marroquí, ha estat el marc geogràfic on s'han recollit les 81 mostres que conformen aquesta mostra poblacional. Aquesta zona, culturalment berber, ha estat relativament aïllada donada la seva dificultat d'accés i les dures condicions climàtiques (moltes poblacions es troben per damunt dels 1500 metres d'altitud). La mostra va ser recol·lectada pel Prof. Mohamed Cherkaoui de la *Université Cadi Ayyad* de Marrakech (Marroc) i proporcionada a l'equip del Dr. Pedro Moral pel Dr. Jean-Michel Dugoujon del *Centre d'Anthropologie UMR 8555-CNRS* de Toulouse (França).

SARDENYA COSTA

En aquesta mostra s'han inclòs 95 individus (45 homes i 50 dones) de la regió de Cabras. La zona de Cabras pertany a la província d'Oristano i correspon a una regió parcialment pantanosa de la costa occidental de Sardenya. Aquest fet ha provocat que hagi estat zona endèmica de malària fins al 1948, quan va ser erradicada. La mostra va ser recollida per l'equip investigador del Dr. Giuseppe Vona de la *Università degli Studi de Cagliari*, de Sardenya.

SARDENYA INTERIOR

Diverses poblacions de la província de Nuoro són l'origen dels 94 individus recollits en aquesta mostra poblacional (47 homes i 47 dones). La zona de Nuoro contrasta amb la de Cabras ja que es troba situada a l'interior de l'illa en una zona muntanyosa de difícil accés del massís del Gennargentu, que ha mantingut aïllada aquesta població en diferents períodes històrics. Cal esmentar, per exemple, que l'ocupació de l'Imperi Romà mai va aconseguir controlar els pobles d'aquesta regió. Igual que la mostra anterior, aquesta va ser recol·lectada per l'equip del Dr. Giuseppe Vona.

SUD FRANÇA

La recol·lecció va tenir lloc a poblacions de la zona de Toulouse, capital del departament francès de Midi-Pyrénées, incloent 96 individus (65 homes i 31 dones) d'entre 20 i 63 anys. El responsable de la recol·lecció va ser el Dr. Francis Roubinet de l'*Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée* de Toulouse (França) i facilitada pel Dr. Jean-Michel Dugoujon.

ALEMANYA

Un total de 49 individus (26 homes i 23 dones) d'entre 26 i 60 anys d'edat van ser recollits pel Dr. Heiko Witt de la *Medizinische Fakultät der Humboldt* de la *Universität zu Berlin*. En aquestes mostres només es va comprovar l'origen geogràfic dels pares i són representatius de població general alemanya.

MOSTRA DE FAMÍLIES AMB CARDIOPATIA ISQUÈMICA

Per tal de realitzar les anàlisis corresponents a determinar la implicació dels polimorfismes analitzats en les tres àrees genòmiques que inclouen les sintases d'òxid nítric va utilitzar-se una mostra de 101 famílies nuclears amb un fill afectat de cardiopatia isquèmica. Aquesta mostra va ser recollida durant el decurs del projecte de tesi doctoral de la Dra. Neus Valveny (Valveny, 2000) i està administrada pel Dr. Pedro Moral a la Unitat d'Antropologia del Dept. de Biologia Animal de la Universitat de Barcelona.

CRITERIS D'INCLUSIÓ A LA MOSTRA

Els criteris utilitzats per a seleccionar els individus que formen part de la mostra de famílies nuclears van ser els següents:

1. La família era seleccionada en funció de que un individu fos afectat de cardiopatia isquèmica a una edat inferior als 55 anys. Amb aquest criteri es pretenia seleccionar casos de CAI que s'haguessin presentat de forma prematura (es considera edat prematura abans dels 55 anys per homes i 65 per dones) per tal de donar un pes específic important als factors genètics de la malaltia per damunt dels merament ambientals. A més, per sota dels 55 anys augmenta la probabilitat de que els progenitors estiguin vius.
2. Per tal de considerar a l'individu com a afectat de CAI, havia d'haver estat diagnosticat per un cardiòleg expert d'una (o totes dues) de les següents manifestacions clíniques:
 - **Angina de pit (*angina pectoris*):** diagnosticada per cateterisme amb coronariografia, la qual ha d'haver mostrat lesions significatives (> 50% d'obstrucció) en algun vas arterial coronari principal (descendent anterior, coronària dreta, coronària esquerra o tronc comú dels vasos coronaris).

- **Infart de miocardi:** diagnosticat en base al compliment dels següents criteris:

a) Clínica de dolor agut, de característiques típiques d'origen coronari.

b) Canvis electrocardiogràfics típics d'isquèmia, lesió i necrosi miocàrdica: aparició d'ones "Q" i elevació del segment ST de l'electrocardiograma, en alguna de les derivacions típiques en la localització de la zona de la lesió-necrosi.

c) Canvis enzimàtics: valoració de les CPK amb elevació dels nivells per sobre de 200U/l, en el transcurs de les 6-12 h. des de l'inici de la crisi de dolor.

3. A més, per a la inclusió d'un individu a la mostra, s'havien de poder obtenir mostres de sang dels dos pares, independentment de si havien patit la malaltia o no. En els casos en què no va poder disposar-se d'algun dels dos progenitors, va obtenir-se la mostra d'algun germà de l'individu malalt per intentar inferir el genotip del pare absent.

OBTENCIÓ DE LA MOSTRA

El reclutament de les mostres de famílies va dur-se a terme a través de la col·laboració de diferents hospitals de l'àrea metropolitana de Barcelona. En aquest procés van contribuir-hi les següents institucions i persones: Hospital de la Vall d'Hebron (Unitat d'Hemodinàmica, Dr. Enric Domingo i Pilar Gómez), Residència Universitària Prínceps d'Espanya-Hospital de Bellvitge (Unitat d'Aterosclerosi, Dr. Xavier Pintó i Dr. Fèlix Meco), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Unitat de Cardiologia, Dr. Lluís Tomàs i Lola Gil) i Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (Dr. Antonio Francino).

En tots els hospitals el protocol per recol·lectar la mostra va ser el mateix. Primer de tot, es seleccionaven de la base de dades de l'hospital els individus més joves que haguessin estat diagnosticats d'angina de pit o infart de miocardi en un període relativament recent (2-3 anys) segons els criteris mencionats en l'apartat anterior. Posteriorment, es contactava telefònicament o directament amb el pacient per informar-lo de l'estudi i per consultar-li la possibilitat de col·laboració d'ell i de la seva família. En cas afirmatiu, se'l citava en dejú a l'hospital, conjuntament amb la seva família o per separat, per procedir a l'extracció de sang i a l'entrevista

personalitzada per complimentar un qüestionari sobre antecedents i factors de risc per la malaltia.

En determinades famílies, algun membre no podia assistir a l'hospital principalment degut a l'avançada edat i delicada salut d'alguns progenitors. En aquests casos, se'ls va citar en el centre d'assistència primària més proper al seu domicili o s'acudia amb una infermera al domicili mateix per realitzar l'extracció i l'entrevista. En el moment de l'entrevista, fos quin fos el lloc on es duia a terme, se'ls tornava a informar dels objectius de l'estudi, se'ls hi demanava un consentiment per escrit i se'ls garantia la confidencialitat de les dades. Els models de consentiment escrit i de qüestionari utilitzats es troben a l'annex 1.

L'extracció va consistir en tots els casos en 15 ml de sang total en tubs d'extracció de 5 ml amb citrat sòdic com a anticoagulant i es conservava a 4° C fins el seu processament al laboratori (entre poques hores després de l'extracció fins a un màxim de tres dies).

El qüestionari recopilat per a cada individu reclutat a l'estudi incloïa dades que podien ser rellevants en la malaltia i en els resultats de l'estudi. Aquestes dades s'agrupen en 5 categories:

1. **Dades personals:** Característiques físiques com el sexe, l'edat, l'alçada o el pes. Per tal de conèixer l'origen poblacional real de l'individu es registrava el lloc de naixement del mateix i dels seus avis. A més, es recollia informació sobre l'edat dels progenitors i, en cas que s'hagués donat la defunció d'algun dels mateixos, s'anotava l'edat i la causa de la mort.
2. **Diagnòstic:** aquesta part del qüestionari va ser contestada només per els pacients i aquells familiars que també havien patit la malaltia. Inclou el diagnòstic clínic, angiogràfic i quirúrgic així com les intervencions que han estat realitzades per a tots els episodis de la malaltia. Aquesta informació va ser completada i comprovada directament sobre la història clínica del pacient que havia estat consultada en cada centre hospitalari.
3. **Antecedents familiars:** en aquest apartat s'indagava, fins a un parentiu de segon grau, els antecedents familiars de cardiopatia isquèmica. Es detallava la relació de parentiu respecte de l'afectat, l'edat d'aparició i el tipus de manifestació. També s'interrogava sobre antecedents per a malalties

relacionades amb la CAI: dislipèmies, hipertensió, diabetes, mort súbita, malaltia cerebrovascular o malaltia vascular perifèrica.

4. **Antecedents personals:** aquest apartat pretén recopilar informació sobre els factors de risc ambientals i fisiològics coneguts per la CAI. En tots els casos es va fer servir uns criteris comuns en l'entrevista per evitar confusions terminològiques. S'inclouen qüestions sobre tabaquisme, realització d'exercici, obesitat, consum d'alcohol, hipertensió, diabetes, tractaments hormonals, dislipèmia, hiperuricèmia, antecedents personals de malalties cardiovasculars no coronàries, tipus de personalitat (incloent estrès i personalitat de tipus A), nivell d'estudis, situació laboral i estat civil (que pot indicar situacions d'estrès patides per l'individu).
5. **Tractaments actuals:** fa referència als tractaments farmacològics o dietètics que segueix l'individu en el moment d'obtenir la mostra i que poden afectar els paràmetres serològics que es volen mesurar i que, per tant podrien ésser rellevants a l'hora d'interpretar els resultats.

La campanya de recollida de la mostra de famílies va dur-se a terme de gener de 1997 a juliol de 1998 i va ser efectuada per la Dra. Neus Valveny i el Dr. Antoni López-Alomar a la Unitat d'Antropologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. Al final de la campanya s'havien obtingut mostres de 101 famílies nuclears que representaven un total de 302 individus.

CARACTERÍSTIQUES DE LA MOSTRA DE FAMÍLIES

Les taules III.1 i III.2 mostren la composició de les famílies i la distribució per sexes i edat dels individus que formen part de l'estudi.

COMPOSICIÓ DE LA FAMÍLIA	NOMBRE DE FAMÍLIES	
	AFECTAT HOME	AFECTAT DONA
Fill afectat + 2 pares	40	3
Fill afectat + pare	2	-
Fill afectat + mare	3	-
Fill afectat + 2 pares + germà / na	2	-
Fill afectat + pare + germà / na	5	1
Fill afectat + mare + germà / na	41	3
Fill afectat + > 2 germans / nes	-	1
Total famílies	93	8

Taula III.1. Composició de les famílies que formen part de la mostra de CAI.

TIPUS D'INDIVIDU	HOMES	DONES	RANG D'EDAT (MITJANA ± ES)
Fills afectats	93	8	21-55 anys (44.2 ± 1.3)
Progenitors	53	92	52-88 anys (71.0 ± 1.9)
Germans	24	32	18-63 anys (44.0 ± 1.7)

Taula III.2. Distribució per sexes i rangs d'edat del total d'individus que integren les famílies que han participat a l'estudi.

Com pot apreciar-se de les dades presentades, la mostra de fills malalts de CAI està formada per molts més homes que dones (el 92.07% són homes vs. el 7.93% de dones). No és un fet sorprenent, donat que a les edats representades a la mostra (44.2 anys de mitjana) l'edat d'incidència de la CAI presenta 10 anys de diferència entre homes i dones, i arriba a 20 anys en el cas concret de l'infart de miocardi. En la mostra de pares, aquesta desproporció s'inverteix fins arribar a un 63.4% de dones i un 36.6% d'homes. Tenint en compte l'edat avançada d'aquest subgrup (71 anys de promig), hi ha un nombre més alt de progenitors masculins absents degut a les diferències sexuals en l'esperança de vida: 75.57 anys pels homes i 82.57 per les dones (dades del *Instituto Nacional de Estadística per Catalunya* l'any 1998).

A la taula III.3 es mostra un resum de la informació d'antecedents personals i familiars dels fills afectats de cardiopatia isquèmica.

VARIABLE	CATEGORIES	% MALALTS	VARIABLE	CATEGORIES	% MALALTS
Dieta prèvia a l'aparició de la malaltia	Normal	34.0%	Diagnòstic inicial de CAI	Infart Miocardi	71.7%
	Rica en greixos	46.0%		Angor evolutiu	18.2%
	Pobre en greixos	1.0%		Angor crònic	4.0%
	Per a diabètics	1.0%		Assimptomàtics	6.1%
BMI	<25 (normal)	19.8%	Dislipèmia	Hipercolesterolèmia	60.6%
	25-30 (sobrepès)	65.3%		Hipertrigliceridèmia	33.7%
	>30 (obès)	14.9%			
Fumador previ a l'aparició de la malaltia	Gens	17.0%	Fumador en l'actualitat	Gens	73.5%
	<15 cigs./dia	8.0%		<15 cigs./dia	11.2%
	15-25 cigs./dia	28.0%		15-25 cigs./dia	13.3%
	>25 cigs./dia	47.0%		>25 cigs./dia	2.0%
Historial familiar de CAI	Només paterns	20.0%	Consum d'alcohol	Gens	39.4%
	Només materns	25.0%		<30 g/dia	50.0%
	Paterns i materns	20.0%		>30 g/dia	10.6%
	Cap	35.0%			
Hipertensió		30.6%	Comunitat de naixement dels avis	Catalunya	27.6%
Mal. Cerebrovasc.		2.1%		Andalusia/Múrcia	40.8%
MVP		15.6%		País Valencià	4.4%
Diabetes	Tipus I	2.0%		Aragó	3.8%
	Tipus II	8.0%		P. Basc/Navarra	1.6%
Exercici	Gens	45.7%		Cantàbria/Astúries	1.6%
	Moderat	34.0%	Lleó/La Manxa	13.2%	
	Fort	20.2%	Extremadura	4.9%	
			Balears	0.6%	
			Altres	1.1%	

Taula III.3. Resum de les dades sobre els antecedents personals i familiars dels 101 malalts de CAI. BMI (Body Mass Index) = (pes en kg) / (alçada en m)². Hipertensió: pressió sistòlica >160 mmHg i/o pressió diastòlica >90 mmHg, diagnosticada més d'una vegada.

PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

Totes les mostres incloses, ja siguin poblacionals o epidemiològiques, van ser extretes mitjançant punció venosa en condicions d'esterilitat per part de personal qualificat. Uns 15-20 ml de sang total van ser recollits en tubs amb citrat sòdic com a anticoagulant i van ser conservats a 4°C fins al moment del seu processament, període que no va ser mai superior a 3 dies.

El tractament de les mostres de sang va incloure:

1. Centrifugació dels tubs durant 3 minuts a 400 g, a una temperatura de 4°C.
2. Separació de les fraccions obtingudes:
 - Sèrum (fase superior): aquesta es guardava a -40°C.
 - Fracció leucocitària (fase intermitja): aquesta es guardava a -40°C per al seu ús posterior per a extracció de DNA.
 - Fracció eritrocítica (fase inferior): aquesta es rentava dues vegades amb un volum 20 cops superior de solució salina (0.9% p/v de NaCl) conservant-se també a -40°C.

Posteriorment a la separació de les fases sanguínies i la seva conservació en congelador, es va procedir a l'extracció de DNA de totes les mostres per tal de poder realitzar les determinacions genètiques.

El DNA necessari per a les anàlisis genètiques va ser extret de la fracció leucocitària seguint diferents protocols d'extracció (resina *Chelex*, *Bio-Rad Laboratories*; kit d'extracció *Nucleon BACC 1*, *Amersham Pharmacia Biotech*; i fenol-cloroform). De tots ells, el que va donar millors resultats (major estabilitat temporal de l'extracte, major integritat del DNA, i una millor eliminació de les proteïnes que poden interferir les reaccions de PCR) va ser el mètode del fenol-cloroform. El protocol seguit en aquest mètode, així com els reactius utilitzats en el mateix, s'indiquen en l'annex 2.

DETERMINACIONS GENÈTIQUES

A partir de les mostres de DNA, el primer pas en la determinació de tots els polimorfismes analitzats va ser l'amplificació per PCR de la regió del genoma que contenia el polimorfisme d'interès (veure condicions generals de l'amplificació a la taula III.4). Aquestes amplificacions van ser realitzades en termocicladors *Perkin-Elmer 9600 (Applied Biosystems)* i *Touchgene Gradient (Techne)* per tots els marcadors, amb l'excepció dels polimorfismes analitzats per *Real Time-PCR*, que van ser amplificats en un *ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems)*. En funció de la metodologia emprada per a la determinació, es poden classificar els polimorfismes analitzats en 4 categories:

- Polimorfismes analitzats per electroforesi directa del producte amplificat: NOS3 ecNOS4a/b.
- Polimorfismes de longitud de fragments de restricció (RFLPs): NOS1 C3391T, NOS2 G-954C, i NOS3 G894T.
- Polimorfismes de tipus microsatèl·lit analitzats mitjançant analitzador de fragments: NOS1 5'-(GT)_n, NOS1 (AAT)_n, NOS1 3'-(GT)_n, NOS2 (CCTTT)_n, NOS2 (AAAT)_n, i NOS3 (CA)_n.
- Polimorfismes analitzats per PCR a temps real (*Real Time-PCR*): NOS2 A300G, NOS2 C150T, NOS3 C-786T, i NOS3 A27C.

La determinació del polimorfisme NOS2 G-954C va ser realitzada a la Universitat de Cagliari (Itàlia) per la Dra. Alessandra Falchi, i les dades han estat cedides per a completar l'anàlisi del següent treball de tesi. Aquest polimorfisme ha estat determinat només en les mostres de famílies amb un fill afectat de CAI i en la població del sud de la Península Ibèrica.

GEN	MARCADOR	OLIGONUCLEÒTIDS	TA	MIX
NOS1	5'-(GT) _n	F: FAM-AGACGTCGCAACCCTCATTA R: CCTGCGTGGCTACTACATTC	60	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X Buffer, DM MgCl ₂ , 2'5 nmol dNTPs (Vt = 25 µl)
	C3391T	F: GTTCTCAGTTTTTGGCCTCG R: TTACCTTGAAGACCTTCTTGCC	61	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X Buffer, 2 n nmol dNTPs (Vt = 25 µl)
	(AAT) _n	F: HEX-AGCTGACTAACTCCAGCTCC R: TGGTGTGTTGGTGAACCAGC	62	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X buffer, 2 n
	3'-(GT) _n	F: HEX-TGCAGGAAGTAGGCACAAGC R: GATCGACACACTTGTGCAGG	62	nmol dNTPs (Vt = 25 µl)
NOS2	(CCTTT) _n	F: HEX-ACCCCTGGAAGCCTACAACACTGCAT R: GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA	50	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X Buffer, 2 n nmol dNTPs (Vt = 25 µl)
	G-954C	F: CATATGTATGGGAATACTGTATTTCA R: TCTGAACTAGTCACTTGAGG	58	250 ng DNA, 10 µl Mix Qiagen (Vt = 25 µl)
	(AAAT) _n	F: FAM-TGGTGCATGCCTGTAGTCC R: GAGGCCTCTGAGATGTTGGTC	62	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X Buffer, DM formamida, 2 mM MgCl ₂ , 5 nmol µl)
	A300G	F: CCAACGTGGAATTCCTCAGGTA R: GTCCACTCTGTCACTCCATCAC	60	20 ng DNA, 1X TaqMan Universal 1X Assay Mix (Vt = 5 µl)
	C150T	F: CCTGGCTTGAGAACTCTGTCATTC R: CGGAGAAAGCTTTACCTGAATTTGT	60	20 ng DNA, 1X TaqMan Universal 1X Assay Mix (Vt = 5 µl)
NOS3	C-786T	F: ACCAGGGCATCAAGCTCTTC R: CCGCAGTCAGCAGAGAGA	60	20 ng DNA, 1X TaqMan Universal 1X Assay Mix (Vt = 5 µl)
	ecNOS4ab	F: AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT R: TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC	56	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X Buffer, DM MgCl ₂ , 5 nmol dNTPs (Vt = 25 µl)
	G894T	F: GCATTCAGCACGGCTGGA R: GCTCCAGGGGCACCTCAA	60	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X Buffer, DM MgCl ₂ , 2'5 nmol dNTPs (Vt = 25 µl)
	(CA) _n	F: NED-TGAGGAGAGACTCAGAATTGGA R: TTGTGTGGGGTTTCAGGCT	60	1 µl DNA, 1 U Taq, 1X Buffer, DM MgCl ₂ , 2'5 nmol dNTPs (Vt = 20 µl)
	A27C	F: TGAGGACGACGGCTTTACC R: CCAGGGTCAGGGTGTTCAG	60	20 ng DNA, 1X TaqMan Universal 1X Assay Mix (Vt = 5 µl)

Taula III.4. Condicions d'amplificació per PCR de tots els marcadors analitzats

POLIMORFISMES ANALITZATS PER ELECTROFORESI DIRECTA DEL PRODUCTE AMPLIFICAT

En aquest grup només va ser analitzat el polimorfisme ecNOS4a/b del gen NOS3, que consisteix en un nombre variable de repeticions d'una seqüència de 27 pb (entre 4 i 6 repeticions en les mostres analitzades). El producte resultant de l'amplificació va ser sotmés directament a electroforesi en un gel d'agarosa al 2% (2h 30' a 150V).

Al final de la migració, els gels es tenyien en una solució de bromur d'etidi (10 mg/ml) durant uns 30 minuts i es visualitzaven els resultats en un transiluminador de llum ultraviolada.

Els fenotips identificats corresponien als genotips dels individus, amb tres al·lels possibles: a (393 pb, corresponent a 4 repeticions), b (420 pb, corresponent a 5 repeticions), i c (447 pb, corresponent a 6 repeticions). A la figura III.2 es mostra una imatge d'una electroforesi d'aquest polimorfisme.

Productes d'amplificació d'individus amb genotip a/a, b/b i b/c van ser seqüenciats per comprovar la fiabilitat de les lectures (veure protocol de seqüenciació a l'annex 2).

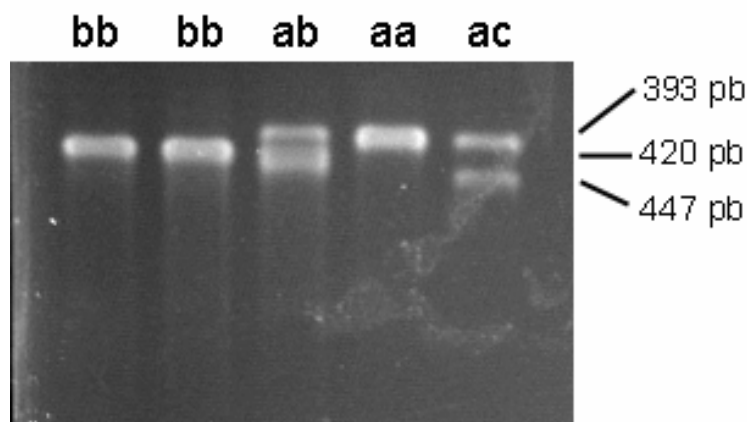


Figura III.2. Fotografia d'una electroforesi per determinar el polimorfisme ecNOS4a/b del gen NOS3. A la part superior del gel es mostren els genotips dels diferents individus i al costat la indicació del tamany de les bandes observades.

POLIMORFISMES DE LONGITUD DE FRAGMENTS DE RESTRICCIÓ (RFLPS)

En aquest grup van ser analitzats els polimorfismes NOS1 C3391T, NOS2 G-954C, i NOS3 G894T.

Un cop amplificada la regió que contenia el polimorfisme a estudiar, aquest producte va ser sotmés a una digestió amb l'enzim de restricció que permetia la distinció entre els dos possibles al·lells de cada marcador. En tots els casos, el resultat de la digestió va ser migrat en un gel d'agarosa al 2% (45' a 120V) i la identificació es va fer sota radiació ultraviolada després d'una tinció del gel en una solució de bromur d'etidi (10mg/ml) durant 30' (vegeu les condicions de digestió i al·lells resultants a la taula III.5). A la figura III.3 es poden observar imatges d'exemple dels gels resultants de l'amplificació i digestió amb enzim de restricció.

POLIMORFISME	ENZIM (nºunitats)	T ^a i TEMPS	AL·LELS DETECTATS
NOS1 C3391T	<i>DraIII</i> (4U)	37°C O.N.	C: 61 i 117 pb T: 179 pb
NOS2 G-954C	<i>BsaI</i> (4U)	50°C 4h	G: 140 i 433 pb C: 573 pb
NOS3 G894T	<i>BanII</i> (4U)	37°C O.N.	G: 53 i 76 pb T: 129 pb

Taula III.5. Condicions d'amplificació dels RFLPs analitzats i els al·lells possibles amb els tamany de les bandes observables.

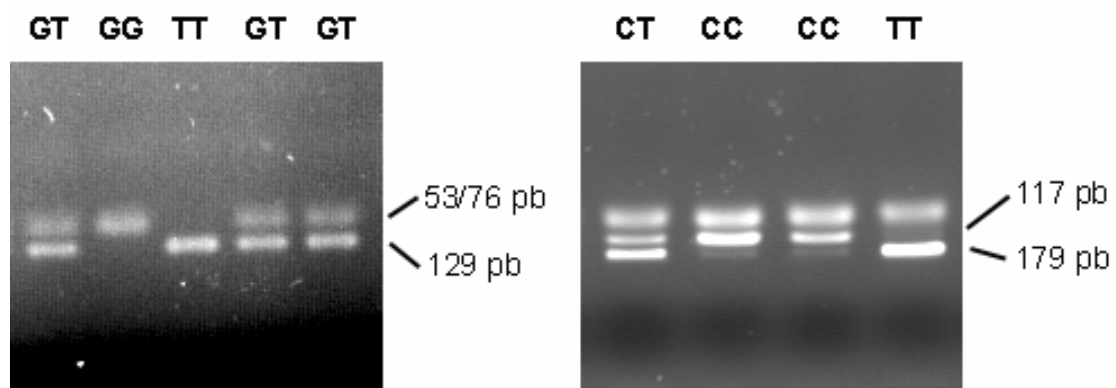


Figura III.3. Fotografia d'electroforesis per determinar els polimorfismes NOS1 C3391T i NOS3 G894T. A la part superior del gel es mostren els genotips dels diferents individus i al costat la indicació del tamany de les bandes observades.

POLIMORFISMES DE TIPUS MICROSATÈL·LIT ANALITZATS MITJANÇANT ANALITZADOR DE FRAGMENTS

En aquest grup van ser analitzats els polimorfismes: NOS1 5'-(GT)_n, NOS1 (AAT)_n, NOS1 3'-(GT)_n, NOS2 (CCTTT)_n, NOS2 (AAAT)_n, i NOS3 (CA)_n.

Aquests marcadors són *Short Tandem Repeats* (STRs) o microsatèl·lits, on la diferència entre els al·lels d'un mateix polimorfisme és deguda al nombre de repeticions d'una petita seqüència, d'entre 2 i 5 nucleòtids en els analitzats, que dona el nom al polimorfisme. Donada l'elevada variabilitat d'aquests marcadors (alguns arriben a presentar més de 20 al·lels) i la precisió requerida per diferenciar entre al·lels (especialment en el cas dels dinucleòtids), es va optar per la seva anàlisi mitjançant amplificació per PCR amb un oligonucleòtid marcat amb fluorescència (NED, HEX o 6-FAM) i posterior detecció dels al·lels a través d'un analitzador de fragments.

El disseny de les parelles d'oligonucleòtids es va fer tenint en compte que els productes d'amplificació dels diferents polimorfismes no tinguessin rangs de mida superposats i, si els rangs eren propers, que estessin marcats amb fluorocroms que emetessin llums de longitud d'ona diferent (grogua per NED, verda per HEX i blava per 6-FAM). Aquest disseny va permetre que cada mostra preparada per l'analitzador de fragments contingués una barreja de productes d'amplificació de diferents microsatèl·lits (generalment 3-4 productes diferents), per tal d'optimitzar les anàlisis i les despeses.

En tots els casos, l'oligonucleòtid marcat corresponia al *forward*, que contenia al seu extrem 5' un fluorocrom. El fluorocrom emprat per cada polimorfisme està indicat amb la seqüència dels oligonucleòtids a la taula III.4. Els STRs NOS1 (AAT)_n, NOS1 3'-(GT)_n van ser amplificats amb una PCR multiplex amb una barreja que contenia les dos parelles d'oligonucleòtids.

Un cop realitzades les amplificacions, es comprovaven amb una electroforesi en gel d'agarosa al 1%. Si les amplificacions havien estat positives, es procedia a la preparació de diferents productes d'amplificació per ser analitzats simultàniament en l'analitzador de fragments, elaborant una solució que contenia:

- 1 µl dels diferents productes d'amplificació (diluits 1/8 en aigua destil·lada);
- 10.5 µl de formamida desionitzada;

- 0.5 µl de marcador de pes molecular *MapMarker 70-400bp* (*Bioventures Inc.*), marcat amb flurocrom ROX.

A continuació, les mostres es sotmetien a 100°C durant 5 minuts per tal de garantir la desnaturalització que la formamida realitza sobre el DNA. Immediatament després, les mostres eren dipositades en gel.

L'analitzador de fragments emprat en les determinacions va ser un seqüenciador de DNA per electroforesi capil·lar *ABI PRISM 3700* (*Applied Biosystems*) dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. En l'analitzador, les mostres eren sotmeses a una electroforesi en capil·lars que contenien el polímer *POP-6* (*Applied Biosystems*) per separar els al·lells de cada polimorfisme en funció de la longitud del número de repeticions. Aquesta separació anava acompanyada per un sistema de lectura que utilitza un làser que excita els fluorocroms que marquen els oligonucleòtids i per un filtre (filtre D, en el present cas) que llegeix la llum emesa per cada fluorocrom. D'aquesta lectura se'n derivaven electroforogrames que van analitzar-se amb els programes *GeneScan 3.5* i *GeneMapper 3.0* (*Applied Biosystems*). L'addició del marcador de pes molecular marcat amb ROX (que emet llum vermella) permetia l'assignació de tamany (en pb) dels al·lells de cada marcador. En la figura III.4 es mostra un exemple d'electroforograma amb la lectura d'alguns dels microsatèl·lits analitzats.

Per tal de confirmar les assignacions dels tamany dels al·lells, es van seqüenciar per cada microsatèl·lit diversos individus homozigots. Poden consultar-se les correspondències entre els tamany de banda amplificats per PCR i el nombre de repeticions que caracteritzen cada al·lel a l'annex 2.

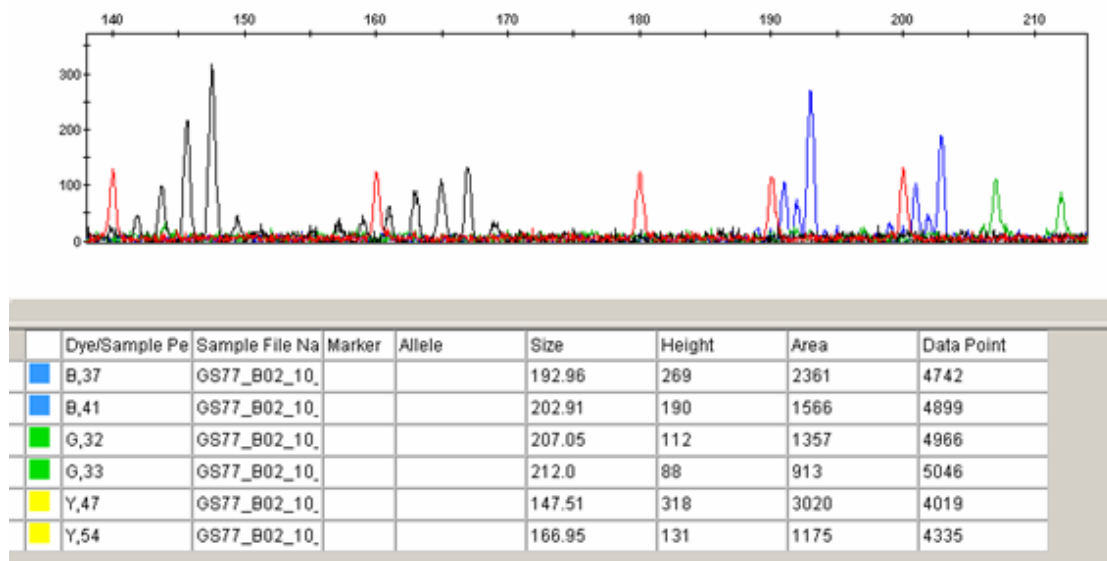


Figura III.4. Electroforograma resultant de l'electroforesi en capil·lar per l'anàlisi dels microsatèl·lits NOS3 (CA)_n, NOS1 5'-(GT)_n i NOS2 (CCTTT)_n representats, respectivament, en color groc/negre, blau i verd. A la part inferior de la imatge pot veure's l'assignació del tamany del fragment en pb que fa el programa GeneMapper 3.0.

POLIMORFISMES ANALITZATS PER PCR A TEMPS REAL (*REAL TIME-PCR*)

Amb aquesta tècnica van analitzar-se els polimorfismes NOS2 A300G, NOS2 C150T, NOS3 C-786T, i NOS3 A27C.

Malgrat que aquests polimorfismes són substitucions puntuals d'un nucleòtid per un altre (SNPs) igual que els analitzats per RFLP, per analitzar-los va preferir-se la metodologia de la PCR a temps real (de l'anglès *Real Time-PCR*). Aquesta tècnica permet la identificació dels genotips dels individus independentment de que la substitució creï o destrueixi una diana de restricció. A més, és òptima per l'anàlisi d'un o més SNPs en un nombre molt elevat de mostres tant per la facilitat per processar un gran volum d'anàlisis en poc temps com pel reduït cost econòmic per mostra (quan el nombre de mostres és superior a unes 500).

Per tal de fer un bon disseny tant dels oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació per PCR com de les sondes *TaqMan-MGB* específiques d'al·lel, va optar-se per què fossin dissenyades i testades per l'empresa *Applied Biosystems (Assays-by-Design Service for SNP Assays)*. Es van remetre al proveïdor les seqüències disponibles a les bases de dades del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>) que inclouen les posicions polimòrfiques a analitzar amb la posició polimòrfica indicada amb els dos al·lells possibles. Els oligonucleòtids dissenyats per l'amplificació estan indicats a la taula III.6 i la seqüència i marcatge de les sondes a la taula III.4.

POLIMORFISME	AL·LEL	SONDES TAQMAN
NOS2 A300G	A	FAM-CCTCAGCCACCGACCAT-MGB
	G	VIC-CTCAGCCGCCGACCAT-MGB
NOS2 C150T	C	VIC-CATGAAGAGCGATTTCT-MGB
	T	FAM-CATGAAGAGCAATTTCT-MGB
NOS3 C-786T	C	FAM-CAGGGTCAGCCGGCCAG-MGB
	T	VIC-CAGGGTCAGCCAGCCAG-MGB
NOS3 A27C	A	VIC-CCCCCAACCCCTG-MGB
	C	FAM-CCCCCACCCTG-MGB

Taula III.6. Descripció de la seqüència i marcatge de les sondes *TaqMan-MGB* emprades en cada anàlisi. A la seqüència s'hi indica, en negreta, la posició que fa específica d'al·lel cada sonda.

La tècnica de la *Real Time-PCR* per genotipar SNPs (o polimorfismes de petites insercions/delecions) consisteix en l'amplificació per PCR de la regió que inclou la posició polimòrfica, afegint a la reacció d'amplificació dues sondes *TaqMan* internes específiques d'al·lel, que contenen:

- un fluorocrom (VIC o 6-FAM) a l'extrem 5' de cada sonda;
- un *minor groove binder* (MGB) a l'extrem 3': aquesta modificació permet una discriminació al·lèlica més acurada en produir diferències en la temperatura de *melting* entre sondes híbrides i no híbrides;
- un *quencher* no fluorescent (NFQ) a l'extrem 3': quan la sonda està intacta, el *quencher* suprimeix l'emissió de fluorescència del fluorocrom.

Durant l'amplificació (figura III.5), la Taq DNA polimerasa elimina només les sondes híbrides completament a la seqüència diana. L'eliminació d'aquestes sondes separa el fluorocrom (que es troba a 5') del *quencher* (que es troba a 3') i això li permet emetre fluorescència (verda per VIC i blava per 6-FAM). Així, els senyals de fluorescència generats per l'amplificació indiquen quins al·lells estan presents a la mostra:

- Fluorescència només per VIC: homocigotat de l'al·lel amb sonda marcada amb VIC;
- Fluorescència només per 6-FAM: homocigotat de l'al·lel amb sonda marcada amb 6-FAM;
- Fluorescència pels dos fluorocroms: heterocigotat.

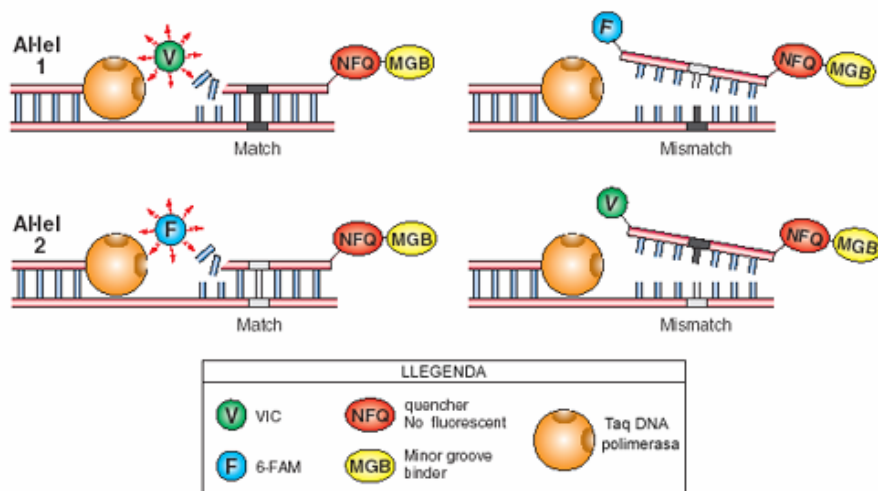


Figura III.5. Resultats possibles segons la coincidència entre sondes i al·lells en un assaig de *Real Time PCR* per genotipar SNPs. Modificat a partir del manual d'*Applied Biosystems* (2003).

En les anàlisis efectuades, van utilitzar-se plaques de 384 pous on es carregaven en cada pou:

- 2.25 µl de DNA (20 ng) de mostra;
- 2.5 µl de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems);
- 0.25 µl de 20X Assay Mix (barreja de primers i sondes TaqMan).

Tot seguit, la placa era amplificada en un termociclador ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Les condicions d'amplificació eren: 2' a 50°C, 10' a 95°C, i 40 cicles de 15" de desnaturalització a 92°C i 1' d'anellament/extensió a 60°C.

Després d'aquesta amplificació, els resultats eren analitzats mitjançant el programa SDS 2.0 (Applied Biosystems) a partir de les lectures de llum emesa que el mateix termociclador mesura. L'assignació de genotips es feia a partir del mateix programa segons les fluorescències que emet cada mostra (veure exemple de la figura III.6).

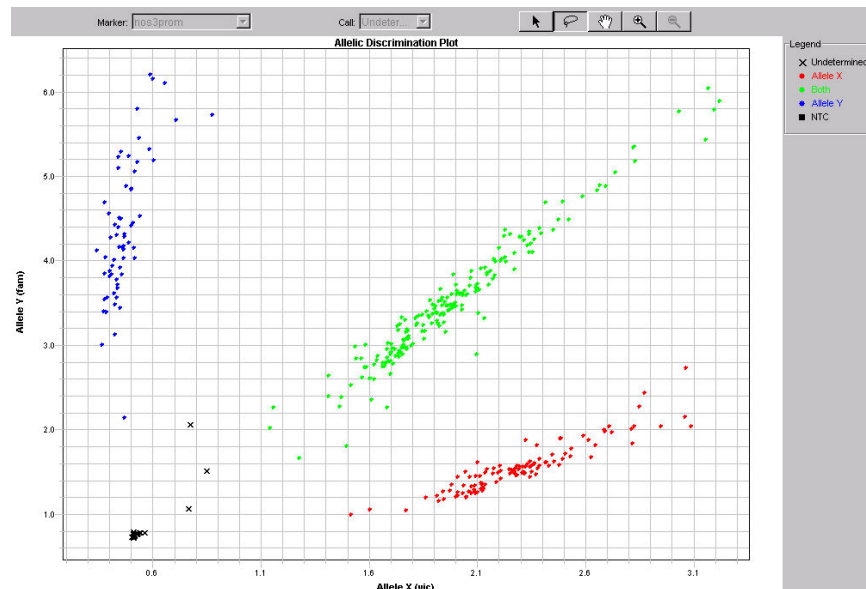


Figura III.6. Resultats de la lectura i anàlisi d'un SNP amb el programa SDS 2.0. Cada eix correspon a la llum emesa per un fluorocrom (VIC a l'eix de les abscisses i 6-FAM al d'ordenades). Els punts vermells corresponen a individus homozigots per l'al·lel amb sonda específica marcada amb VIC; els blaus a homozigots per l'al·lel amb sonda marcada amb 6-FAM; els verds a individus heterozigots; i els negres a controls negatius i individus amb genotip dubtós.

QUANTIFICACIÓ DE NITRATS I NITRITS EN PLASMA

La manifestació clínica de la CAI ve determinada per la influència de molts paràmetres fisiològics que, a la vegada, estan condicionats per variables ambientals i, d'especial interès en aquest treball, per determinants genètics. Per tal de dil·lucidar el paper de gens candidats en la patofisiologia de malalties complexes és essencial, doncs, intentar aclarir la influència d'aquests gens i les seves variants polimòrfiques sobre aquests paràmetres fisiològics que són, de manera més directa, els responsables de l'aparició de la malaltia.

Amb aquest objectiu, s'han analitzat els nivells de nitrats i nitrits (NO_x) en plasma per tal de clarificar la possible influència que sobre aquests tenen els gens i els polimorfismes analitzats. La mesura dels nivells conjunts de nitrats i nitrits és d'especial interès ja que són estimadors de la producció endògena de NO (un cop controlades diferents variables ambientals que poden interferir, com poden ser l'estat de dejú o una patologia renal).

Els nivells de nitrats i nitrits (NO_x) van ser mesurats segons la reacció de Griess (Griess, 1879; Green et al., 1982) després d'una reducció dels nitrats a nitrits. El mètode de Griess es basa en fer reaccionar els nitrits presents a la mostra amb una solució de sulfanilamida i N-(1-naftil)etilendiamina (anomenada solució de Griess). Aquesta reacció genera un producte de coloració porpra que pot ser mesurat per un espectrofotòmetre a 540nm. Donat que aquesta mesura detecta només els nivells de nitrits, anteriorment s'ha de fer una reducció dels nitrats a nitrits amb algun mètode químic o enzimàtic.

En el present cas, la metodologia concreta va correspondre a la descrita per Ricart-Jané et al. (2002) i el protocol es troba a l'annex 2. Aquestes valoracions van ser realitzades a la Unitat de Lípids LPL del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona per Natalia García, sota la supervisió de la Dra. M^a Dolores López.

DETERMINACIONS ESTADÍSTIQUES

Per totes les mostres analitzades les freqüències genotípiques i al·lèliques han estat determinades mitjançant recompte directe. L'ajust a l'equilibri Hardy-Weinberg s'ha realitzat a través d'un test de cadenes de Markov amb 10000 repeticions que es troba implementat al programa *Arlequin 2.000* (Schneider et al., 2000). A més, s'han estimat els índexs de fixació (F_{is}) per tots els *loci* (Weir & Cockerham, 1984).

La diversitat intrapoblacional ha estat estimada amb el càlcul de l'heterozigositat sense biaix (Nei, 1978). Aquesta heterozigositat està corregida per possibles efectes de biaix deguts al mostreig i ha estat calculada mitjançant el programa *GENETIX 4.05* (Belkhir et al., 2004).

La determinació de les freqüències haplotípiques ha estat realitzada de dues maneres diferents depenent de quina mostra es tractava:

- En el cas de la mostra de famílies nuclears amb un fill afectat per CAI, les freqüències haplotípiques van ser reconstruïdes de forma inequívoca en base a la informació aportada pels diferents membres de la família. Aquest mètode ha permès reconstruir els haplotips en la majoria d'individus, obtenint les freqüències haplotípiques reals.
- En les mostres poblacionals s'han utilitzat mètodes de màxima versemblança. Malgrat tractar-se d'una estimació que pot no reflectir les freqüències reals, s'accepta que la seva consistència estadística és elevada per freqüències haplotípiques superiors a 0.005, essent més discutible la seva fiabilitat per haplotips amb freqüències inferiors. Els càlculs han estat realitzats mitjançant l'algoritme EM (*Expectation-Maximization*), implementat al programa *Arlequin 2.000*, que, a partir d'iteracions, obté estimes de màxima versemblança d'haplotips quan la fase gamètica és desconeguda.

DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

La presència de desequilibri de lligament així com la magnitud del mateix ha estat analitzada tant a les mostres poblacionals com a la mostra de famílies nuclears. En el cas de la mostra de 101 famílies, s'ha utilitzat el paràmetre D' (Lewontin, 1964)

per quantificar la magnitud del desequilibri. Aquesta D' és la relativització del paràmetre D de Lewontin i Kojima (1960) en funció del valor màxim de D (D_{\max}) que podria adoptar el *locus* analitzat.

Per les 9 mostres poblacionals no s'ha pogut emprar el mateix algoritme donat que no es coneixien quines eren les freqüències haplotípiques reals. Així, en aquestes mostres es va utilitzar el paràmetre Δ (Black & Krafur, 1985) per les poblacions i parelles de polimorfismes que presentaven desequilibri de lligament significatiu, que es calcula segons la fórmula:

$$\Delta_{ij} = (N/(N-1))((T_{ij}/N) - 2p_i p_j)$$

on N és el número d'individus de la mostra, T_{ij} és el nombre de vegades que l'al·lel i d'un locus apareix juntament amb un altre al·lel j d'un segon locus en el mateix individu, i p_i i p_j són les freqüències d'aquests al·lells. Com que aquest paràmetre és dependent de les freqüències al·lèliques es va optar per fer servir el valor de Δ relativitzat (Δ') al màxim valor possible d'aquest paràmetre (Δ_{\max}) en una mostra determinada (Weir, 1996). En el cas de locus amb més de dos al·lells, per cada parella de loci es va calcular la Δ' seguint el model multial·lèlic d'Eaves et al. (2000).

ANÀLISI POBLACIONAL

L'heterogeneïtat entre les mostres poblacionals analitzades (diversitat interpoblacional) ha estat analitzada a diferents nivells. D'una banda, s'han analitzat les diferències mitjançant un test exacte de diferenciació, anàleg a un test exacte de Fisher, però extès a taules de contingència de qualsevol tamany (Raymond & Rousset, 1995). Els valors de probabilitat associats a cada comparació han estat estimats amb 10000 repeticions de cadena de Markov.

La diversitat interpoblacional ha estat analitzada també amb una anàlisi de la varianza de les freqüències gèniques (AMOVA) a través de l'estadístic F_{ST} de Wright (Wright, 1965). Aquesta anàlisi s'ha realitzat tant a nivell global pel conjunt de les poblacions com de forma jerarquitzada. Aquesta jerarquització permet fer agrupacions de les poblacions per determinar el grau d'estructuració de la variació genètica observada. Així, pot dividir-se la varianza total en una component intragrupal (F_{SC}) i una component intergrup (F_{CT}) (Nei, 1977; Weir & Cockerham,

1984). El test exacte de diferenciació i l'AMOVA han estat realitzats mitjançant el programa *Arlequin 2.000*.

La diferenciació entre les poblacions s'ha analitzat també a través de distàncies genètiques calculades amb el coeficient de Reynolds et al. (1983). Per obtenir la representació espacial d'aquestes distàncies entre parelles de poblacions han estat construïts dendrogrames tipus *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1973) i la robustesa de les branques ha estat examinada amb un test *bootstrap*. Aquestes anàlisis s'han realitzat amb el paquet informàtic PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 1989).

Com a representació gràfica alternativa a l'aportada pels *neighbor-joinings*, s'han realitzat també anàlisis de coordenades principals de les taules de freqüències amb el programa R-Matrix, que permet l'anàlisi r-matrix descrit per Harpending i Jenkins (1973). A més, la regressió lineal entre les heterozigositats de les poblacions i la distància d'aquestes al centre (és a dir, a la població total) pot evidenciar processos de flux genètic o d'aïllament, segons si queden significativament per sobre o per sota, respectivament, d'aquesta línia. Aquesta regressió s'ha calculat i representat gràficament amb el paquet estadístic STATISTICA 4.1 (StatSoft Inc., 1993).

L'existència de barreres genètiques, enteses com a regions de canvi genètic bruscat entre poblacions, va ser estimada mitjançant una anàlisi de xarxes de Delaunay (Brassel i Reif, 1979). Van definir-se parelles de poblacions contigües connectades amb ponts virtuals que contenien les distàncies genètiques entre les poblacions, i les distàncies més grans van unir-se per definir les barreres genètiques de la regió.

ANÀLISI EPIDEMIOLÒGICA

Aquestes anàlisis van ser efectuades sobre la mostra de 101 famílies nuclears amb un fill afectat de CAI. Un cop efectuades les genotipacions dels diferents individus, es va comprovar l'ajust de les famílies a les lleis mendelianes i en 3 casos es van observar famílies en que el genotip del fill no corresponia amb la resta de membres de la família. Aquestes famílies, per tant, van ser eliminades de l'estudi.

El tests de desequilibri de la transmissió van ser realitzats mitjançant el programa informàtic TRANSMIT (Clayton, 1999). Aquest programa calcula tant el TDT clàssic (Spielman et al., 1993) com l'extensió del TDT per marcadors multial·lèlics (Sham i Curtis, 1995), realitza estimacions dels possibles genotips paterns (quan no poden

establir-se inequívocament a partir de la informació de la resta de membres de la família) i permet l'anàlisi d'haplotips complexos. A més, el programa també permet fer una estimació de la probabilitat dels resultats mitjançant un test *bootstrap*. En el present treball, totes les anàlisis de *bootstrap* es van realitzar amb 10000 repeticions.

Paral·lelament, en aquells casos en què s'observaven associacions significatives (o molt properes a la significació) es procedia al càlcul manual del TDT aplicant la fórmula exposada a la introducció. El càlcul manual del TDT aporta el valor afegit de què inclou única i exclusivament la informació d'aquelles transmissions completament inequívokes, mentres que el programa TRANSMIT inclou les inequívokes i estimacions sobre d'altres transmissions. D'altra banda, el càlcul manual té el desavantatge de què, en alguns casos, el nombre de transmissions inequívokes és relativament baix, reduint les possibilitats de detectar associacions.

En els casos en què es calculava el TDT manualment i aportava algun resultat significatiu, va poder-se estimar el risc relatiu (RR) que implica el fet de ser portador d'un al·lel o haplotip determinat respecte el fet de no ser-ne (Dobrusin et al., 2001) segons la fórmula:

$$RR = T / NT$$

on T representa el nombre de transmissions de l'al·lel o haplotip per pares informatius als fills afectats, i NT el nombre de no transmissions. Pels valors de RR va calcular-se, a més, el seu interval de confiança del 95% (IC 95%).

Per tots els marcadors bial·lèlics va calcular-se el poder estadístic de la mostra. Aquest poder estadístic equival a 1- β , on β és la probabilitat d'error de tipus II, és a dir, a la probabilitat de no detectar associacions d'un grau d'intensitat determinat (risc relatiu) entre alguna variant al·lèlica i la malaltia estudiada quan en veritat sí que n'hi ha. Per convenció, es considera que poders estadístics de la mostra superiors al 80% són desitjables per descartar un efecte important de l'al·lel considerat.

Els càlculs han estat realitzats en base a la freqüència de l'al·lel menys freqüent en la submostra de pares, assumint un error de tipus I (α) de 0.05 i un error de tipus II (β) inferior al 20% i al 10%. Amb aquest poder, va estimar-se el risc relatiu (RR) a

partir del qual pot descartar-se un paper de l'al·lel analitzat. Els càlculs van ser efectuats mitjançant el programa TDT-PC (Chen i Deng, 2001).

L'anàlisi dels nivells de nitrats i nitrits (NO_x) va realitzar-se mitjançant el paquet estadístic SPSS 10.0 (Norusis, 1992) amb una anàlisi de Model Lineal General (GLM). Per aquesta anàlisi, va realitzar-se *a priori* proves de Kolmogorov-Smirnov per comprovar la normalitat de la variable (requisit indispensable per utilitzar-se en el model). A més, va tenir-se en compte el possible efecte sobre aquests paràmetres de diferents covariables i variables independents (veure el corresponent capítol de resultats).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

RESULTATS ESTUDI POBLACIONAL

En aquest apartat es presenten els resultats de l'anàlisi de la variació dels gens NOS1, NOS2 i NOS3 en les 9 mostres poblacionals examinades. Aquests resultats estan estructurats per gen i inclouen la informació rellevant sobre la variació al·lèlica, el desequilibri de lligament i la variació haplotípica.

A les taules i figures, en els apartats de resultats i discussió s'han utilitzat les següents abreviatures dels noms de les poblacions: N-IBER (Nord Península Ibèrica), C-IBER (Centre Península Ibèrica), S-IBER (Sud Península Ibèrica), M-ATL (Mig Atlas), A-ATL (Alt Atlas), SAR-C (Sardenya Costa), SAR-I (Sardenya Interior), S-FRA (Sud França), i ALEM (Alemanya).

GEN NOS1

VARIACIÓ AL·LÈLICA

DIVERSITAT INTRAPOBLACIONAL

A la taula IV.1 es mostren les freqüències dels 4 polimorfismes analitzats en el *locus* NOS1 en les poblacions. Les freqüències dels microstèl·lits es presenten també a la figura IV.1, on s'observen diferents distribucions: trimodal (5'-(GT)_n), bimodal ((AAT)_n) i unimodal (3'-(GT)_n). No s'observen desviacions importants de l'equilibri Hardy-Weinberg, amb l'excepció del marcador C3391T en la població del Sud de la Península, deguda a un defecte d'heterozigots tal com evidencia el valor de l'índex de fixació (F_{is}) de 0.306 ($p=0.0007$).

El dinucleòtid 5'-(GT)_n mostra les freqüències repartides bàsicament al voltant de tres al·lèls (els de 19, 24 i 30 repeticions). D'un total de disset al·lèls observats, les poblacions en mostren entre 9 i 13. Cal destacar com a població més diversa la de l'Alt Atlas, amb una heterozigositat de 0.860, i com a menys diverses les dues mostres sardes (H_{nb} de 0.798 i 0.802, per la costa i l'interior, respectivament).

Per al marcador (AAT)_n s'ha observat un total de 9 al·lèls diferents, d'entre 8 i 16 repeticions, però tres al·lèls (els de 10, 13 i 14 repeticions) concentren la majoria de la variació. Un altre cop, les poblacions més diverses són les berbers del Mig i Alt Atlas (H_{nb} de 0.731 i 0.715, respectivament), que contrasten amb les menys diverses, de Sardenya (H_{nb} de 0.631 i 0.641, per la costa i l'interior).

El SNP analitzat en el gen NOS1, el C3391T de l'exó 18, mostra una notable variació en la distribució de freqüències entre les diferents poblacions. La freqüència de l'al·lel C varia des d'un mínim de 0.462, en la mostra del Centre de la Península, fins a 0.706 en la mostra de l'interior de Sardenya. Aquesta variació permet fer una primera separació de les poblacions entre aquelles que presenten freqüències del'al·lel C de 0.46-0.55 (Centre i Sud de la Península, i Mig Atles) i aquelles que en presenten de 0.63-0.70 (la resta).

El microsatèl·lit 3'-(GT)_n s'ha revelat com el marcador menys variable d'entre els analitzats en aquesta regió. S'han observat un total d'onze al·lells diferents, però l'al·lel de 17 repeticions té una freqüència d'entre 0.763 (en el Mig Atles) i 0.915 (en la costa de Sardenya). Aquest fet determina que les heterozigositats oscil·lin entre 0.161 i 0.401, en aquestes dues poblacions.

En general, de la distribució de les freqüències al·lèliques pot destacar-se la menor diversitat de les poblacions sardes, reflexada per presentar les heterozigositats més baixes del conjunt en la pràctica totalitat dels polimorfismes aquí analitzats.

Taula IV.1. (pàgina següent) Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS1 analitzats en les diferents poblacions. H_{nb} : heterozigositat estimada sense biaix (non-biased); HW (p): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg.

MARC.		N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
5'-(GT) _n	18		0.010						0.005	
	19	0.188	0.150	0.158	0.106	0.104	0.152	0.160	0.156	0.220
	20	0.022	0.065	0.031	0.106	0.076	0.018	0.020	0.038	0.085
	21	0.011								
	23	0.027	0.005		0.005	0.021	0.012			
	24	0.231	0.185	0.294	0.255	0.160	0.207	0.293	0.263	0.232
	25	0.016	0.040	0.022	0.032	0.028	0.012	0.020	0.027	0.024
	26	0.005	0.015	0.018	0.011	0.049				0.024
	27		0.005						0.005	
	28	0.102	0.085	0.118	0.069	0.090	0.061	0.087	0.156	0.098
	29	0.097	0.095	0.118	0.112	0.201	0.110	0.107	0.086	0.061
	30	0.263	0.315	0.215	0.266	0.222	0.342	0.267	0.242	0.232
	31	0.016	0.015	0.022	0.011	0.007	0.085	0.013	0.022	0.024
	32	0.016		0.004	0.027	0.042		0.013		
	33	0.005	0.015							
		34							0.013	
	35							0.007		
	N	93	100	114	94	72	82	75	93	41
	H _{nb}	0.8242	0.8253	0.8158	0.8266	0.8603	0.7984	0.8023	0.8178	0.8323
	HW (p)	0.0644	0.1965	0.1245	0.2259	0.0252	0.5413	0.9455	0.2803	0.0652
(AAT) _n	8				0.038	0.007			0.006	
	9	0.052	0.020	0.032	0.010	0.020	0.031	0.043	0.066	0.083
	10	0.479	0.495	0.455	0.386	0.441	0.531	0.525	0.489	0.448
	11	0.016	0.005	0.014	0.010	0.020	0.012	0.012	0.017	0.000
	12	0.010	0.015	0.018	0.033	0.007	0.006		0.006	0.010
	13	0.201	0.260	0.250	0.162	0.197	0.111	0.099	0.159	0.323
	14	0.196	0.174	0.205	0.305	0.224	0.278	0.272	0.209	0.115
	15	0.046	0.031	0.027	0.048	0.072	0.031	0.049	0.050	0.021
	16				0.010	0.013				
	N	97	98	110	105	76	81	81	91	48
	H _{nb}	0.6898	0.6590	0.6899	0.7305	0.7151	0.6305	0.6407	0.6885	0.6816
	HW (p)	0.0775	0.1986	0.8448	0.5555	0.2629	0.3923	0.0331	0.3685	0.7781
C3391T	C	0.695	0.462	0.530	0.548	0.627	0.661	0.704	0.682	0.632
	T	0.305	0.538	0.470	0.452	0.373	0.340	0.297	0.318	0.368
	N	105	93	118	93	63	81	86	77	38
	H _{nb}	0.4258	0.4999	0.5004	0.4980	0.4715	0.4513	0.4196	0.4367	0.4716
	HW (p)	0.6416	0.4049	0.0007	0.0351	0.4263	0.3318	1.0000	0.7952	0.1826
3'-(GT) _n	11			0.005						
	14			0.010						
	15	0.004		0.005	0.027	0.014				
	16		0.016	0.015	0.005		0.011	0.044	0.016	0.010
	17	0.838	0.799	0.845	0.763	0.811	0.915	0.894	0.842	0.786
	18	0.083	0.098	0.049	0.121	0.128	0.048	0.050	0.074	0.112
	19	0.004		0.010	0.022	0.020	0.016		0.005	0.020
	20	0.009			0.022	0.007				
	21	0.040	0.016	0.058	0.040	0.020	0.011	0.011	0.053	0.071
	22	0.022	0.057						0.011	
	23		0.016	0.005						
	N	114	97	103	112	74	94	90	95	49
	H _{nb}	0.2904	0.3499	0.2817	0.4011	0.3273	0.1611	0.1965	0.2838	0.3682
	HW (p)	0.2015	0.7544	0.4285	0.2067	0.1596	0.1548	0.4846	0.8012	0.8488

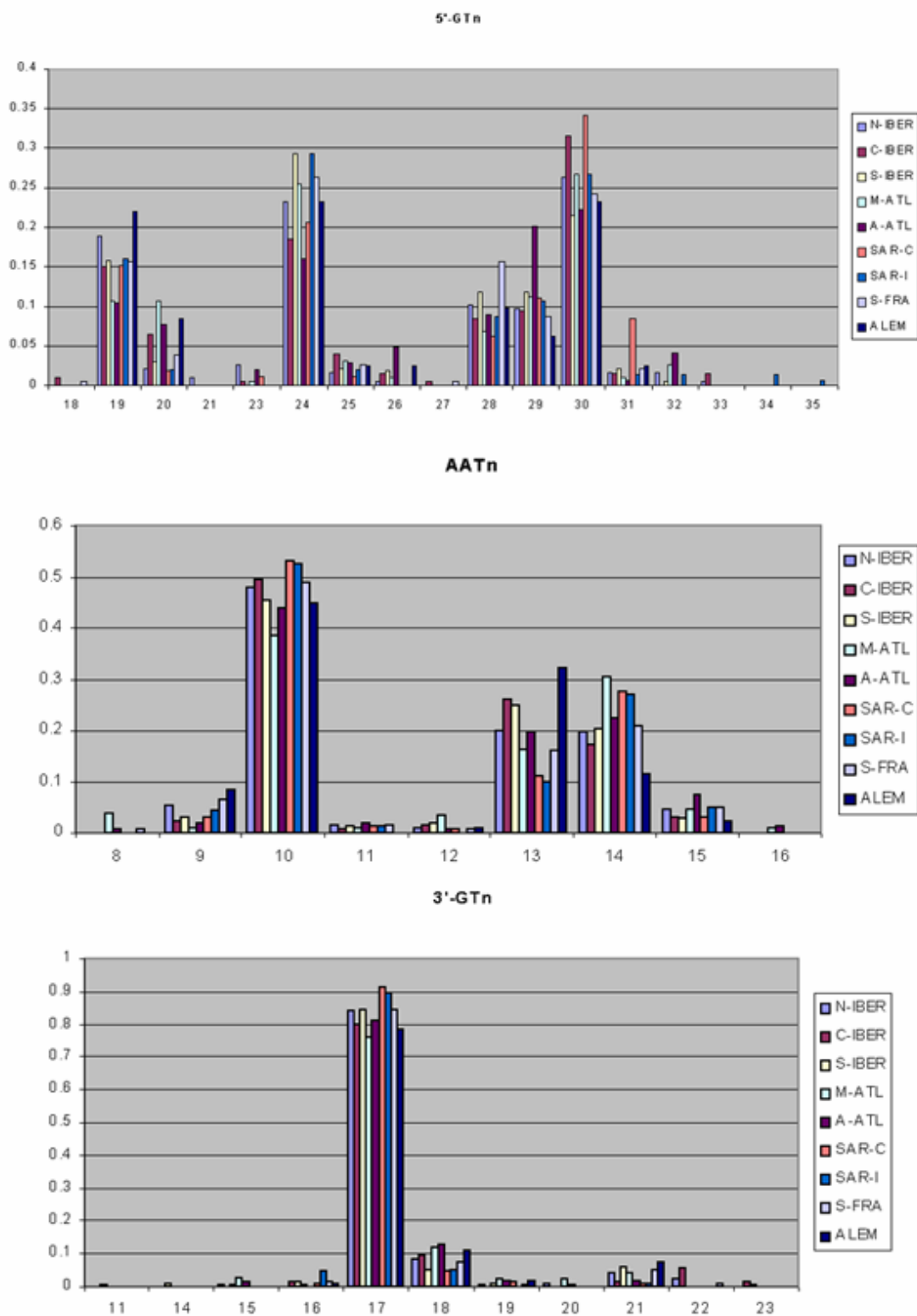


Figura IV.1. Distribució de les freqüències al·lèliques dels microsatèl·lits del gen NOS1 a les poblacions estudiades.

DIVERSITAT INTERPOBLACIONAL

A la taula IV.2 es mostren els resultats del test exacte de diferenciació entre parelles de poblacions per al conjunt de freqüències al·lèliques dels marcadors del *locus* NOS1. El test global de diferenciació pel conjunt de poblacions i *loci* ha resultat significatiu ($p < 0.00001$).

Les mostres que han mostrat més comparacions significatives són les del Sud de la Península i la de la Costa de Sardenya. La població S-IBER es diferencia de les mostres de l'Alt Atlas, Costa de Sardenya i Alemanya. Per la seva banda, la mostra SAR-C es diferencia del Centre i Sud de la Península i del Mig Atlas.

D'altra banda, les poblacions del Nord de la Península i de la Costa de Sardenya no mostren diferències amb cap altra població.

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA
C-IBER	0.33160							
S-IBER	0.25450	0.06490						
M-ATL	0.06955	0.17145	0.10645					
A-ATL	0.23495	0.07835	0.01845	0.21210				
SAR-C	0.11225	0.02180	0.03705	0.02885	0.05875			
SAR-I	0.46375	0.25520	0.08720	0.45145	0.34135	0.27330		
S-FRA	0.88600	0.10695	0.36990	0.00200	0.10955	0.09420	0.25365	
ALEM	0.48160	0.28170	0.00505	0.08510	0.08040	0.27175	0.39930	0.22855

Taula IV.2. Diferenciació entre parells de poblacions per als marcadors del gen NOS1. Es mostren els valors de significació (p) del test exacte de diferenciació.

L'anàlisi de cada polimorfisme per separat mostra que tots ells presenten diferències significatives en el conjunt de poblacions ($p < 0.00001$, pels quatre marcadors examinats). Destaca, en general, la població del Mig Atlas com una de les més diferenciades, en ser-ho per tres dels quatre marcadors analitzats ((AAT)_n, C3391T i 3'-(GT)_n).

Una anàlisi de la varianza de les freqüències al·lèliques torna a evidenciar variació significativa dels quatre polimorfismes (tots ells amb probabilitats inferiors a 0.001). Els valors de F_{ST} varien entre els diferents marcadors, prenent valors de 0.54, 0.97, 2.75 i 1.05%, pels polimorfismes 5'-(GT)_n, (AAT)_n, C3391T i 3'-(GT)_n, respectivament. Destaca la substitució C3391T per tenir la F_{ST} més alta (amb un

valor del 2.75%), comparat amb els altres marcadors (que arriben com a màxim al 1.05%).

El valor promig de F_{ST} pel conjunt dels marcadors és de 1.16 ($p < 0.00001$). Aquest valor global no es veu substancialment afectat si s'eliminen de l'anàlisi les poblacions berbers o les sardes (les que *a priori* podrien semblar més diferenciades). Només és destacable la pèrdua de significació ($p = 0.0704$) del marcador 5'-(GT)_n en eliminar les mostres berbers marroquís de l'AMOVA.

Una anàlisi jeràrquica de la variança indica que el model d'agrupacions més plausible és el format per tres grups: Europa continental (les tres mostres de la Península Ibèrica, Sud de França i Alemanya), Sardenya i Berbers de Marroc. Aquest model dona un valor de diversitat gènica total (F_{ST}) de 1.36 ($p < 0.00001$), on predomina la diversitat dins els grups ($F_{SC} = 0.78$, $p < 0.00001$) per damunt de la diversitat entre grups ($F_{CT} = 0.58$, $p = 0.0411$), tot i assolir el llindar de significació.

Les relacions de distància genètica entre parelles de poblacions s'han expressat mitjançant una anàlisi de coordenades principals (PCA), representat a la figura IV.2. Aquesta anàlisi ha explicat el 52.79% de la variança en les dues primeres coordenades i posa de manifest una separació de les poblacions berbers de la resta, juntament amb una certa particularitat de les poblacions de Sardenya i del Centre de la Península. La primera coordenada (29.30% de la variació total) mostra un separació gradual de les mostres, amb les berbers i les sardes en els extrems. La segona coordenada (23.49% de la variació) també distribueix les poblacions en un gradient, remarcant lleugerament la diferenciació de les mostres nord-africanes i C-IBER de la resta. La distribució poblacional associada a la primera coordenada es veu especialment influenciada per les freqüències del polimorfisme C3391T. La resta de polimorfismes no semblen indicar un patró de diferenciació poblacional tan marcat.

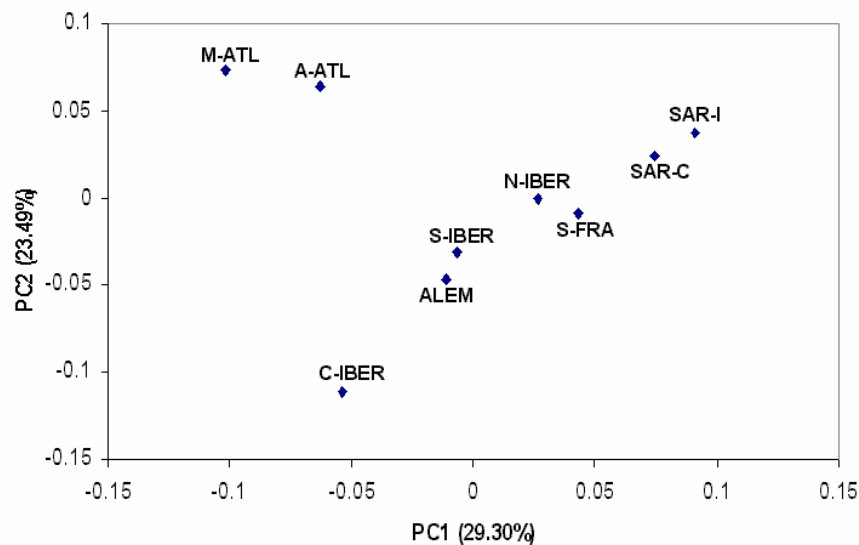


Figura IV.2. Coordenades principals de les distàncies genètiques per als polimorfismes del gen NOS1.

COMPARACIÓ AMB D'ALTRES POBLACIONS

En general, les dades disponibles sobre la variació dels polimorfismes estudiats al gen NOS1 (taula IV.3) són relativament escasses i, per alguns dels microsatèl·lits, els articles publicats no aporten les dades de freqüències sinó només per rangs de mida dels al·lels. A més, s'ha de tenir en compte que les dades disponibles corresponen a estudis epidemiològics i les freqüències al·lèliques corresponents a les mostres controls (en el cas d'estudis cas-control) han de ser utilitzades amb precaució, ja que els criteris emprats per garantir l'homogeneïtat poblacional dels individus no són els mateixos que habitualment s'utilitzen en els estudis de genètica de poblacions humanes.

Sobre el microsatèl·lit 5'-(GT)_n, les úniques dades trobades a la bibliografia són corresponen a una mostra d'individus britànics. Encara que amb petites diferències, aquestes dades mostren una distribució de freqüències semblant a la detectada en les poblacions analitzades en aquest treball, amb una freqüència agrupada al voltant dels al·lels de 19, 24, 28 i 30 repeticions.

Pel trinucleòtid (AAT)_n, s'han recollit de la bibliografia dades sobre la variació d'aquest microsatèl·lit en mostres de britànics, francesos, pacients caucàsics de fibrosi quística i caucàsics sans. Aquestes dades indiquen una baixa variació de les freqüències al·lèliques entre poblacions d'origen caucàsic. Per contra, una mostra

d'afroamericans mostra un patró de distribució diferent, amb una freqüència de l'al·lel de 10 repeticions de 0.110 (en contraposició a les freqüències de 0.44-0.53 observades en les poblacions d'origen europeu) i freqüències de 0.338 i 0.114 pels al·lells de 14 i 15 repeticions (que són de 0.11-0.20 i 0.02-0.06, respectivament, en les poblacions europees). Les poblacions berbers analitzades presenten un patró que s'aproxima al de la mostra d'afroamericans, tot i que lleugerament atenuat.

En relació al polimorfisme C3391T, s'han descrit freqüències de l'al·lel T de 0.33-0.37 en mostres de caucàsics, alemanys i suecs i francesos. Aquestes freqüències s'emmarquen en el rang de variació observat per la majoria de poblacions analitzades en aquest estudi, i fan destacar encara més les freqüències de l'al·lel T presentades per les poblacions del Centre i Sud de la Península i del Mig Atlas (0.45-0.54).

Referència	N	Origen	Freqüències al·lèliques									
5'-(GT) _n			19	20	24	28	29	30	31	33		
Chung et al., 1996	60	UK	0.200	0.028	0.182	0.173	0.090	0.282	0.027	0.009		
(AAT) _n			7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Chung et al., 1996	110	UK	0.000	0.009	0.082	0.463	0.005	0.009	0.227	0.141	0.050	0.014
Twells et al., 1995	88	França	0.000	0.000	0.017	0.526	0.000	0.017	0.267	0.155	0.017	0.000
Grasemann et al., 2000	75	Pacients CF	0.000	0.000	0.047	0.453	0.007	0.013	0.220	0.193	0.060	0.007
Grasemann et al., 1999a	105	Afroameric.	0.019	0.010	0.033	0.110	0.038	0.110	0.214	0.338	0.114	0.014
Grasemann et al., 1999a	305	Caucàsics	0.003	0.003	0.053	0.438	0.010	0.010	0.267	0.161	0.053	0.003
C3391T			C	T								
Grasemann et al., 1999b	228	Caucàsics	0.670	0.330								
Immervoll et al., 2001	127	Alemanya/ Suècia	0.633	0.367								
Levecque et al., 2003	482	França	0.675	0.325								
3'-(GT) _n			14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Grasemann et al., 1999a	105	Afroameric.	0.000	0.067	0.043	0.405	0.295	0.133	0.014	0.038	0.005	0.000
Grasemann et al., 1999a	305	Caucàsics	0.000	0.002	0.005	0.770	0.123	0.015	0.013	0.071	0.002	0.000
Takahashi et al., 1997	147	Japó	0.000	0.207	0.010	0.650	0.116	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000

Taula IV.3. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS1 recollides de la bibliografia.

La variació prèviament descrita pel microsatèl·lit 3'-(GT)_n mostra diferències amb l'aportada per les poblacions aquí analitzades. L'al·lel de 17 repeticions representa

el 77% de la freqüència en caucàsics de Boston, el 40.5% en afroamericans, i el 62% en japonesos; a més, l'al·lel de 18 repeticions presenta freqüències de 0.12, en caucàsics i japonesos, i 0.30, en afroamericans. La freqüència de l'al·lel de 17 repeticions és superior en gairebé totes les poblacions analitzades en aquest treball. Únicament la mostra d'Alemanya (amb freqüències de 0.79 i 0.11, pels al·lells de 17 i 18 repeticions, respectivament), mostra un patró de freqüències semblant al presentat pels caucàsics de Boston. La resta de poblacions presenta una diversitat menor que aquestes dues poblacions, i molt menor que les mostres de japonesos i afroamericans.

DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT

La presència de desequilibri de lligament entre totes les parelles de polimorfismes s'ha estimat mitjançant el mètode descrit per Black i Krafur (1985), implementat en el programa GENETIX. Els valors de Δ' han estat calculats per les parelles de polimorfismes i poblacions que presentaven desequilibri de lligament significatiu. Els resultats principals es mostren a la figura IV.3 i a la taula IV.4. Cal remarcar que en el conjunt de tots els individus estudiats, totes les anàlisis entre parelles de marcadors mostren un considerable desequilibri de lligament ($p < 0.001$ per totes les comparacions).

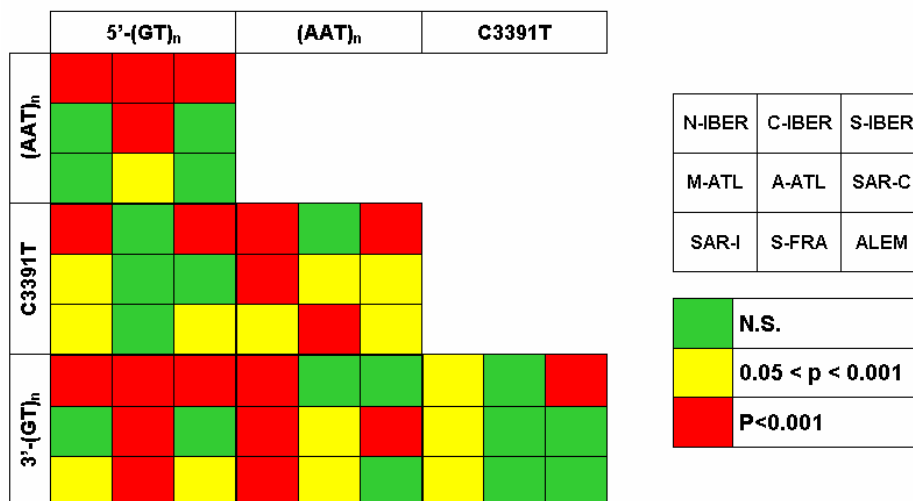


Figura IV.3. Representació del desequilibri de lligament detectat entre marcadors del gen NOS1 en les diferents poblacions analitzades. El color indica el grau de significació del desequilibri de lligament codificat com recull la llegenda.

La distribució del desequilibri de lligament entre poblacions indica que la població que mostra un major grau de desequilibri de lligament al llarg del *locus* NOS1 és la del Nord de la Península, ja que és l'única que presenta desequilibri de lligament significatiu per totes les parelles de marcadors amb valors de Δ' d'entre els més elevats. S-IBER i SAR-I mostren també un remarcable desequilibri de lligament.

D'altra banda, les poblacions que mostren menys desequilibri de lligament són les de C-IBER, SAR-C i ALEM.

		N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
5'-(GT) _n / (AAT) _n	Δ'	0.2643	0.3220	0.2379	-	0.2383	-	-	0.2231	-
	p	0.0001	0.0007	0.0001	0.1736	0.0001	0.4794	0.4371	0.0061	0.0557
	N	82	83	104	81	68	72	68	88	40
5'-(GT) _n / C3391T	Δ'	0.2920	-	0.2146	0.1885	-	-	0.2064	-	0.3615
	p	0.0010	0.0840	0.0005	0.0067	0.2027	0.4769	0.0267	0.5282	0.0075
	N	88	79	112	78	59	71	71	74	32
5'-(GT) _n / 3'-(GT) _n	Δ'	0.3282	0.3102	0.2801	-	0.3653	-	0.3898	0.2872	0.2336
	p	0.0001	0.0001	0.0004	0.9743	0.0001	0.7307	0.0024	0.0003	0.0047
	N	93	82	99	87	65	82	75	92	41
(AAT) _n / C3391T	Δ'	0.3124	-	0.3448	0.2999	0.2495	0.2254	0.2444	0.3113	0.3349
	p	0.0001	0.0547	0.0001	0.0001	0.0161	0.0047	0.0069	0.0001	0.0054
	N	92	83	108	86	62	70	76	72	37
(AAT) _n / 3'-(GT) _n	Δ'	0.1516	-	-	0.2728	0.1699	0.2993	0.2233	0.2167	-
	p	0.0001	0.4519	0.1035	0.0001	0.0014	0.0001	0.0001	0.0209	0.6456
	N	97	87	101	102	70	81	80	90	48
C3391T / 3'-(GT) _n	Δ'	0.1142	-	0.4422	0.1298	-	-	0.3010	-	-
	p	0.0290	0.2671	0.0004	0.0138	0.1322	0.7581	0.0165	0.2609	0.2437
	N	105	86	101	91	59	80	83	76	38

Taula IV.4. Valors de Δ' , probabilitats de desequilibri de lligament i nombre d'individus per les parelles de marcadors del gen NOS1.

Pel que fa a les parelles de marcadors, la que mostra un major grau de desequilibri de lligament és la formada pel trinucleòtid (AAT)_n i el SNP C3391T. Aquests dos polimorfismes presenten desequilibri de lligament en totes les poblacions excepte en la del Centre de la Península. No resulta sorprenent donat que aquests dos són els marcadors que es troben més propers entre sí (16.12 Kb). El que resulta remarcable és el desequilibri de lligament observat entre els dinucleòtids 5'-(GT)_n i 3'-(GT)_n; malgrat que aquests dos marcadors es troben separats per unes 147 Kb, totes les poblacions excepte Mig Atlas i Costa de Sardenya mostren un desequilibri de lligament significatiu.

A l'altre extrem es troba la parella C3391T/3'-(GT)_n, que només presenta desequilibri de lligament en quatre de les poblacions, en algunes de les quals amb els valors més baixos de Δ' (0.1142 i 0.1248, per exemple, en les mostres de N-IBER i M-ATL).

VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

El desequilibri de lligament detectat entre totes les parelles de polimorfismes permet una anàlisi de la variació haplotípica poblacional per determinar quina és la informació que podia reportar sobre les relacions entre les poblacions.

A fi d'evitar un nombre excessiu d'haplotips, la majoria amb freqüències molt baixes, que podrien ser poc informatius, s'ha optat per analitzar dos sistemes haplotípics que inclouen l'únic SNP genotipat en aquest *locus*. Així, s'han analitzat els haplotips formats per les parelles (AAT)_n/C3391T i C3391T/3'-(GT)_n.

Les freqüències haplotípiques han estat estimades per un algoritme de màxima versemblança implementat al programa Arlequin i, tenint en compte la dinàmica de distribució de les freqüències al·lèliques, s'han agrupat els haplotips que presentaven freqüències inferiors al 5%. Les freqüències haplotípiques utilitzades en els càlculs es mostren a la taula IV.5.

L'anàlisi de la varianza a partir de les freqüències haplotípiques de cada sistema per separat, ha revelat uns valors de F_{ST} significatius per ambdós sistemes. L'haplotip (AAT)_n/C3391T ha mostrat un valor de 1.65% ($p < 0.00001$), i el C3391T/3'-(GT)_n de 1.11% ($p = 0.001$).

Per tal d'estudiar les relacions interpoblacionals, s'ha optat per analitzar només la informació aportada per la parella (AAT)_n/C3391T. Donat que tots dos sistemes haplotípics comparteixen el polimorfisme C3391T, l'elecció de la parella (AAT)_n/C3391T es justifica tant pel fet d'haver mostrat el grau de desequilibri de lligament més elevat i consistent al llarg de les poblacions com per presentar valors de diversitat total més elevats.

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
(AAT) _n /C3391T									
<10/C	0.039	0.029	0.026		0.028	0.040	0.024	0.074	0.079
10/C	0.481	0.312	0.337	0.321	0.404	0.451	0.484	0.489	0.436
11-12/C	0.013	0.015	0.035	0.021	0.028	0.016	0.015	0.007	0.016
13/C	0.052	0.097	0.044	0.060	0.091	0.027	0.038	0.031	0.115
>13/C	0.121	0.024	0.084	0.126	0.089	0.142	0.093	0.076	0.016
<10/T				0.056	0.009		0.030		0.018
10/T	0.032	0.188	0.116	0.060	0.013	0.105	0.039	0.041	
11-12/T		0.007	0.002	0.007		0.008		0.015	
13/T	0.153	0.175	0.214	0.123	0.067	0.077	0.062	0.094	0.175
>13/T	0.110	0.152	0.142	0.226	0.273	0.136	0.215	0.174	0.145
C3391T/3'(GT) _n									
C/<17	0.006	0.011	0.005	0.021			0.060	0.022	
C/17	0.586	0.401	0.487	0.437	0.524	0.611	0.548	0.596	0.532
C/>17	0.112	0.066	0.039	0.070	0.115	0.064	0.046	0.058	0.129
T/<17		0.011	0.026	0.007	0.019	0.008	0.002		0.016
T/17	0.253	0.385	0.360	0.317	0.254	0.302	0.337	0.272	0.226
T/>17	0.042	0.126	0.082	0.148	0.089	0.016	0.008	0.052	0.097

Taula IV.5. Freqüències haplotípiques de les parelles de polimorfismes (AAT)_n/C3391T i C3391T/3'(GT)_n. Les freqüències dels haplotips han estat agrupades segons el nombre de repeticions del microsatèl·lit.

L'anàlisi de coordenades principals per la informació d'aquesta combinació haplotípica explica, en les dues primeres coordenades, el 61.82% de la variabilitat del sistema (figura IV.4). La primera coordenada principal marca una separació entre les poblacions del Centre i el Sud de la Península Ibèrica respecte a la resta de poblacions. Aquesta separació ve marcada per la distribució de les freqüències dels haplotips 10/T i 10/C, entre d'altres. La segona coordenada principal separa la mostra del Mig Atlas marroquí de la resta de poblacions. Aquesta població es desmarca, principalment, per les freqüències dels haplotips <10/C i <10/T.

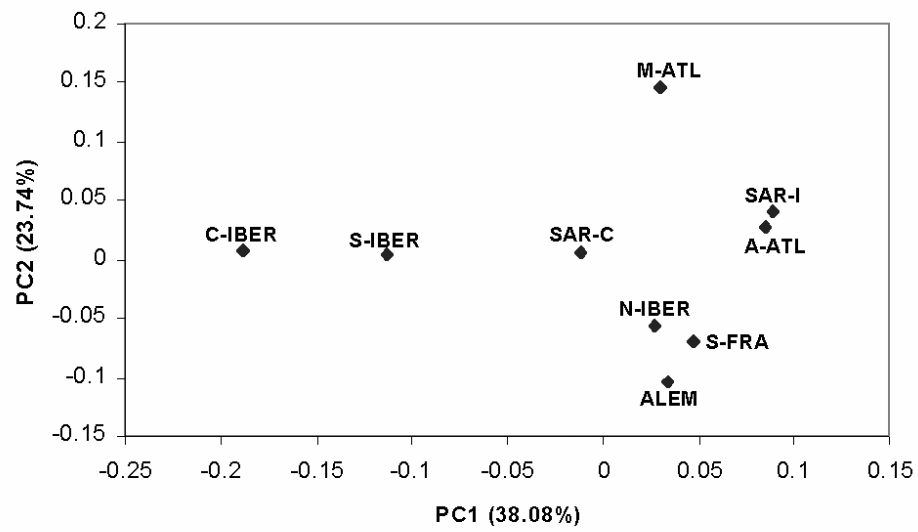


Figura IV.4. Anàlisi de coordenades principals a partir de la informació del sistema haplotípic $(AAT)_n/C3391T$.

GEN NOS2

VARIACIÓ AL·LÈLICA

DIVERSITAT INTRAPOBLACIONAL

En la taula IV.6 es mostra la distribució de les freqüències al·lèliques en els polimorfismes analitzats en el *locus* NOS2. Les distribucions genotípiques de tots els marcadors s'han ajustat a l'equilibri Hardy-Weinberg.

Com era d'esperar, el pentanucleòtid (CCTTT)_n de la regió promotora ha estat el marcador que ha presentat una variabilitat més elevada. Mostra uns valors d'heterozigositat que oscil·len entre 0.772, corresponent a la mostra del Sud de França, i 0.858, per als berbers del Mig Atlas, i presenta un total d'onze al·lells. No s'han observat grans diferències en el nombre d'al·lells presents en cada població. En totes les poblacions, l'al·lel més freqüent és el 12 repeticions, excepte en la població costanera de Sardenya. En les poblacions berbers del Marroc (del Mig i Alt Atlas), les freqüències es distribueixen més homogèniament entre els diferents al·lells, cosa que es constata en les seves heterozigositats, les més elevades d'entre totes (0.858 i 0.853, respectivament). Aquesta diferència es posa de manifest en observar el gràfic de les freqüències al·lèliques del pentanucleòtid a la figura IV.5.

D'altra banda, cal remarcar la baixa variabilitat detectada per al tetranucleòtid (AAAT)_n en el conjunt de poblacions. Tot i ser un STR, amb un taxa de mutació més elevada que la d'altres polimorfismes, només s'han detectat els dos al·lells que ja hi havia descrits (Bellamy i Hill, 1997), amb l'al·lel de 4 repeticions molt més freqüent que el de 5 (una freqüència màxima de 0.923 en la mostra del Nord de la Península, i una mínima de 0.792 per la costa de Sardenya i Alemanya).

Els altres dos polimorfismes (A300G i C150T) mostren freqüències relativament homogènies dins les mostres europees continentals, però diferents de les de Sardenya i Marroc. Pel polimorfisme A300G, l'al·lel A mostra freqüències de 0.523-0.556 a les mostres de la Península Ibèrica, Sud de França i Alemanya, mentre que són de 0.610-0.709 a Marroc i Sardenya. Aquest polimorfisme, amb heterozigositats entre 0.415 i 0.511, és el més variable d'entre els bial·lèlics d'aquesta regió cromosòmica, assolint els valors màxims de variabilitat d'un marcador amb dos al·lells.

El marcador C150T mostra freqüències màximes de l'al·lel C a les poblacions del continent europeu (la màxima és de 0.840 pel Nord de la Península) i més baixes al Nord d'Àfrica i Sardenya, amb una freqüència mínima de 0.640 a la Costa de Sardenya.

MARC.		N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
(CCTTT) _n	7					0.006				
	8	0.022	0.021	0.014	0.138	0.096		0.023		0.021
	9	0.053	0.034	0.032	0.142	0.115	0.022	0.057	0.026	0.043
	10	0.120	0.203	0.131	0.096	0.128	0.130	0.108	0.115	0.160
	11	0.208	0.178	0.194	0.092	0.090	0.299	0.171	0.214	0.223
	12	0.319	0.292	0.329	0.217	0.282	0.261	0.290	0.370	0.330
	13	0.173	0.170	0.180	0.183	0.128	0.185	0.261	0.167	0.170
	14	0.080	0.072	0.081	0.071	0.039	0.049	0.051	0.089	0.032
	15	0.013	0.025	0.032	0.058	0.083	0.016	0.017	0.005	0.011
	16	0.013	0.004	0.009	0.004	0.032	0.027	0.006	0.010	0.011
	17						0.011	0.017	0.005	
	N	113	118	111	120	78	92	88	96	47
	H _{nb}	0.8048	0.8087	0.7996	0.8580	0.8529	0.7918	0.8046	0.7721	0.7918
	HW(p)	0.7253	0.2800	0.3161	0.1176	0.5768	0.7300	0.3595	0.3709	0.3045
(AAAT) _n	4	0.923	0.877	0.904	0.888	0.865	0.846	0.898	0.868	0.898
	5	0.077	0.123	0.096	0.112	0.135	0.154	0.102	0.132	0.102
	N	111	118	120	112	78	81	83	83	44
	H _{nb}	0.1421	0.2165	0.1740	0.1992	0.2345	0.2626	0.1850	0.2313	0.1857
	HW(p)	1.0000	0.2774	1.0000	1.0000	0.5797	1.0000	1.0000	0.3418	0.0910
A300G	G	0.537	0.552	0.556	0.709	0.610	0.635	0.658	0.553	0.523
	A	0.463	0.448	0.444	0.291	0.390	0.365	0.342	0.447	0.477
	N	95	105	107	103	50	63	76	85	22
	H _{nb}	0.4999	0.4969	0.4960	0.4149	0.4806	0.4673	0.4531	0.4973	0.5106
	HW(p)	1.0000	0.8352	0.4436	1.0000	0.3869	0.0965	0.2822	1.0000	1.0000
C150T	C	0.840	0.778	0.792	0.695	0.714	0.640	0.696	0.803	0.798
	T	0.160	0.222	0.208	0.305	0.286	0.360	0.304	0.197	0.202
	N	97	99	108	100	70	89	84	94	42
	H _{nb}	0.2699	0.3474	0.3314	0.4261	0.4111	0.4631	0.4254	0.3178	0.3267
	HW(p)	0.4532	1.0000	0.5598	0.2746	0.7469	0.5677	0.2503	1.0000	1.0000

Taula IV.6. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS2 analitzats en les diferents poblacions. H_{nb}: heterozigotitat estimada sense biaix (non-biased); HW (p): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg.

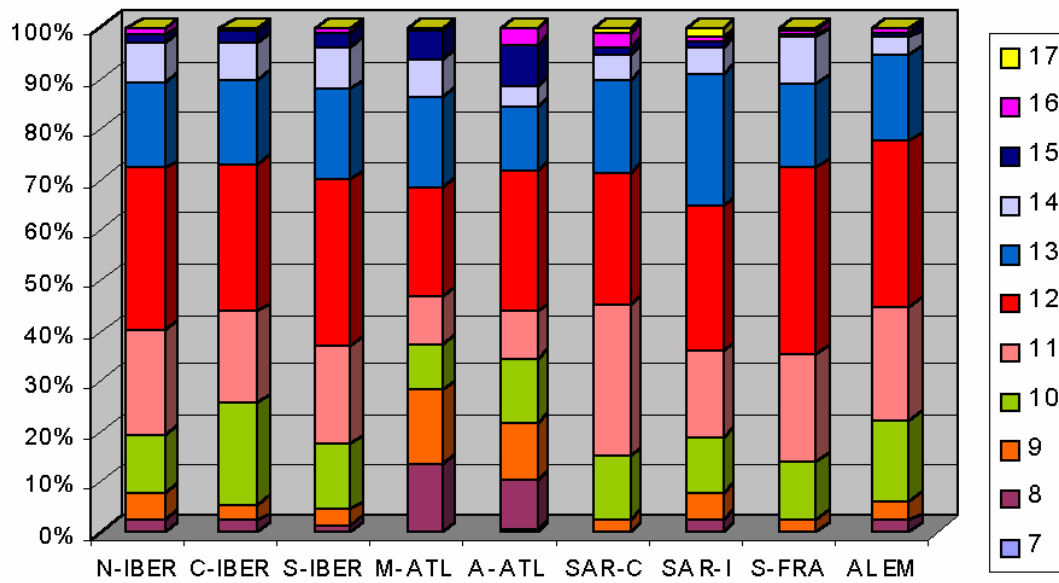


Figura IV.5. Distribució de les freqüències al·lèliques del polimorfisme $(CCTT)_n$ del gen NOS2 a les poblacions estudiades.

DIVERSITAT INTERPOBLACIONAL

A la taula IV.7 es mostren els resultats del test exacte de diferenciació entre parelles de poblacions per al conjunt dels marcadors. Tot i les diferències observades, el test global de diferenciació pel conjunt de poblacions va resultar no significatiu ($p=0.05495\pm 0.03483$), encara que cal destacar l'elevat error estàndard.

Les mostres de l'Alt Atlas i del Sud de la Península es mostren com les més diferenciades dins el conjunt. A-ATL presenta diferències significatives amb totes les poblacions, excepte amb l'altra mostra berber (del Mig Atlas) i l'alemanya. Per la seva banda, la població del Sud de la Península mostra diferències amb les poblacions berbers i sardes.

A l'altre extrem es situa la població d'Alemanya, que és l'única que no mostra diferències amb cap de les altres poblacions analitzades.

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA
C-IBER	0.70240							
S-IBER	0.11250	0.33925						
M-ATL	0.00510	0.22285	<0.00001					
A-ATL	0.00030	0.02915	<0.00001	0.54780				
SAR-C	0.11665	0.20475	0.00600	0.05415	0.00050			
SAR-I	0.00985	0.22860	0.01755	0.16945	0.00020	0.72570		
S-FRA	0.51605	0.87590	0.45860	0.35140	<0.00001	0.65425	0.19505	
ALEM	0.63540	0.88685	0.34660	0.41540	0.20190	0.36360	0.60170	0.34110

Taula IV.7. Diferenciació entre parells de poblacions per als marcadors del gen NOS2. Es mostren els valors de significació (p) del test exacte de diferenciació.

Una anàlisi de cada marcador per separat posa de manifest que el polimorfisme que mostra més diferències entre el conjunt de poblacions és el microsatèl·lit (CCTTT)_n ($p < 0.00001$); les poblacions berbers (M-ATL i A-ATL) es diferencien de totes les altres poblacions, però no entre sí. A més, M-ATL tampoc es diferencia de la mostra d'Alemanya. En l'altre extrem, el tetranucleòtid (AAAT)_n ha estat el que menys ha variat entre poblacions i no ha mostrat diferències significatives ni a nivell global ni en les comparacions dos a dos.

L'anàlisi de la variança sobre les freqüències al·lèliques confirma que l'únic marcador que no mostra variació significativa en el conjunt de les poblacions és el tetranucleòtid del promotor ($F_{ST} = 0.02\%$, $p = 0.4301$). Els altres polimorfismes mostren valors de F_{ST} de 1.20, 1.16 i 1.83% pels polimorfismes (CCTTT)_n, A300G i C150T, respectivament (tots ells amb $p < 0.01$).

Pel conjunt dels polimorfismes, el valor de F_{ST} és de 1.09% ($p < 0.00001$). Aquesta elevada significació de la diversitat gènica pel *locus* NOS2 en les poblacions analitzades es veu dràsticament reduïda si s'analitza només per les poblacions europees (eliminant de l'anàlisi les poblacions berbers marroquines). Sense M-ATL ni A-ATL, el valor de F_{ST} es redueix fins a 0.48%, tot i que es manté significatiu ($p = 0.0127$), degut a que només el marcador C150T roman significatiu. En fer l'anàlisi eliminant les mostres sardes (i tornant a incloure les nord-africanes), s'obtenen resultats semblants als totals ($F_{ST} = 1.07\%$, $p < 0.00001$), però el polimorfisme C150T veu reduïda la seva diversitat ($F_{ST} = 0.95\%$, $p = 0.0332$). Aquests resultats suggereixen que la variació global detectada es deu principalment a la variació dels polimorfismes (CCTTT)_n i A300G en poblacions berbers i a la del marcador C150T en poblacions sardes.

Una anàlisi jerarquizada de la variances, agrupant poblacions en funció del seu origen geogràfic, posa de manifest que el model més informatiu estaria format per tres grups: Europa Continental (amb les mostres de la Península Ibèrica, Sud de França i Alemanya), Sardenya, i Berbers del Marroc. Amb aquests tres grups, la diversitat gènica total (F_{ST}) va resultar de 1.73% ($p < 0.00001$), que s'explica fonamentalment per la diversitat entre grups (F_{CT}). El valor de F_{CT} és de 1.77% ($p = 0.0029$), i la diversitat dins dels grups (F_{SC}) ha resultat equivalent a zero.

Una anàlisi de coordenades principals a partir de les distàncies genètiques evidencia el mateix patró de relacions poblacionals. A la figura IV.6 s'observa que les dues primeres components expliquen conjuntament el 80.67% de la variació total. Una anàlisi detinguda de quins polimorfismes marquen les tendències per cada coordenada principal ens indica que el primer eix separa les poblacions principalment pels marcadors A300G i C150T, i els al·lels extrems del pentanucleòtid. Aquest eix, que explica el 57.04% de la variació, separa les poblacions del Nord de la Mediterrània de les del Sud. El segon eix, en canvi, distingeix les poblacions sardes de tota la resta. Aquest segon eix, que explica el 23.63%, ve determinat també per les freqüències dels SNPs A300G i C150T, a més d'alguns al·lels del pentanucleòtid (especialment, els de 8, 14, 16 i 17 repeticions).

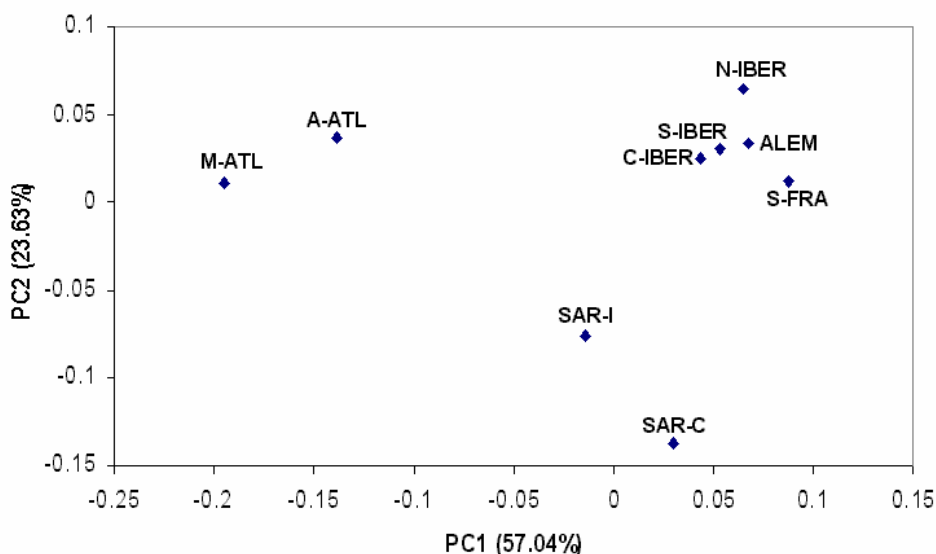


Figura IV.6. Coordenades principals de les distàncies genètiques per als polimorfismes del gen NOS2.

COMPARACIÓ AMB D'ALTRES POBLACIONS

Les dades aportades complementen les que s'havien descrit fins al moment en diferents mostres. La recerca bibliogràfica ha posat de manifest les diferències en el nombre de treballs realitzats per cadascun dels polimorfismes en el *locus* NOS2 (taula IV.8).

Així, per exemple, s'ha trobat un únic estudi que analitza la variació del polimorfisme A300G en famílies daneses amb fills afectats per diabetes de tipus I. A l'altre extrem tenim el pentanucleòtid (CCTTT)_n, per al que es disposa de dades en moltes poblacions diferents, inclús en mostres de diferents primats.

El pentanucleòtid (CCTTT)_n mostra un total de 19 al·lels diferents, de 3 a 21 repeticions de la seqüència consens. Els ximpanzés presenten els set al·lels més petits (d'entre 3 i 9 repeticions), i els de 3, 4 i 5 repeticions els hi són exclusius. El patró de variació detectat a les mostres analitzades de la Península Ibèrica s'emmarca en la variació descrita per mostres de Galícia i Granada, i les freqüències de les mostres berbers són semblants a les descrites per població de Gàmbia.

La variació observada pel tetranucleòtid (AAAT)_n en poblacions d'africans, caucàsics europeus i francesos és similar a l'observada en les mostres analitzades en aquest treball, i l'única població per la que s'han trobat dades que difereixin és la de l'Índia, amb freqüències de l'al·lel de 5 repeticions de 0.020 (Bellamy i Hill, 1997; Cambien et al., 1999).

El polimorfisme C150T s'ha mostrat més variable en les mostres analitzades que en les dades disponibles. En les poblacions europees continentals analitzades en aquest treball, les freqüències de l'al·lel T són de l'ordre del 20%, i del 30% en les mostres sardes i berbers. En canvi, la informació disponible a la base de dades del *HapMap Project* mostra freqüències de 0.1690 per caucàsics d'origen europeu i són encara més baixes per poblacions del Japó i Yoruba de Nigèria (0.0680 i 0.0750, respectivament).

Referència	N	Població	Freqüències al·lèliques														
			(CCTTT) _n	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Xu et al., 1997	31	Ximpanzè	0.048	0.016	0.450	0.080	0.177	0.064	0.160								
	101	UK							0.035	0.124	0.188	0.292	0.233	0.100	0.025		
López-Nevot et al., 2003	199	Granada					0.005	0.020	0.048	0.111	0.209	0.312	0.199	0.070	0.020		
González-Gay et al., 2004	251	Lugo							0.010	0.052	0.088	0.205	0.365	0.149	0.096	0.024	
Warpeha et al., 1999	97	N-Irlanda							0.005	0.031	0.103	0.289	0.335	0.113	0.098	0.021	
Xu et al., 2000	933	Gàmbia				0.001	0.016	0.066	0.144	0.182	0.070	0.123	0.204	0.106	0.060		
	77	Carib							0.006	0.058	0.120	0.090	0.240	0.181	0.123	0.162	
	210	Japó								0.060	0.152	0.219	0.211	0.066	0.050	0.080	
	72	Índia								0.035	0.139	0.160	0.200	0.160	0.120	0.140	
(AAAT) _n			4	5													
Glenn et al., 1999	164	Caucàsics	0.860	0.140													
Bellamy i Hill, 1997	801	Africans	0.840	0.160													
	589	Índia	0.980	0.020													
	35	Caucàsics	0.850	0.150													
Cambien et al., 1999		França	0.850	0.150													
C150T			C	T													
Shen et al., 2004	246	Xina	0.868	0.132													
HapMap Project	59	Europeus	0.831	0.169													
	44	Xina (Han)	0.852	0.148													
	44	Japó	0.932	0.068													
	60	Yoruba	0.925	0.075													

Taula IV.8. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS2 recollides de la bi

DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT

Els resultats del desequilibri de lligament entre marcadors del gen NOS2 es mostren a la figura IV.7 i a la taula IV.9. Cal remarcar que, en totes les comparacions dos a dos, l'agrupació de tots els individus en una sola població mostra un considerable desequilibri de lligament ($p < 0.01$ per totes les parelles de polimorfismes).

Les parelles de marcadors que han mostrat un major desequilibri de lligament han estat (AAAT)_n/A300G i A300G/C150T, que mostren desequilibri de lligament significatiu en 7 i 8 poblacions de les 9 analitzades, respectivament. Tot i així, la combinació de polimorfismes que mostra els valors més elevats de Δ' ha estat la (AAAT)_n/C150T amb un valor màxim de 0.8128 per la mostra del Nord de la Península.

Les combinacions haplotípiques que inclouen el pentanucleòtid de la regió promotora presenten menys desequilibri de lligament que d'altres, tant en termes de valors de Δ' com pel que fa a nombre de poblacions que mostren significació. Aquest fet pot venir donat per l'elevat nombre d'al·lels que presenta i per ser un dels marcadors més allunyats de la resta. Tot i això, els polimorfismes (CCTTT)_n i (AAAT)_n es troben només a unes 1.83 Kb.

Per poblacions, el desequilibri de lligament més elevat el presenta la població del Centre de la Península Ibèrica. Aquesta és l'única població que mostra desequilibri de lligament significatiu per totes les parelles de polimorfismes. Les poblacions del Mig Atlas i de la Costa de Sardenya mostren també un fort desequilibri de lligament entre cinc de les sis parelles de marcadors.

A l'altre extrem, la població d'Alemanya només mostra desequilibri de lligament significatiu per la parella (CCTTT)_n/(AAAT)_n i la població de l'Interior de Sardenya només per dos parelles de polimorfismes. El cas d'Alemanya, però, pot ser atribuïble al baix nombre d'individus dels que es té informació per algunes parelles de marcadors.

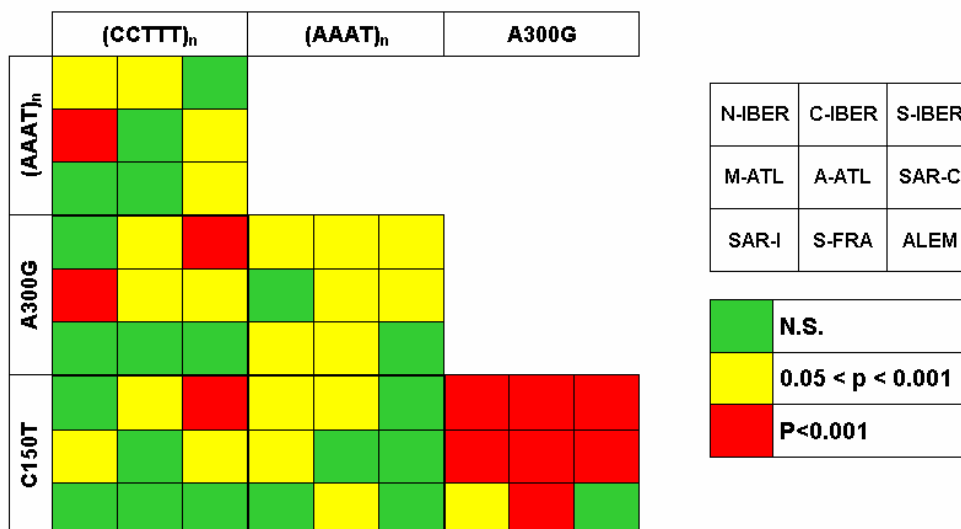


Figura IV.7. Representació del desequilibri de lligament detectat entre marcadors del gen NOS2 en les diferents poblacions analitzades. El color indica el grau de significació del desequilibri de lligament codificat com recull la llegenda.

		N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
(CCTTT) _n / (AAAT) _n	Δ'	0.2243	0.2258	-	0.3411	-	0.2342	-	-	0.4070
	p	0.0197	0.0172	0.4550	0.0001	0.0708	0.0314	0.3430	0.1334	0.0015
	N	110	116	111	112	75	81	79	83	42
(CCTTT) _n / A300G	Δ'	-	0.1615	0.2348	0.2629	0.3009	0.2343	-	-	-
	p	0.2251	0.0102	0.0001	0.0001	0.0029	0.0031	0.1308	0.0575	0.4804
	N	94	103	107	103	50	63	72	85	21
(CCTTT) _n / C150T	Δ'	-	0.1534	0.2714	0.1780	-	0.1603	-	-	-
	p	0.0726	0.0117	0.0002	0.0061	0.3635	0.0153	0.0699	0.6428	0.7698
	N	96	98	108	100	69	88	80	94	42
(AAAT) _n / A300G	Δ'	0.4232	0.3981	0.3841	-	0.5172	0.6166	0.4440	0.3363	-
	p	0.0379	0.0084	0.0226	0.0717	0.0238	0.0023	0.0359	0.0321	0.3692
	N	95	104	107	96	50	58	71	78	19
(AAAT) _n / C150T	Δ'	0.8128	0.7137	-	0.6590	-	-	-	0.5931	-
	p	0.0363	0.0059	0.7833	0.0013	0.5721	0.0606	0.0675	0.0249	0.6120
	N	97	99	108	96	68	78	77	82	38
A300G / C150T	Δ'	0.4283	0.4029	0.4277	0.4942	0.4718	0.5695	0.2619	0.4975	-
	p	0.0008	0.0002	0.0001	0.0006	0.0003	0.0001	0.0308	0.0001	0.3050
	N	94	93	107	85	50	62	74	85	21

Taula IV.9. Valors de Δ' i probabilitats de desequilibri de lligament per les parelles de marcadors del gen NOS2.

VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

L'anàlisi de la variació haplotípica del gen NOS2 s'ha realitzat sobre dos sistemes: $(CCTTT)_n/(AAT)_n$ i A300G/C150T. Aquests dos sistemes agrupen els marcadors per parelles que presenten una menor distància física entre polimorfismes (1.83 i 11.44 Kb, respectivament) i comprenen la parella que presenta un major desequilibri de lligament (A300G/C150T).

Les freqüències haplotípiques es mostren a la taula IV.10. Pel cas de l'haplotip $(CCTTT)_n/(AAT)_n$, s'han agrupat les freqüències dels haplotips amb menys de 10 i més de 13 repeticions del pentanucleòtid, per evitar un elevat nombre d'haplotips amb freqüències molt baixes.

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
$(CCTTT)_n/(AAT)_n$									
<10 / 4	0.086	0.071	0.047	0.262	0.200	0.035	0.082	0.013	0.074
10 / 4	0.113	0.205	0.131	0.104	0.150	0.122	0.084	0.128	0.235
11 / 4	0.215	0.179	0.189	0.079	0.070	0.277	0.173	0.205	0.221
12 / 4	0.289	0.253	0.304	0.186	0.227	0.224	0.254	0.319	0.206
13 / 4	0.156	0.106	0.132	0.152	0.083	0.118	0.197	0.124	0.118
>13 / 4	0.071	0.078	0.105	0.107	0.140	0.085	0.083	0.069	0.059
<10 / 5					0.010				0.015
10 / 5		0.007				0.010	0.028		
11 / 5			0.003			0.013	0.021		0.044
12 / 5	0.023	0.025	0.024	0.034	0.033	0.022		0.046	0.029
13 / 5	0.022	0.051	0.045	0.037	0.057	0.058	0.050	0.055	
>13 / 5	0.025	0.026	0.021	0.039	0.030	0.038	0.029	0.040	
A300G/C150T									
A / C	0.391	0.354	0.355	0.463	0.327	0.267	0.328	0.346	0.342
A / T	0.147	0.211	0.201	0.269	0.283	0.338	0.313	0.212	0.129
G / C	0.454	0.418	0.444	0.251	0.363	0.373	0.358	0.442	0.482
G / T	0.009	0.017		0.017	0.027	0.022			0.048

Taula IV.10. Freqüències haplotípiques de les parelles de polimorfismes $(CCTTT)_n/(AAT)_n$ i A300G/C150T.

La variances de les freqüències haplotípiques ha resultat significativa. La parella $(CCTTT)_n/(AAT)_n$ dona un valor de F_{ST} de 1.31% i la A300G/C150T de 1.17% (totes dues amb $p < 0.00001$).

L'anàlisi de coordenades principals a partir de les freqüències haplotípiques d'ambdós sistemes explica el 69.23% de la variació total en les dues primeres coordenades i mostra una clara diferenciació de les poblacions berbers del Marroc

(figura IV.8). La primera coordenada separa aquestes dos mostres nord-africanes, mentre que la segona remarca la particularitat de les poblacions d'Alemanya, d'una banda, i de Sardenya, de l'altra.

La separació en el primer eix es deu majoritàriament a les diferències en les freqüències dels haplotips <10/4, 11/4 (pel sistema (CCTTT)_n/(AAT)_n), A/T i G/C (pel sistema A300G/C150T). Les diferències en el segon eix venen determinades per les freqüències dels haplotips 10/4, 13/5, G/T i A/T.

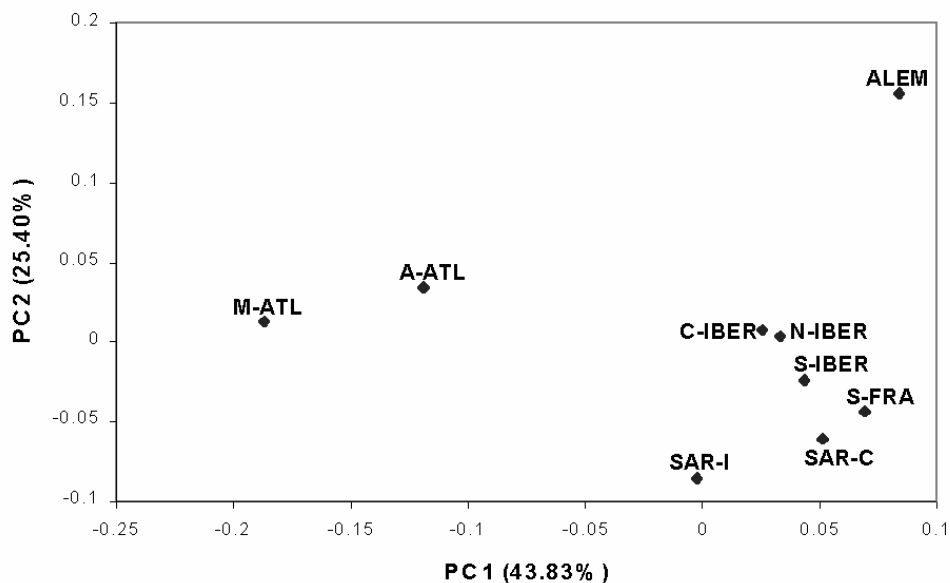


Figura IV.8. Anàlisi de coordenades principals a partir de la informació dels sistemes haplotípics (CCTTT)_n/(AAT)_n i A300G/C150T.

GEN NOS3

VARIACIÓ AL·LÈLICA

DIVERSITAT INTRAPOBLACIONAL

Les freqüències al·lèliques dels cinc polimorfismes analitzats en el *locus* NOS3 es mostren a la taula IV.11. S'observen desviacions de les assumpcions de l'equilibri Hardy-Weinberg en els polimorfismes G894T i (CA)_n en algunes poblacions. El marcador G894T mostra desviacions de l'equilibri lleugerament significatives en les poblacions de SAR-I i S-FRA, degudes a un defecte i a un excés, respectivament, d'heterozigots tal i com posen de manifest els valors de l'índex de fixació (F_{is}) de 0.231 i -0.207 (probabilitats de 0.0229 i 0.0192, respectivament). El dinucleòtid es desvia significativament de l'equilibri en les poblacions de S-FRA i ALEM (0.0055 i 0.0035, respectivament), amb valors de F_{is} de 0.031 i 0.121, que indiquen un dèficit en el nombre d'heterozigots. En el cas de la mostra d'Alemanya, aquesta desviació pot ser atribuïda a efectes de biaix deguts al baix nombre d'individus genotipats ($n=39$) en un polimorfisme que presenta una elevada variabilitat (18 al·lells en aquesta població).

El marcador **T-786C** de la regió promotora mostra freqüències de l'al·lel T en un rang des de 0.471 (per la mostra de M-ATL) fins a 0.580 (per la mostra d'A-ATL). En tots els casos, les heterozigositats estan properes al màxim per polimorfismes bial·lèlics.

El minisatèl·lit **ecNOS4a/b** presenta únicament dos al·lells molt freqüents en totes les poblacions, però les poblacions berbers en presenten un tercer en freqüències polimòrfiques (0.023 i 0.019 en les mostres de M-ATL i A-ATL, respectivament). L'al·lel c es caracteritza per tenir 6 repeticions de la seqüència consensu de 27 pb i ja s'havia descrit en poblacions africanes i afroamericanes (Hooper et al., 1999; Tanus-Santos et al., 2001; Via et al., 2003a). Un individu de la mostra del Nord peninsular ha presentat aquest al·lel en heterozigosi, però la seva freqüència en la població no arriba a ser polimòrfica. Malgrat poder arribar a presentar tres al·lells diferents, aquest polimorfisme és el que presenta una heterozigositat més baixa dels analitzats en el gen NOS3, que oscil·la entre 0.157 per la mostra de la costa de Sardenya i 0.337 en la població del Mig Atlas marroquí.

MARC.		N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
T-786C	T	0.536	0.559	0.533	0.471	0.580	0.506	0.477	0.500	0.571
	C	0.464	0.442	0.467	0.529	0.420	0.494	0.524	0.500	0.429
	N	97	94	107	102	69	89	85	94	42
	H _{nb} HW(p)	0.5000 1.0000	0.4958 1.0000	0.5002 0.5510	0.5007 0.5260	0.4908 1.0000	0.5028 0.6245	0.5018 0.2097	0.5027 0.5110	0.4957 0.3285
ecNOS4ab	a	0.144	0.171	0.116	0.182	0.127	0.085	0.133	0.177	0.143
	b	0.851	0.829	0.884	0.794	0.854	0.915	0.867	0.823	0.857
	c	0.0045			0.0234	0.0190				
	N H _{nb} HW(p)	111 0.2556 0.1045	120 0.2845 0.7355	116 0.2066 1.0000	107 0.3368 0.7823	79 0.2552 0.3699	94 0.1566 1.0000	75 0.2327 0.3084	93 0.2935 0.4445	49 0.2474 1.0000
G894T	G	0.566	0.644	0.504	0.628	0.690	0.511	0.477	0.596	0.633
	T	0.434	0.356	0.496	0.372	0.310	0.489	0.523	0.405	0.367
	N H _{nb} HW(p)	113 0.4934 0.0820	118 0.4604 0.6301	120 0.5021 0.5573	113 0.4691 0.8189	79 0.4306 1.0000	92 0.5025 0.8014	88 0.5018 0.0229	89 0.4845 0.0192	49 0.4696 1.0000
(CA) _n	17							0.007		
	18				0.009					
	19			0.005	0.005					
	21		0.023	0.014	0.005		0.014	0.007		
	22							0.013	0.006	0.013
	23	0.029	0.045	0.041	0.055	0.062	0.014	0.013	0.012	0.039
	24		0.005	0.014	0.005		0.007		0.029	0.013
	25	0.020	0.027	0.023	0.046	0.041	0.042	0.013	0.041	0.013
	26	0.025	0.027	0.018	0.005	0.041	0.035	0.026	0.035	0.026
	27	0.015	0.009	0.000	0.032	0.034	0.021	0.020	0.029	0.013
	28	0.074	0.059	0.046	0.041	0.062	0.042	0.078	0.041	0.064
	29	0.069	0.050	0.064	0.046	0.069	0.127	0.071	0.093	0.039
	30	0.078	0.068	0.060	0.078	0.062	0.106	0.052	0.111	0.039
	31	0.103	0.086	0.101	0.096	0.110	0.141	0.117	0.081	0.180
	32	0.162	0.122	0.179	0.133	0.103	0.049	0.097	0.087	0.167
	33	0.064	0.131	0.083	0.064	0.034	0.078	0.130	0.099	0.115
	34	0.098	0.149	0.078	0.083	0.158	0.113	0.149	0.116	0.141
	35	0.128	0.059	0.101	0.156	0.082	0.085	0.091	0.116	0.039
	36	0.049	0.072	0.092	0.069	0.055	0.063	0.046	0.041	0.064
	37	0.034	0.045	0.023	0.051	0.048	0.021	0.026	0.029	0.013
	38	0.029	0.018	0.028	0.018	0.014	0.028	0.026	0.023	0.000
	39	0.015	0.005	0.018			0.021	0.020	0.012	0.013
	40	0.005	0.005		0.005	0.007	0.014			0.013
	41			0.005						
	43	0.005								
	45			0.005						
	48			0.005						
	N	102	111	109	109	73	71	77	86	39
	H _{nb} HW(p)	0.9148 0.7570	0.9173 0.2897	0.9161 0.1443	0.9181 0.0888	0.9244 0.8808	0.9200 0.2663	0.9161 0.3176	0.9239 0.0055	0.9024 0.0035
A27C	A	0.737	0.743	0.681	0.668	0.599	0.628	0.694	0.705	0.750
	C	0.263	0.257	0.319	0.332	0.401	0.372	0.306	0.295	0.250
	N H _{nb} HW(p)	97 0.3896 0.4211	101 0.3842 1.0000	108 0.4368 0.8246	104 0.4455 0.6305	71 0.4840 1.0000	90 0.4700 0.0830	85 0.4271 0.2256	95 0.4179 1.0000	44 0.3793 0.5650

Taula IV.11. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS3 analitzats en les diferents poblacions. H_{nb}: heterozigositat estimada sense biaix (non-biased); HW (p): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg.

La substitució **G894T** ha mostrat freqüències mínimes per l'al·lel G en la població de l'interior de Sardenya (0.477), mentre que la mostra berber de l'Alt Atlas mostra la freqüència màxima (0.690). Les mostres berbers, l'alemanya i la del Centre de la Península mostren freqüències més elevades de l'al·lel G.

El polimorfisme que presenta més variació és el dinucleòtid **(CA)_n**, que presenta les heterozigositats més elevades de tots els polimorfismes analitzats, que oscil·len entre 0.902, per la mostra d'alemanys, i 0.924, per la població del Sud de França. Aquest marcador ha presentat un total de 27 al·lells diferents d'entre 17 i 48 repeticions, encara que el nombre d'al·lells per població és més baix (un mínim de 17 al·lells diferents per la mostra de l'Alt Atlas i un màxim de 21 per la del Sud de la Península).

Al seu torn, el polimorfisme **A27C** presenta una certa homogeneïtat en les seves freqüències en totes les poblacions europees continentals (Península Ibèrica, Sud de França i Alemanya), mentre que les poblacions marroquines i sardes presenten unes freqüències de l'al·lel A (el més freqüent en totes les poblacions) lleugerament més baixes (la mínima és de 0.599 en la mostra de l'Alt Atlas).

DIVERSITAT INTERPOBLACIONAL

Els resultats per al test exacte de diferenciació de poblacions entre totes les parelles de poblacions analitzades en funció de les freqüències al·lèliques per al conjunt dels marcadors es mostren a la taula IV.12. A nivell global, el test de diferenciació no mostra diferències significatives pel conjunt de marcadors ($p=0.3916\pm 0.1374$), encara que sí que se n'observen en algunes comparacions poblacionals concretes.

Les poblacions que es mostren relativament més diferenciades són les del Centre de la Península i Sud de França. La mostra de C-IBER es diferencia significativament de les poblacions de A-ATL, SAR-I i S-FRA, mentre que S-FRA es diferencia de N-IBER i C-IBER.

Una anàlisi de cada polimorfisme per separat evidencia que els marcadors que mostren freqüències significativament heterogènies en el conjunt de poblacions analitzades són ecNOS4a/b, G894T i **(CA)_n** (tots ells amb probabilitats inferiors a 0.00001). En el cas del minisatèl·lit ecNOS4a/b, aquestes diferències reflexen la diferenciació de les poblacions de M-ATL, SAR-C i S-FRA, que són les que marquen

els extrems del rang de variació de les freqüències al·lèliques. Per la substitució G894T, es detecten diferències entre les poblacions que tenen freqüències per l'al·lel G properes a 0.50 (les dues mostres sardes i algunes de les ibèriques) amb les que les tenen superiors a 0.60. El dinucleòtid (CA)_n mostra diferències significatives en diverses de les comparacions, diferenciant principalment les mostres de C-IBER i M-ATL.

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA
C-IBER	0.16725							
S-IBER	0.49770	0.58320						
M-ATL	0.64210	0.06775	0.93090					
A-ATL	0.19165	0.04340	0.32425	0.52115				
SAR-C	0.63115	0.58930	0.67310	0.85000	0.29710			
SAR-I	0.17730	0.02550	0.47710	0.68350	0.32365	0.52200		
S-FRA	0.01400	0.01100	0.49255	0.06465	0.12095	0.43690	0.24370	
ALEM	0.32500	0.60925	0.96585	0.83010	0.74150	0.92480	0.93075	0.27645

Taula IV.12. Diferenciació entre parells de poblacions per als marcadors del gen NOS3. Es mostren els valors de significació (*p*) del test exacte de diferenciació.

L'AMOVA realitzat a partir de les freqüències al·lèliques indica que els únics marcadors que mostren variació significativa en el conjunt de poblacions són el G894T i (CA)_n, amb valors de F_{ST} de 1.66% ($p < 0.00001$) i 0.30% ($p = 0.0068$).

El valor de F_{ST} es manté significatiu quan es consideren conjuntament els cinc marcadors, amb un valor promig de 0.52% ($p = 0.0039$). Aquest valor és molt baix si el comparem amb els obtinguts en les altres dues regions gèniques analitzades, que eren de 1.16% i 1.09% per un conjunt de quatre polimorfismes cadascuna. A més, aquesta reduïda diversitat gènica no sembla que es degui especialment a cap població ni a cap grup de poblacions en concret.

La jerarquitització d'aquesta anàlisi de la varianza, fent agrupacions de poblacions amb criteris geogràfics no ha revelat cap estructuració de les mostres analitzades. Per totes les agrupacions provades la major part de la diversitat total detectada era deguda a la diversitat dins dels grups (F_{SC}) i la diversitat entre grups (F_{CT}) va estar molt allunyada de la significació en tots els casos. Aquesta manca d'estructuració ha estat confirmada pel fet que cap polimorfisme ha mostrat significació pel valor de F_{CT} en cap dels models d'agrupacions testats.

Una anàlisi de coordenades principals, que ha explicat el 48.29% de la variació total en les dues primeres coordenades, evidencia una diferenciació de les poblacions nord-africanes de la resta i una certa particularitat de les poblacions de Sardenya i Alemanya (figura IV.9). La primera coordenada es veu influenciada pels polimorfismes ecNOS4ab i G894T, i marca fortament la diferenciació de les mostres berbers i, en menor grau, la de les sardes. La segona coordenada separa les poblacions d'Alemanya i del Centre de la Península de la resta, i marca aquesta diferència, en bona mesura, per les freqüències de la substitució A27C. El dinucleòtid (CA)_n influeix heterogèniament en les coordenades.

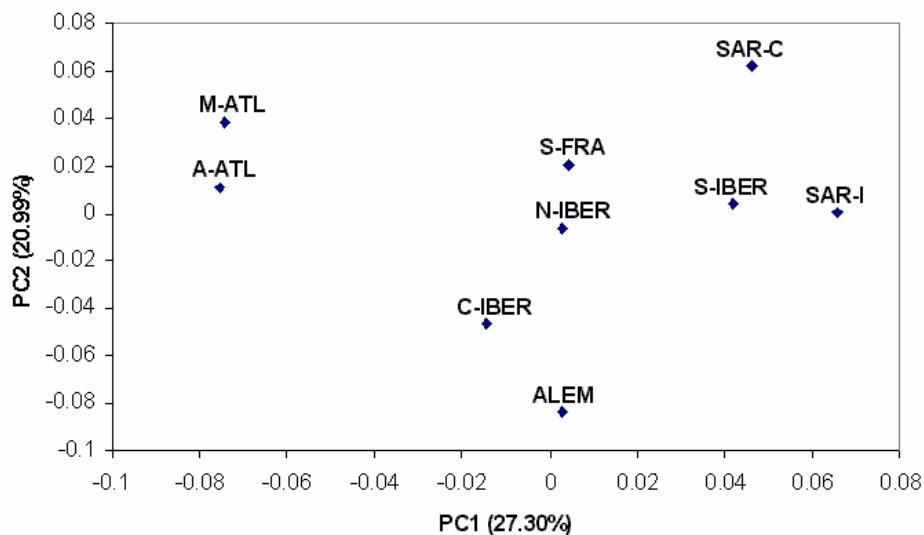


Figura IV.9. Coordenades principals de les distàncies genètiques per als polimorfismes del gen NOS3.

COMPARACIÓ AMB D'ALTRES POBLACIONS

A la taula IV.13 es resumeixen les freqüències al·lèliques descrites en la bibliografia pels polimorfismes del gen NOS3.

El polimorfisme T-786C mostra una relativa homogeneïtat en les poblacions analitzades (amb freqüències de l'al·lel C que oscil·len entre 0.42 i 0.53) que contrasta amb les freqüències descrites a la bibliografia. Poblacions d'origen asiàtic o africà presenten freqüències molt més baixes d'aquest polimorfisme (0.035-0.175) i les poblacions d'origen caucàsics mostren freqüències intermitges (0.335-0.420). Cal remarcar que un estudi d'Álvarez et al. (2001) en població asturiana

mostra freqüències força diferents de les descrites en la mostra d'Astúries analitzada en aquest treball (0.372 vs. 0.464 en la mostra N-IBER).

El minisatèl·lit ecNOS4a/b mostra la major variabilitat en les poblacions d'origen subsaharià. La mostra de Costa d'Ivori i les afroamericanes tenen freqüències més elevades de l'al·lel a (0.26-0.36) que les poblacions europees o asiàtiques, i presenten un tercer al·lel (corresponent a 6 repeticions de la seqüència de 27 pb) amb freqüències de 0.031-0.062. Aquest patró de les poblacions d'origen subsaharià es manifesta en part en les poblacions berbers de M-ATL i A-ATL, que presenten l'al·lel c en freqüències polimòrfiques (0.019-0.023) i, en el cas de M-ATL, una freqüència de l'al·lel a més elevada (0.182). Les mostres europees mostren una certa homogeneïtat, amb l'excepció de la mostra d'Itàlia analitzada per Salvarani et al. (2002).

La substitució G894T mostra una diversitat molt baixa en poblacions asiàtiques i subsaharianes. Dins d'Europa s'observa un gradient nord-sud en la distribució de les freqüències. Així, les poblacions del centre i nord d'Europa presenten freqüències de l'al·lel T de 0.30-0.35, com la mostra d'Alemanya analitzada en aquesta tesi. A la mostra francesa de Poirier et al. (1999) i a la del present treball, les freqüències augmenten fins a valors de 0.39-0.40, i a la Península Ibèrica i Itàlica ja estan a l'ordre de 0.44-0.50. En aquest context, cal remarcar les freqüències baixes de les poblacions nord-africanes (amb valors de 0.31-0.37) i els valors dispars revelats per les poblacions C-IBER i SAR-I (amb valors de 0.356 i 0.523, respectivament).

El dinucleòtid (CA)_n de l'intró 13 té descrites les freqüències només en el treball de Nakayama et al. (1997) en població del Japó. Stangl et al. (2000) no donen les dades de freqüències en una mostra d'Alemanya, però sí un histograma representant-les. Amb aquestes breus informacions a la mà podem afirmar que no hi diferències substancials en la distribució d'al·lells en comparació amb les poblacions analitzades en aquest treball.

El marcador A27C no ha estat tan extensament estudiat com els altres polimorfismes del gen NOS3. Les poblacions analitzades mostren freqüències d'aquest polimorfisme que s'emmarquen en l'interval definit pels valors de la bibliografia per poblacions europees, si exceptuem les mostres de A-ATL i SAR-C, que mostren freqüències de l'al·lel C lleugerament més elevades (0.401 i 0.372, respectivament).

Referència	N	Població	Freqs.			Referència	N	Població	Freqs.		
T-786C			T	C		A27C			A	C	
Sim et al., 1998	160	Caucàsics	0.665	0.335		Bonnardeaux et al., 1995	106	França	0.660	0.340	
Nakayama et al., 1999	161	Japó	0.965	0.035		Miyamoto et al., 1998	240	Japó	0.981	0.019	
Tanus-Santos et al., 2001	100	Afroameric.	0.825	0.175		Monti et al., 2003	207	Nord Itàlia	0.782	0.218	
Álvarez et al., 2001	100	Caucàsics	0.580	0.420							
	105	Asiàtics	0.862	0.138							
Álvarez et al., 2001	300	Astúries	0.628	0.372							
4a/b			a	b	c	G894T			G	T	
Álvarez et al., 2001	300	Astúries	0.140	0.860	0.000	Miyamoto et al., 1998	240	Japó	0.950	0.050	
Miyamoto et al., 1998	240	Japó	0.110	0.890	0.000	Kerkeni et al., 2006	120	Tuníssia	0.780	0.220	
Tanus-Santos et al., 2001	100	Afroameric.	0.265	0.680	0.040	Tanus-Santos et al., 2001	100	Afroameric.	0.845	0.155	
Akar et al., 1999	100	Caucàsics	0.160	0.840	0.000	Pulkkinen et al., 2000	100	Caucàsics	0.655	0.345	
	105	Asiàtics	0.129	0.871	0.000		105	Asiàtics	0.914	0.086	
Salvarani et al., 2002	95	Turquia	0.137	0.863	0.000	Salvarani et al., 2002	82	Finlàndia	0.710	0.290	
Hooper et al., 1999	135	Itàlia	0.219	0.781	0.000	Poirier et al., 1999	135	Itàlia	0.548	0.452	
Via et al., 2003a	185	Afroamericans	0.265	0.673	0.062	Via et al., 2003a	421	França	0.612	0.388	
	112	Costa d'Ivori	0.357	0.612	0.031		112	Costa d'Ivori	0.924	0.076	

Taula IV.13. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS3 recollides de la bibliografia.

DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT

Els resultats de l'anàlisi del desequilibri de lligament entre els cinc polimorfismes analitzats en el gen NOS3 es mostren a la figura IV.10 i a la taula IV.14. Per totes les comparacions entre parelles de polimorfismes, l'agrupació de tots els individus en una sola població ha revelat un considerable desequilibri de lligament ($p < 0.001$, en tots els casos).

Les poblacions que mostren un major desequilibri de lligament al llarg del *locus* NOS3 han estat les del Centre i Sud de la Península i la de la Costa de Sardenya. Aquestes poblacions mostren desequilibris de lligament significatius per 8-9 de les 10 combinacions possibles de polimorfismes. Cal destacar els elevats valors de Δ' observats en les dues mostres sardes per molts dels sistemes haplotípics.

Alemanya i Alt Atlas, per la seva banda, mostren els menors desequilibris de lligament d'entre totes les poblacions. Només en 4 de les 10 combinacions haplotípiques mostren valors de desequilibri de lligament significatius.

Pel que fa als polimorfismes, els haplotips associats al SNP G894T mostren desequilibris de lligament més elevats. Els sistemes haplotípics T-786C/G894T i G894T/A27C mostren desequilibris de lligament significatius en vuit de les nou poblacions analitzades. Les combinacions haplotípiques que inclouen el dinucleòtid (CA)_n de l'intró 13 han mostrat el menor grau de desequilibri de lligament dins del gen NOS3. L'haplotip ecNOS4ab/(CA)_n només mostra desequilibri de lligament significatiu en la mostra del Mig Atlas, i totes les combinacions amb el microsatèl·lit presenten valors de Δ' més baixos que les altres combinacions. Aquest fet pot ser degut a l'elevat nombre d'al·lels del dinucleòtid així com a la seva diferent dinàmica evolutiva que dificulta la detecció de desequilibri de lligament.

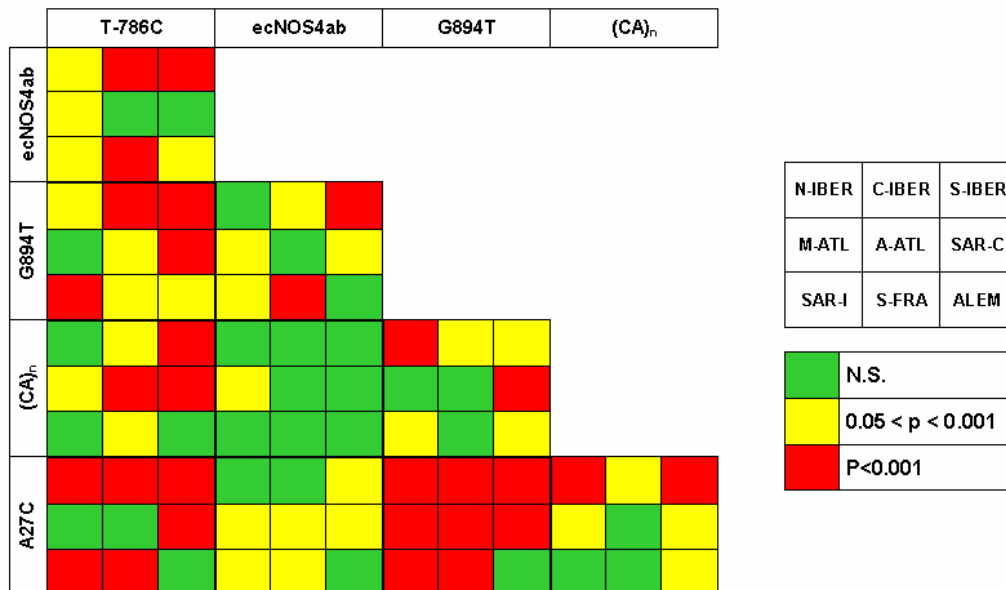


Figura IV.10. Representació del desequilibri de lligament detectat entre marcadors del gen NOS3 en les diferents poblacions analitzades. El color indica el grau de significació de la probabilitat de desequilibri de lligament codificat com recull la llegenda.

		N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
T-786C / ecNOS4ab	Δ'	0.3041	0.3824	0.5080	0.2200	-	-	0.4850	0.3792	0.3521
	p	0.0280	0.0001	0.0003	0.0476	0.2211	0.1016	0.0015	0.0008	0.0314
	N	96	94	106	96	68	88	72	91	42
T-786C / G894T	Δ'	0.1361	0.2825	0.1716	-	0.1694	0.3820	0.2698	0.1995	0.1680
	p	0.0127	0.0001	0.0009	0.1074	0.0227	0.0001	0.0001	0.0020	0.0139
	N	97	93	107	98	68	86	82	87	42
T-786C / (CA) _n	Δ'	-	0.2098	-	0.2737	0.3757	0.3176	-	0.2309	-
	p	0.4759	0.0254	0.0793	0.0033	0.0001	0.0001	0.0833	0.0416	0.0750
	N	90	90	102	100	64	70	73	84	36
T-786C / A27C	Δ'	0.4376	0.4430	0.3778	-	-	0.5673	0.4264	0.3675	-
	p	0.0001	0.0001	0.0001	0.3780	0.8042	0.0001	0.0001	0.0001	0.3169
	N	97	94	107	102	67	86	82	94	42
ecNOS4ab/ G894T	Δ'	-	0.3356	0.2740	0.4134	-	0.4999	0.3886	0.4706	0.4253
	p	0.0576	0.0143	0.0003	0.0050	0.0976	0.0034	0.0053	0.0005	0.0640
	N	110	118	116	103	78	91	74	88	49
ecNOS4ab/ (CA) _n	Δ'	-	-	-	0.2217	-	-	-	-	-
	p	0.1162	0.9684	0.2983	0.0131	0.1651	0.6212	0.9616	0.7154	0.7735
	N	99	111	109	99	72	70	66	85	39
ecNOS4ab/ A27C	Δ'	-	-	0.4876	0.2922	0.1508	0.4921	0.4926	0.5412	-
	p	0.2666	0.1795	0.0134	0.0093	0.0237	0.0269	0.0312	0.0018	0.4514
	N	96	101	107	97	70	89	72	92	44
G894T / (CA) _n	Δ'	0.2621	0.2265	0.1886	-	-	0.3017	0.2447	-	0.3563
	p	0.0001	0.0169	0.0189	0.2358	0.5860	0.0005	0.0160	0.0603	0.0207
	N	101	109	109	104	72	70	74	84	39
G894T / A27C	Δ'	0.4218	0.3499	0.4006	0.2657	0.3310	0.4550	0.5970	0.3781	-
	p	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.1386
	N	97	100	108	99	70	87	81	88	44
(CA) _n / A27C	Δ'	0.3670	0.2362	0.2468	0.2107	-	0.2880	-	-	0.3712
	p	0.0002	0.0456	0.0008	0.0388	0.1349	0.0019	0.1834	0.0568	0.0391
	N	90	96	103	101	66	70	74	85	37

Taula IV.14. Valors de Δ' i probabilitats de desequilibri de lligament per les parelles de marcadors del gen NOS3.

VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

Per tal d'analitzar la variació haplotípica entre poblacions, s'ha exclòs de l'estudi la informació aportada pel dinucleòtid (CA)_n per evitar que un excessiu nombre d'haplotips pogués restar potència a les anàlisis. S'han analitzat les parelles de polimorfismes T-786C/ecNOS4ab i G894T/A27C, que presenten la menor distància entre els polimorfismes (4.51 i 10.27 Kb). Les freqüències haplotípiques estimades per màxima versemblança es mostren a la taula IV.15.

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
T-786C/ecNOS4ab									
T / a	0.025	0.038	0.007	0.047	0.066	0.013	0.020		
T / b	0.497	0.524	0.517	0.414	0.492	0.547	0.464	0.506	0.569
T / c	0.006			0.022	0.016				
C / a	0.115	0.159	0.096	0.140	0.049	0.099	0.117	0.179	0.153
C / b	0.357	0.279	0.380	0.377	0.377	0.342	0.399	0.315	0.278
G894T/A27C									
G / A	0.534	0.643	0.481	0.541	0.550	0.556	0.457	0.581	0.615
G / C	0.034	0.037	0.019	0.102	0.122	0.034	0.010	0.030	0.038
T / A	0.213	0.088	0.190	0.135	0.057	0.146	0.252	0.147	0.205
T / C	0.219	0.233	0.310	0.222	0.271	0.265	0.280	0.242	0.143

Taula IV.15. Freqüències haplotípiques de les parelles de polimorfismes T-786C/ecNOS4ab i G894T/A27C.

Una anàlisi de la variances amb les freqüències haplotípiques ha evidenciat la manca de significació de la variació observada en el primer sistema haplotípic. El sistema T-786C/ecNOS4ab reporta un valor de F_{ST} de 0.0028 no significatiu ($p=0.1232$), comportament que s'havia observat en analitzar els dos polimorfismes per separat. En canvi, el sistema G894T/A27C ha mostrat un valor de F_{ST} de 0.0098 amb una forta significació estadística ($p<0.00001$), tal com succeïa amb la variació al·lèlica del polimorfisme G894T analitzat individualment.

Les distàncies genètiques expressades mitjançant una anàlisi de coordenades principals posa de manifest una separació de les poblacions berbers del Mig i Alt Atlas respecte la resta, que no s'organitzen segons cap patró geogràfic (figura IV.11). Les dos primeres coordenades principals expliquen el 80.36% de la variació observada. La primera coordenada separa les poblacions nordafricanes de la resta per una influència predominant de les freqüències dels haplotips G/C, T/a i T/c. El segon eix distribueix les poblacions de forma gradual i sembla no diferenciar cap població tot i que les mostres d' ALEM, C-IBER, S-IBER i SAR-I ocupen els extrems de la distribució. En aquesta segona dimensió tenen una major influència els haplotips C/a, C/b i G/A.

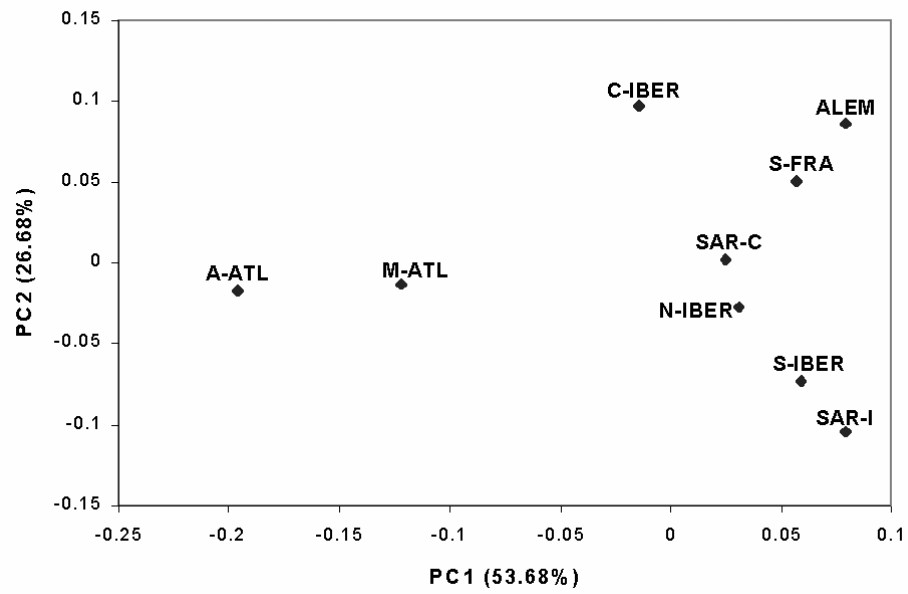


Figura IV.11. Anàlisi de coordenades principals a partir de la informació dels sistemes haplotípics T-786C/ecNOS4ab i G894T/A27C.

ANÀLISI DE LA VARIACIÓ CONJUNTA EN LES NOS

Després de l'anàlisi de la variació intra i interpoblacional de cada *locus* per separat, en aquest apartat es presenten els resultats de l'anàlisi interpoblacional pel conjunt dels 13 polimorfismes dels tres *loci* analitzats en aquest treball.

En la taula IV.16 es mostren els valors mitjans d'heterozigositat i el nombre mitjà d'al·lels per *locus*. Aquestes dades globals reflecteixen el que s'havia anat posant de manifest en analitzar la variabilitat de cada regió cromosòmica per separat. Les poblacions berbers del Nord d'Àfrica es mostren com les més variables, especialment la del Mig Atlas, amb el valor d'heterozigositat més elevat i el major nombre d'al·lels per *locus*. A l'altre extrem es situarien les poblacions sardes, que presenten les heterozigositats i els nombres mitjans d'al·lels més baixos. Cal destacar que el nombre més baix d'al·lels per marcador correspon a la població d'Alemanya, fet possiblement associat al menor tamany mostral d'aquesta població.

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA	ALEM
H _{nb}	0.5000	0.5189	0.5116	0.5404	0.5337	0.5060	0.5005	0.5129	0.5125
N al·lels	5.4615	5.3846	5.5385	5.6154	5.3846	4.9231	5.0769	5.1538	4.8462
N	114	120	120	120	81	95	94	96	49

Taula IV.16. Valors d'heterozigositat i nombre mitjà d'al·lels per *locus* pel conjunt de polimorfismes analitzats.

En el conjunt de poblacions, l'anàlisi de la variances de les freqüències al·lèliques dels 13 polimorfismes evidencia una important variació amb un valor de F_{ST} de 0.96% ($p < 10^{-26}$). Aquest valor global ha estat lleugerament superior quan s'ha realitzat una anàlisi jerarquitzada de la variances. L'agrupació més consistent ha resultat la formada per 3 grups poblacionals: Europa continental (Península Ibèrica, Sud de França i Alemanya), Sardenya i Nord d'Àfrica. Aquesta estructuració ha mostrat un valor global de 1.25% ($p < 0.00001$), on la variances entre grups ($F_{CT}=0.91%$, $p < 0.00001$) ha resultat superior a la variances dins dels grups ($F_{SC}=0.35%$, $p < 0.00001$).

A partir de les freqüències al·lèliques, s'ha elaborat una matriu de distàncies calculades mitjançant el coeficient de Reynolds (que es mostren a l'annex 3) i s'han representat en un dendrograma tipus *neighbor-joining* (figura IV.12a). Aquest dendrograma reuneix les poblacions analitzades en tres *clusters*: un que agrupa les poblacions europees continentals (amb una lleugera diferenciació de les poblacions del Centre de la Península i d'Alemanya), un amb les poblacions berbers i un que separa les mostres sardes. La llargada i la robustesa de les branques (especialment en el *cluster* sard) donen suport a aquesta estructuració.

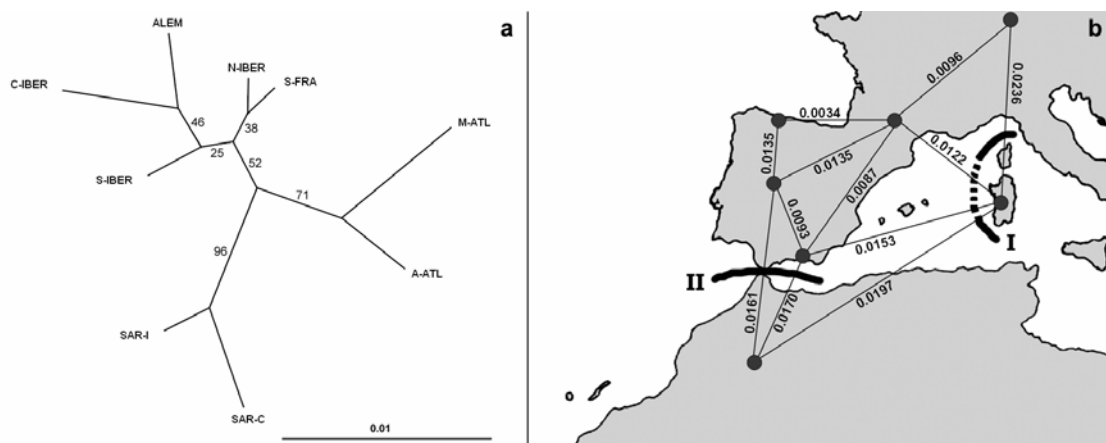


Figura IV.12. Representacions de la matriu de distàncies genètiques de Reynolds pel conjunt de polimorfismes analitzats. a) *Neighbor-joining*. La robustesa de les branques ha estat estimada amb 100 repeticions bootstrap. b) Anàlisi de xarxes de Delaunay, els números corresponen a la distància genètica entre parells de poblacions i les línies gruixudes representen les possibles barreres genètiques. Les poblacions berbers i sardes s'han agrupat per clarificar la representació i les distàncies de Reynolds han estat promitjades.

Amb la mateixa matriu de distàncies, s'ha efectuat una anàlisi de xarxes de Delaunay (Brassel i Reif, 1979; Simoni et al., 1999) per tal de detectar possibles regions de canvi genètic bruscat, que podrien indicar la presència de barreres genètiques (figura IV.12b). Aquesta anàlisi no és més que la representació sobre un mapa físic de les distàncies de Reynolds, però pot ser d'utilitat per detectar patrons de distribució genètica difícils d'apreciar en dendrogrames o coordenades principals. En el nostre cas, aquesta anàlisi posa de manifest un aïllament important de les poblacions sardes respecte les poblacions del Centre d'Europa i del

Nord d'Àfrica, però no de les poblacions de la riba mediterrània europea (representat per una línia discontinua en la figura). En segon terme, pot apreciar-se una lleugera separació entre les poblacions berbers del Nord d'Àfrica i les mostres de la Península Ibèrica.

L'anàlisi conjunta de la variances dels sistemes haplotípics dels gens NOS1 (sistema (AAT)_n/C3391T), NOS2 (sistemes (CCTTT)_n/(AAAT)_n i A300G/C150T) i NOS3 (sistemes T-786C/ecNOS4ab i G894T/A27C) ha evidenciat una variabilitat significativa, amb un valor de F_{ST} significatiu de 0.0108 ($p < 10^{-15}$). A més, la informació d'aquests haplotips ha estat emprada per fer una anàlisi de coordenades principals, les dues primeres coordenades de la qual han explicat el 57.36% (figura IV.13a). La primera component separa les poblacions del Mig i Alt Atlas marroquí de la resta de poblacions i ve influenciada, principalment, per al·lels dels haplotips (CCTTT)_n/(AAAT)_n. La segona component remarca en un extrem la població d'Alemanya i a l'altre les poblacions sardes de la costa i de l'interior.

Amb la finalitat de tenir una aproximació als possibles efectes de migració i deriva sobre el patró de variació genètica poblacional observat, s'ha realitzat una regressió lineal entre les heterozigositats de les poblacions i la distància d'aquestes al centre, tal i com s'ha descrit a l'apartat de Material i Mètodes (Harpending i Jenkins, 1973). En analitzar aquesta regressió a partir de la informació dels sistemes haplotípics (figura IV.13b), l'única població que es separa significativament de la recta inferida és la d'Alemanya, reflexant una menor variabilitat de l'esperada. Tenint en compte que aquesta mostra representa població general d'Alemanya, és molt poc plausible considerar un possible efecte d'aïllament d'aquesta població. És més probable que es degui a un biaix, especialment en tenir en compte els sistemes haplotípics que inclouen microsatèl·lits, degut al menor nombre d'individus analitzats en aquesta població, que podria simular un defecte de variabilitat.

És curiós constatar que les poblacions sardes no mostren aquest possible efecte d'aïllament. Tot i que es diferencien de les altres poblacions i que mostren els valors més baixos de variabilitat per molts dels marcadors analitzats, en la representació de la regressió ni tan sols es mostren per sota de la recta estimada.

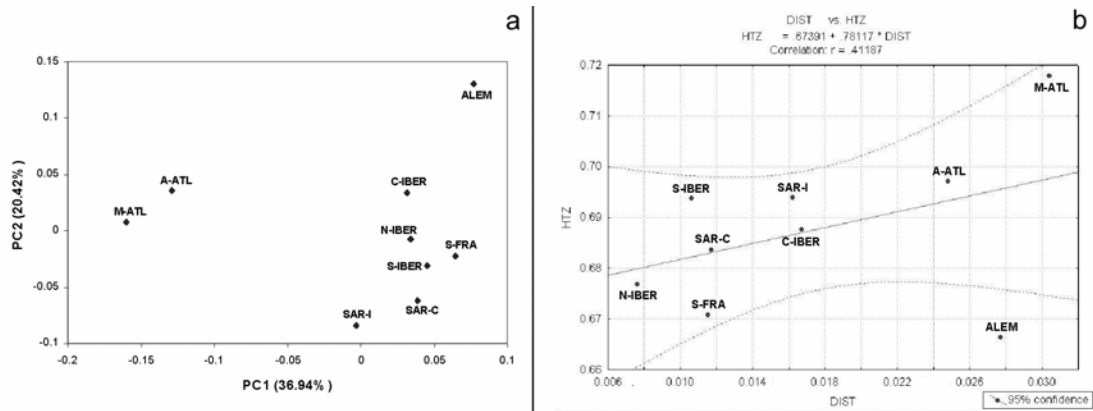


Figura IV.13. Anàlisis realitzades a partir de la informació dels dels sistemes haplotípics dels gens NOS1 (sistema $(AAT)_n/C3391T$), NOS2 (sistemes $(CCTTT)_n/(AAAT)_n$ i $A300G/C150T$) i NOS3 (sistemes $T-786C/ecNOS4ab$ i $G894T/A27C$). a) Anàlisi de coordenades principals. b) Representació de l'heterozigositat vs. la distància al centroide, amb l'interval de confiança del 95%.

RESULTATS I DISCUSSIÓ ESTUDI EPIDEMIOLÒGIC

En aquest apartat s'inclouen els resultats obtinguts en les anàlisis realitzades sobre la mostra de famílies amb un fill afectat de CAI.

VARIACIÓ AL·LÈLICA I HAPLOTÍPICA

VARIACIÓ AL·LÈLICA

Les freqüències al·lèliques, heterozigositats i probabilitats de desequilibri de Hardy-Weinberg es mostren a les taules IV.17 i IV.18 i a la figura IV.14, il·lustrant els resultats dels polimorfismes bial·lèlics i multial·lèlics per separat. Les dades es troben dividides en tres grups: mostra total, pares i fills afectats.

D'entre els marcadors bial·lèlics cal destacar els polimorfismes NOS1 C3391T, NOS2 A300G, NOS3 C-786T, i NOS3 G894T com els més variables amb valors d'heterozigositat màxims per aquest tipus de marcadors (0.5026, 0.4955, 0.5000, i 0.5017, respectivament, en el grup de fills malalts). Sense conèixer *a priori* l'interès epidemiològic d'aquests marcadors, podem considerar-los com els més informatius en la nostra població. Aquest resultat contrasta, tal com es discutirà més endavant, amb les dades d'alguns d'aquests marcadors en d'altres poblacions europees on es mostren molt menys variables (per exemple, el NOS3 G894T). Cal destacar, tal com s'ha fet en l'anàlisi poblacional, el fet que el tetranucleòtid NOS2 (AAAT)_n només ha presentat dos al·lells i una heterozigositat relativament baixa.

Els marcadors multial·lèlics es mostren, com era d'esperar, molt més variables amb valors d'heterozigositat molt superiors (el màxim en la mostra de fills correspon al marcador NOS3 (CA)_n amb un valor de 0.9155). Tot i així, cal destacar la relativa poca variabilitat mostrada pel marcador NOS1 3'-(GT)_n, amb una heterozigositat de 0.4404 en la mostra de fills malalts. Tot i presentar nou al·lells diferents, un d'aquests (el de 17 repeticions) representa més del 70% de la freqüència. És interessant veure els diferents patrons de variació al·lèlica que presenten el microsatèl·lits, amb distribucions unimodals, bimodals i trimodals de les freqüències.

No es pot considerar que hi hagi diferències importants de les assumpcions de l'equilibri de Hardy-Weinberg pels marcadors bial·lèlics, tot i que apareguin en

alguns casos probabilitats lleugerament inferiors al límit de significació de 0.05 (el valor més baix és de 0.0311 pel NOS3 C-786T en la submostra de pares). A més, s'ha de tenir en compte el nombre de tests realitzats i que les petites desviacions observades no s'observen en cap cas en la mostra de pares i fills per separat.

Entre els multial·lèlics, només s'observen desviacions considerables de l'equilibri de Hardy-Weinberg en el STR menys variable, el polimorfisme NOS1 3'-(GT)_n, amb probabilitats de 0.0026 i 0.0055, en les mostres de pares i fills malalts, respectivament.

La variació en aquests marcadors s'emmarca en el rang observat per les poblacions de la Península Ibèrica analitzades en el bloc anterior de resultats. Tot i així, cal destacar la major diversitat observada pel marcador NOS1 3'-(GT)_n en la mostra de famílies (amb heterozigositats de 0.42-0.44, comparada amb 0.28-0.35 en les poblacions ibèriques), així com pel polimorfisme NOS2 (AAAT)_n, on les poblacions ibèriques mostren també menys variabilitat (H_{nb} de 0.24-0.27 en les famílies i 0.14-0.22 en les poblacions ibèriques).

MARC.		TOTAL	PARES	FILLS	MARC.		TOTAL	PARES	FILLS
NOS1 C3391T	C	0.518	0.545	0.495	NOS3 C-786T	T	0.562	0.558	0.536
	T	0.482	0.455	0.505		C	0.438	0.442	0.464
	N	279	132	93		N	291	139	97
	H_{nb}	0.5003	0.4978	0.5026		H_{nb}	0.4932	0.4952	0.5000
	HW (p)	-	0.5194	0.2547		HW (p)	-	0.0311	0.5234
NOS2 G-954C	G	0.836	0.842	0.810	NOS3 ecNOS4	a	0.136	0.150	0.138
	C	0.164	0.158	0.190		b	0.864	0.850	0.862
	N	299	143	100		N	295	141	98
	H_{nb}	0.2745	0.2613	0.3093		H_{nb}	0.2348	0.2544	0.2388
	HW (p)	-	0.0898	0.0385		HW (p)	-	0.7316	0.6341
NOS2 (AAAT) _n	4	0.855	0.842	0.862	NOS3 G894T	G	0.519	0.522	0.521
	5	0.145	0.158	0.138		T	0.481	0.478	0.479
	N	275	133	94		N	291	139	97
	H_{nb}	0.2490	0.2669	0.2396		H_{nb}	0.5001	0.5009	0.5017
	HW (p)	-	1.0000	0.7268		HW (p)	-	0.3742	0.4040
NOS2 A300G	G	0.572	0.595	0.560	NOS3 A27C	A	0.699	0.712	0.688
	A	0.428	0.405	0.440		C	0.301	0.288	0.312
	N	277	132	92		N	286	137	96
	H_{nb}	0.4905	0.4839	0.4955		H_{nb}	0.4213	0.4119	0.4319
	HW (p)	-	0.0404	0.8464		HW (p)	-	0.6770	0.1947
NOS2 C150T	C	0.797	0.801	0.777					
	T	0.203	0.199	0.223					
	N	281	136	94					
	H_{nb}	0.3240	0.3194	0.3488					
	HW (p)	-	0.5091	0.0399					

Taula IV.17. (pàgina anterior). Freqüències al·lèliques dels polimorfismes bial·lèlics analitzats en la mostra de famílies amb fills afectats per la CAI. H_{nb} : heterozigositat estimada sense biaix (non-biased); HW (p): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg.

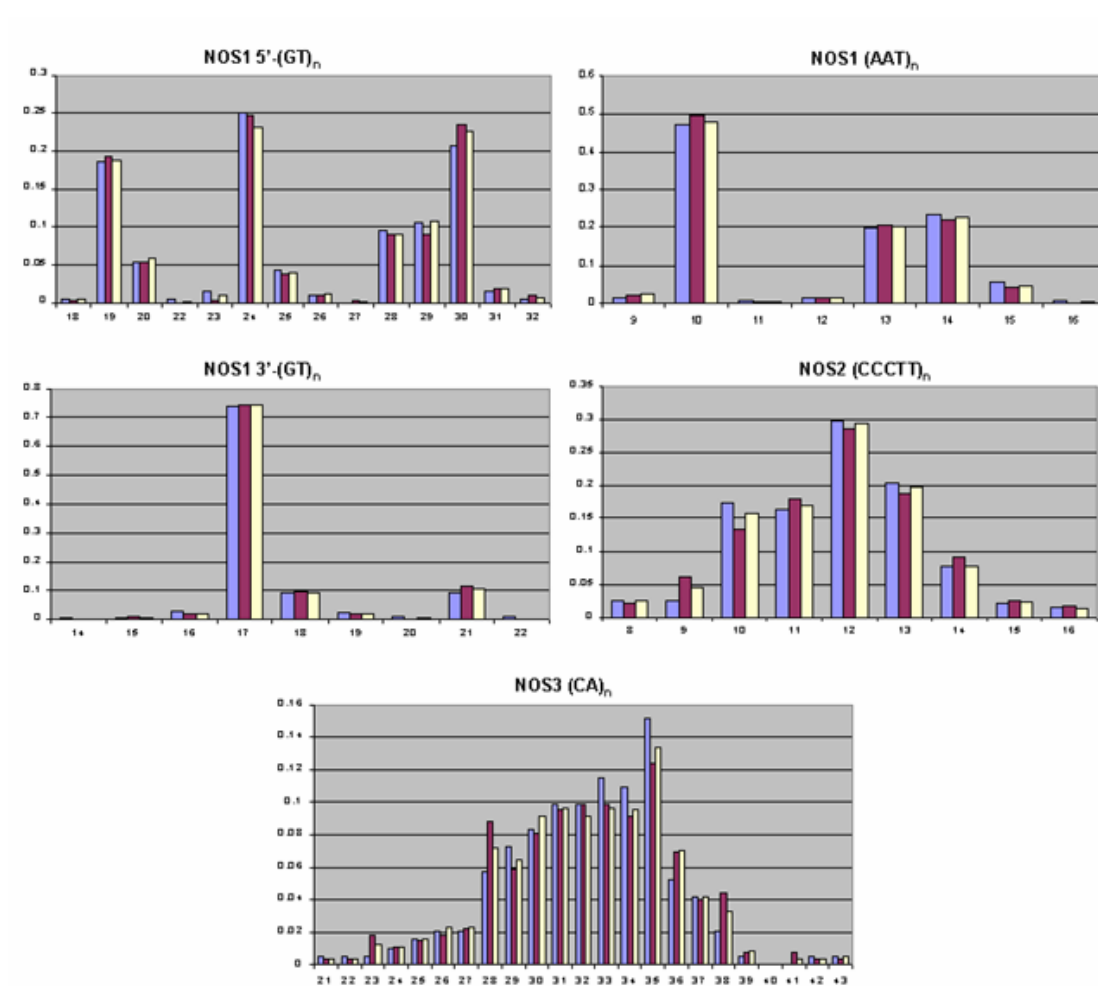


Figura IV.14. Gràfics de freqüències al·lèliques dels polimorfismes multial·lèlics analitzats en la mostra de famílies. Les barres de color blau, vermell i groc corresponen a les mostres de fills malalts, pares i mostra total, respectivament.

MARC.		TOTAL	PARES	FILLS	MARC.		TOTAL	PARES	FILLS	
NOS1 5'(GT) _n	18	0.005	0.004	0.005	NOS2 (CCTTT)	8	0.026	0.021	0.026	
	19	0.187	0.193	0.186		9	0.045	0.060	0.026	
	20	0.059	0.053	0.053		10	0.158	0.134	0.173	
	22	0.002		0.005		11	0.170	0.180	0.163	
	23	0.011	0.004	0.016		12	0.293	0.285	0.296	
	24	0.232	0.246	0.250		13	0.197	0.187	0.204	
	25	0.040	0.038	0.043		14	0.077	0.092	0.077	
	26	0.013	0.011	0.011		15	0.022	0.025	0.020	
	27	0.002	0.004	0.000		16	0.014	0.018	0.015	
	28	0.090	0.091	0.096		N	292	142	98	
	29	0.108	0.091	0.106		H _{nb}	0.8141	0.8232	0.8104	
	30	0.227	0.235	0.207		HW(p)	-	0.4208	0.1523	
	31	0.018	0.019	0.016		NOS3 (CA) _n	21	0.004	0.004	0.005
	32	0.007	0.011	0.005			22	0.004	0.004	0.005
	N	278	132	94			23	0.012	0.018	0.005
H _{nb}	0.8358	0.8286	0.8384	24	0.011		0.011	0.010		
HW (p)	-	0.9885	0.6769	25	0.016		0.015	0.016		
NOS1 (AAT) _n	9	0.024	0.022	0.015	26		0.023	0.018	0.021	
	10	0.479	0.496	0.469	27		0.023	0.022	0.021	
	11	0.003	0.004	0.005	28		0.072	0.088	0.057	
	12	0.016	0.011	0.015	29		0.065	0.058	0.073	
	13	0.202	0.208	0.199	30		0.091	0.080	0.083	
	14	0.225	0.219	0.235	31		0.097	0.095	0.099	
	15	0.047	0.040	0.056	32		0.091	0.099	0.099	
	16	0.003		0.005	33		0.097	0.099	0.115	
	N	287	137	98	33		0.097	0.099	0.115	
H _{nb}	0.6772	0.6626	0.6848	34	0.095		0.091	0.109		
HW (p)	-	0.9605	0.0869	35	0.134	0.124	0.151			
NOS1 3'(GT) _n	13	0.002		0.005	36	0.070	0.069	0.052		
	15	0.005	0.007	0.005	37	0.042	0.040	0.042		
	16	0.019	0.018	0.026	38	0.033	0.044	0.021		
	17	0.744	0.741	0.737	39	0.009	0.007	0.005		
	18	0.095	0.097	0.093	40					
	19	0.019	0.018	0.021	41	0.004	0.007			
	20	0.005	0.004	0.010	42	0.004	0.004	0.005		
	21	0.108	0.115	0.093	43	0.005	0.004	0.005		
	22	0.003		0.010	N	284	137	96		
	N	291	139	97	H _{nb}	0.9202	0.9237	0.9155		
H _{nb}	0.4258	0.4291	0.4404	HW(p)	-	0.0214	0.0215			
HW (p)	-	0.0026	0.0055							

Taula IV.18. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes multial·lèlics analitzats en la mostra de famílies amb fills afectats per la CAI. El nom de cada al·lel correspon al nombre de repeticions de la seqüència consensu. H_{nb}: heterozigositat estimada sense biaix (non-biased); HW (p): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg.

DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT

A la figura IV.15 pot observar-se el gràfic resum de la distribució del desequilibri de lligament al llarg dels tres *loci* analitzats.

LOCUS NOS1

Malgrat que les distàncies que separen els diferents polimorfismes del *locus* NOS1 són més grans que en els altres dos *loci* analitzats (entre 16 i 147 Kb) i que tres dels marcadors són STRs amb un nombre elevat d'al·lels, s'ha detectat desequilibri de lligament al llarg de tota la regió gènica analitzada. L'única excepció s'ha trobat a la mostra de fills en les parelles 5'-(GT)_n/(AAT)_n i 5'-(GT)_n/C3391T ($p=0.2896$ i $p=0.5257$, respectivament). La resta de parelles de marcadors presenten desequilibris de lligament significatius.

El desequilibri de lligament més fort es detecta entre els polimorfismes cromosòmicament més distants, 5'-(GT)_n i 3'-(GT)_n, amb valors de D' de 0.4394 i 0.5004 en pares i fills ($p<0.0001$), fet que contrasta amb la distància que els separa (unes 147 Kb). L'anàlisi de les diferents parelles d'al·lels indica que alguns al·lels poc freqüents només apareixen amb determinats al·lels de l'altre marcador. A més, l'al·lel de 30 repeticions del 5'-(GT)_n apareix fortament lligat amb l'al·lel de 17 repeticions del 3'-(GT)_n ($D'=0.85$ en la mostra total). En ser dels al·lels més freqüents per cada marcador (amb freqüències de 0.235 i 0.741, respectivament en la mostra de pares), determinen en bona mesura la presència d'un remarcable desequilibri de lligament.

Aquest elevat grau de desequilibri de lligament al *locus* NOS1 es veu confirmat per resultats semblants obtinguts en les poblacions ibèriques de N-IBER i S-IBER, on totes les combinacions haplotípiques (excepte la parella (AAT)_n/3'-(GT)_n en la mostra de S-IBER) presenten desequilibri de lligament significatiu.

LOCUS NOS2

L'anàlisi al llarg del *locus* NOS2 indica que el desequilibri de lligament més fort es troba entre els polimorfismes (AAAT)_n i A300G amb un valor de D' de 1.0 ($p<0.001$), que indica un lligament total. L'al·lel A del polimorfisme A300G es troba sempre

associat a l'al·lel de 4 repeticions del (AAAT)_n. També presenten un lligament total ($D'=1.0$) els polimorfismes (AAAT)_n i C150T, on l'al·lel T del C150T només es troba associat a l'al·lel de 4 repeticions del (AAAT)_n. Tot i aquest lligament total, les probabilitats inferides pel programa GENETIX no corroboren del tot aquest lligament ($p=0.0327$ i $p=0.1124$ en fills i pares respectivament). Això pot ser degut a que els valors de D' han estat calculats a partir d'haplotips inequívocs, mentre que el programa GENETIX analitza les dades sense conèixer la fase dels polimorfismes.

Cal mencionar també el fort grau de desequilibri entre els polimorfismes (CCTTT)_n i (AAAT)_n, amb valors de 0.6292 i 0.6045 ($p<0.001$), donada l'elevada variabilitat del primer marcador. L'al·lel de 5 repeticions del marcador (AAAT)_n només va acompanyat en la mateixa fase per al·lells de més de 10 repeticions del marcador (CCTTT)_n.

D'altra banda, també resulta destacable l'absència total de desequilibri de lligament del polimorfisme G-954C amb la resta de marcadors del gen, sobretot amb els altres dos polimorfismes de la regió promotora. Els polimorfismes (CCTTT)_n i (AAAT)_n es troben a només 1627 i 201 pb, respectivament, a banda i banda del polimorfisme G-954C i sí que presenten un fort desequilibri entre ells. Aquesta absència de desequilibri de lligament amb la resta de polimorfismes ha quedat constatada també en la mostra poblacional del sud de la Península Ibèrica (Dra. Alessandra Falchi, comunicació personal).

LOCUS NOS3

En termes generals, el *locus* NOS3 també presenta un fort desequilibri de lligament al llarg de la regió analitzada. Els marcadors més allunyats entre si, els SNPs T-786C i A27C, presenten un fort valor de desequilibri de lligament amb valors de D' superiors al 80% (amb $p<0.001$), encara que els separen unes 16.6 Kb.

Tot i així, l'elevada variabilitat del dinucleòtid (CA)_n impedeix detectar desequilibris de lligament significatius entre aquest marcador i la resta. Només el polimorfisme més proper, el G894T a 3.3 Kb, mostra un cert desequilibri de lligament i només en la mostra de fills malalts ($D'=0.3671$, $p=0.0048$). D'altres dos marcadors (el T-786C i el A27C) mostren valors de desequilibri de lligament amb el

microsatèl·lit propers al llindar convencional de significació ($p=0.0503$ i $p=0.0600$, respectivament) però, a l'igual que en el cas anterior, només en la mostra de fills.

El desequilibri de lligament més fort és el detectat entre els polimorfismes T-786C i ecNOS4a/b, amb valors de D' superiors al 70% en pares i fills (0.7548 i 0.7215, respectivament) i probabilitats de significació molt baixes ($p=0.0003$ i $p=0.0025$). Els haplotips T-b i C-a es presenten més habitualment de l'esperat sense desequilibri de lligament.

Comparant aquests resultats amb els obtinguts en les mostres poblacionals de la Península Ibèrica, cal destacar l'absència, excepte en la població de S-IBER, de desequilibri de lligament entre els polimorfismes ecNOS4ab i A27C, que sí es detecta en les mostres de pares i de fills.

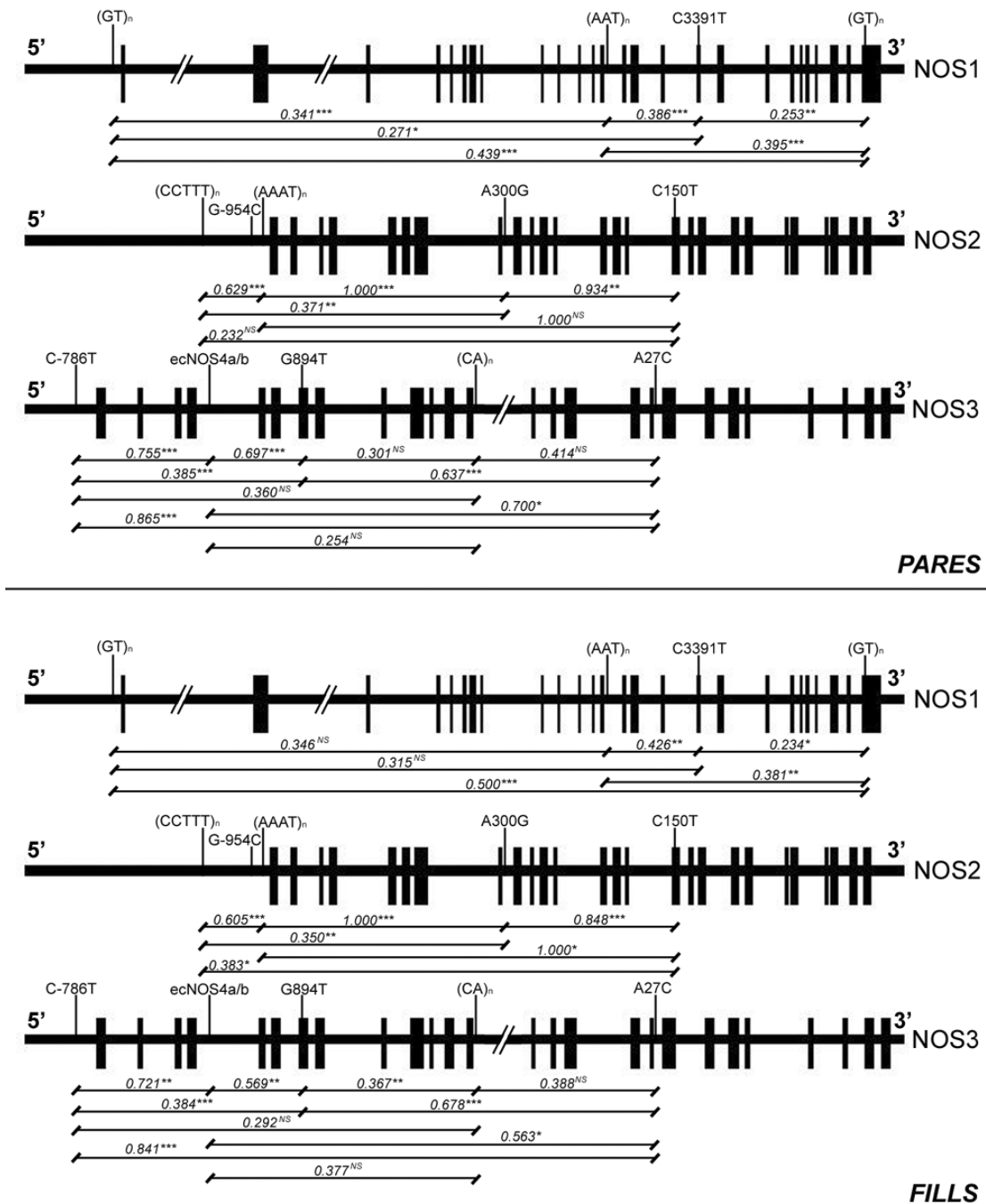


Figura IV.15. D' de desequilibri de lligament entre parelles de marcadors dels tres loci analitzats en les mostres de pares i fills malalts. La significació del desequilibri de lligament està representada per cada valor de D': NS, $p > 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. No s'han indicat els valors de D' entre el polimorfisme NOS2 G-954C i la resta de polimorfismes del mateix gen ja que cap d'ells ha estat significatiu.

VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

A partir de la informació genotípica i de la composició de les famílies, s'han pogut reconstruir els haplotips inequívocament en la majoria de casos.

Per totes les parelles de polimorfismes analitzats d'un mateix *locus*, en més del 80% dels individus s'ha pogut establir de forma inequívoca quines eren les fases haplotípiques de les que era portador. De fet, en diversos sistemes s'han pogut arribar a reconstruir més del 95% dels haplotips de la mostra (taula IV.19).

En termes generals, les freqüències haplotípiques en la mostra de famílies amb un fill afectat per CAI s'emmarquen dins de la variació presentada per les poblacions ibèriques analitzades, i que havien estat estimades per màxima versemblança.

NOS1	5'(GT) _n	(AAT) _n	C3391T	NOS2	CCTTT	AAAT	A300G
5'(GT) _n				CCTTT			
(AAT) _n	239 88.52%			AAAT	254 93.38%		
C3391T	221 84.35%	245 89.42%		A300G	236 86.45%	247 95.74%	
3'(GT) _n	243 89.01%	248 86.71%	255 91.40%	C150T	234 84.48%	253 95.47%	240 89.89%

NOS3	T-786C	4a/b	G894T	(CA) _n
T-786C				
4a/b	272 93.47%			
G894T	242 84.62%	268 93.70%		
(CA) _n	231 82.50%	268 94.70%	229 81.49%	
A27C	254 89.12%	273 95.79%	247 87.90%	240 87.27%

Taula IV.19. Nombre d'individus en que s'ha pogut reconstruir inequívocament el seu haplotip i proporció respecte el total d'individus.

ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE LA TRANSMISSIÓ (TDT)

Un dels objectius principals del present treball de tesi doctoral és avaluar la implicació de les tres regions gèniques estudiades en la cardiopatia isquèmica, a través de l'anàlisi de possibles transmissions diferencials d'algun al·lel o haplotip mitjançant el TDT.

Per tal d'utilitzar la major quantitat possible d'informació, les anàlisis del TDT han estat realitzades amb el programa TRANSMIT (Clayton, 1999). Aquest programa inclou en els càlculs tots els individus, inferint el genotip i la fase haplotípica en aquells casos en què no està clara aquesta informació. En comparació amb el càlcul del TDT utilitzant només les transmissions inequívokes, el TRANSMIT permet estimar el TDT sobre la base d'una mostra més gran incrementant el poder estadístic per a detectar les possibles associacions presents. D'altra banda, l'ús només de les transmissions informatives pot resultar, en alguns casos, en una disminució del tamany mostral analitzat però té el valor afegit que no fa cap estimació i el TDT només es calcula amb informació inequívoca.

S'ha testat mitjançant el programa TRANSMIT el valor de TDT de tots els al·lells de tots els polimorfismes, així com de tots els haplotips formats per parelles de marcadors. Els valors de TDT amb cert grau de significació detectats amb el paquet informàtic han estat recalculats tenint en compte només les transmissions inequívokes observades en el conjunt de les famílies examinades.

Els resultats posen de manifest la presència d'associacions interessants amb alguns marcadors de les tres regions gèniques. Per tal de simplificar l'exposició d'aquests resultats en les taules IV.20, IV.21 i IV.22 es mostren només els resultats destacables de l'anàlisi del TDT per cadascun dels tres *loci*. La resta d'anàlisis del TDT amb els polimorfismes analitzats es mostren a l'annex 4.

LOCUS NOS1

A la regió cromosòmica del gen NOS1 s'han observat certes associacions relacionades amb la variació del polimorfisme C3391T i els seus haplotips (taula IV.20).

El marcador C3391T és l'únic que ha mostrat cert grau de significació en ser analitzat individualment. Els càlculs amb el programa TRANSMIT reporten valors propers al llindar convencional de significació tant pel càlcul del TDT com pel test de repeticions *bootstrap* ($p=0.078$ i $p=0.088$, respectivament). En analitzar només les transmissions inequívokes, el valor del TDT augmenta fins a 4.245 ($p=0.039$). D'un total de 53 parets heterozigots informatius, s'observa un excés de transmissions de l'al·lel T (o un dèficit de transmissions de l'al·lel C) que suposa un risc relatiu (RR) de 1.789 (IC 95%: 1.040-3.410).

Aquesta tendència es veu clarificada quan s'ha analitzat la variació dels haplotips formats pel C3391T i el dinucleòtid 3'-(GT)_n amb els al·lells agrupats. El sistema haplotípic format per aquests dos polimorfismes s'associa globalment amb la malaltia, amb probabilitats de 0.0426 i 0.0245 (pel TDT i el test *bootstrap*, respectivament). Analitzant els resultats de cada haplotip, destaca la combinació formada per l'al·lel T del SNP i al·lells de <20 repeticions del microsatèl·lit, amb probabilitats significatives pel TDT i el test de repeticions. Si es tenen en compte només els 45 parets informatius, el TDT continua per sota del llindar de significació de 0.05 ($\chi^2=5.00$, $p=0.0253$), mostrant un excés de transmissions (30 transmissions observades i 15 no transmissions). Aquest excés suposa un risc relatiu de 2.00 (IC 95%: 1.110-4.187).

Complementàriament a aquesta associació, l'haplotip C/<20 del mateix sistema mostra valors propers al llindar de significació amb els càlculs del programa TRANSMIT i lleugerament significatius només amb les transmissions inequívokes ($\chi^2=3.92$, $p=0.0477$). El dèficit de transmissions observat (18 transmissions vs. 32 no transmissions) suposa un RR de 0.563 (IC 95%: 0.289-0.983).

Aquest suposat efecte "protector" de l'haplotip C/<20 es veu parcialment recolçat pels resultats obtinguts de l'anàlisi del sistema haplotípic (AAT)_n/C3391T. El defecte en les transmissions de l'haplotip 9/C mostra valors significatius pel TDT ($p=0.0105$ i 0.0143 , pel TRANSMIT i a partir de transmissions inequívokes, respectivament). Tot i aquests resultats, la manca d'associació pel test *bootstrap*

($p=0.1581$) i el baix nombre mostral d'aquesta anàlisi ($\text{Var}(O-E)<2.5$ i només 6 parels informatius) no semblen confirmar aquesta possible associació.

La resta d'anàlisis efectuades sobre els altres polimorfismes d'aquest *locus*, tant individualment com en combinacions d'haplotips, no reporten cap altre indicatiu d'associació destacable, ja sigui analitzant els microsatèl·lits amb tots els al·lels com realitzant-ne agrupacions.

El conjunt de resultats permeten suposar l'existència d'un factor genètic de risc per la cardiopatia isquèmica en la mostra examinada que estaria en desequilibri de lligament amb l'haplotip T/<20 del sistema C3391T/3'-(GT)_n. Aquest haplotip es troba en freqüències de 0.3636 en parels i 0.4128 en fills malalts, i reflectiria un factor de risc amb un RR al voltant de 2.

Les troballes per l'haplotip C/<20 semblen corroborar aquesta associació. Donat que els haplotips que inclouen al·lels del STR amb menys de 20 repeticions són el 90.50% en parels i el 88.95% en fills malalts, la majoria dels parels informatius pel TDT són heterozigots C/<20 - T/<20 i l'excés en el nombre de transmissions detectada per l'haplotip T/<20 provoca, indirectament, el lleuger defecte de transmissions per l'haplotip C/<20, que s'acosta als llindars habituals de significació.

A més, també s'ha de destacar l'associació global que mostra el *locus* C3391T/3'-(GT)_n amb l'extensió del TDT per marcadors multial·lèlics (Sham i Curtis, 1995), tal com es mostra a la filera "Global" de la taula IV.20. Mentre que el TDT convencional avalua la transmissió d'un al·lel concret respecte la resta, aquesta extensió del TDT permet analitzar la possible associació global del sistema multial·lèlic analitzat.

MARCADOR	N	Al·lel o Haplot.	Transmis. Observ.	Transmis. Esper.	Var (O-E)	TDT (χ^2)	gdl	p	BT-p
C3391T	90	C	88	95.451	17.88	3.105		0.0781	0.0875
		T	92	84.549	17.88	3.105		0.0781	0.0875
		Global				3.105		0.0781	0.0875
C3391T 3'-(GT) _n	94	C/<20	90.508	98.384	18.178	3.413		0.0647	0.0717
		T/<20	77.492	68.470	16.131	5.046		0.0247	0.0205
		C/≥20	3.297	2.527	0.527	1.123		0.2893	0.0659
		T/≥20	16.704	18.618	6.181	0.593		0.4412	0.4524
		Global				8.172	3	0.0426	0.0245
(AAT) _n C3391T	92	9/C	1	4.711	2.104	6.546		0.0105	0.1581
		9/T	2	1.185	0.493	1.347		0.2458	0.2653
		10/C	63.179	64.208	16.597	0.064		0.8006	0.8046
		10/T	24.821	25.640	9.427	0.071		0.7898	0.7850
		11/T	1	0.538	0.247	0.862		0.3532	0.2547
		12/C	3	2.102	0.993	0.813		0.3672	0.2698
		12/T	1	1.077	0.494	0.012		0.9128	0.7291
		13/C	7.850	11.544	4.667	2.924		0.0873	0.2193
		13/T	28.150	25.080	7.560	1.247		0.2641	0.3256
		14/C	13.573	12.391	4.968	0.281		0.5960	0.6040
		14/T	27.427	25.885	8.528	0.279		0.5973	0.5461
		15/C	4.688	4.638	2.103	0.001		0.9727	0.9676
		15/T	6.313	5.002	2.198	0.782		0.3766	0.4515
		Global				15.577	12	0.2114	0.4356

Taula IV.20. Resultats destacats del TDT pels polimorfismes i haplotips del NOS1, calculats amb el programa TRANSMIT. En gris i negreta es resalten els resultats citats en el text. N: nombre de famílies incloses en l'anàlisi; Var(O-E): variança de les transmissions observades menys les esperades; gdl: graus de llibertat (si no s'indica res, és 1); BT-p: probabilitat del test bootstrap (10000 repeticions).

LOCUS NOS2

En el gen NOS2 només s'han observat resultats amb cert grau de significació per al pentanucleòtid (CCTTT)_n de la regió promotora, tant ell sol com en combinació amb els marcadors G-954C i (AAAT)_n (taula IV.21).

L'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid es transmet gairebé la meitat de vegades de les que serien esperades per herència mendeliana. Tant el TDT calculat pel TRANSMIT com el test *bootstrap* confirmen aquestes diferències en el nombre de transmissions respecte l'esperat per atzar. Quan el TDT és calculat manualment, obtenim un valor de 4.571 ($p=0.0325$) sobre un total de 3 transmissions observades i 11 no transmissions. Aquesta observació suposa un RR de 0.273 (IC 95%: 0.000-0.766), és a dir, un individu portador de l'al·lel de 9 repeticions tindria 3.66 (1 /

0.273) vegades menys risc de patir cardiopatia isquèmica que un individu no portador de l'al·lel.

Aquesta associació es manté en mirar els resultats del TDT en els haplotips que inclouen l'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid amb determinats al·lells dels polimorfismes G-954C i (AAAT)_n. L'haplotip 9/G format per la parella (CCTTT)_n/G-954C dóna un valor de TDT de 6.550, amb un defecte important també en el nombre de transmissions observades. El càlcul manual dóna un valor de TDT de 5.333 ($p=0.0209$), confirmant així el defecte en el nombre de transmissions (2 transmissions i 10 no transmissions no observades). El RR estimat per aquest haplotip és de 0.20 (IC 95%: 0.000-0.618). Tot i així, aquesta associació no queda refrendada pel test de repeticions *bootstrap* ($p=0.1323$).

L'al·lel de 4 repeticions del marcador (AAAT)_n dóna associació en formar haplotip amb l'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid (CCTTT)_n. L'haplotip 9/4 s'associa amb la malaltia amb una probabilitat de 0.0075, encara que el test *bootstrap* no confirma aquesta associació ($p=0.123$). El TDT a partir d'informació inequívoca es queda als límits habituals de significació amb un valor de 3.600 ($p=0.0578$), amb 2 transmissions observades i 8 no transmissions (el RR estimat és de 0.25, amb un IC 95% de 0.000-0.828).

Els haplotips que inclouen l'al·lel de 9 repeticions del (CCTTT)_n amb al·lells dels marcadors A300G i C150T mostren valors de TDT propers al llindar de significació de 0.05 (per exemple, 0.0775 per l'haplotip 9/A i 0.0779 per l'haplotip 9/T), però no s'han destacat en la taula IV.21 per què presenten variacions de les transmissions observades menys les esperades molt inferiors a 2.5, que és el valor mínim per garantir la validesa dels resultats.

L'associació observada per l'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid és l'única detectada d'un marcador aïllat del gen NOS2. La resta d'associacions són detectades en haplotips de l'al·lel de 9 repeticions amb al·lells molt freqüents o amb qui presenta desequilibri de lligament positiu. L'al·lel G del marcador G-954C és el més freqüent (0.842 en pares) i es mostra associat a la malaltia en l'haplotip 9/G, segurament perquè arrossega l'associació de l'al·lel 9 del pentanucleòtid. L'haplotip 9/4 ((CCTTT)_n/(AAAT)_n) presenta un lligament total; tots els haplotips inequívocament reconstruïts que inclouen l'al·lel de 9 repeticions del (CCTTT)_n, porten l'al·lel 4 del tetranucleòtid ($D'=1.0$).

MARCADOR	N	Al·lel o Haplot.	Transmis. Observ.	Transmis. Esper.	Var (O-E)	TDT (χ^2)	gdl	p	BT-p
(CCTTT) _n	98	8	5	5.509	2.448	0.106		0.7447	0.7447
		9	5	9.896	3.419	7.011		0.0081	0.0087
		10	35	31.712	11.232	0.962		0.3266	0.3219
		11	34	33.299	12.498	0.039		0.8428	0.8411
		12	59	56.763	18.933	0.264		0.6072	0.5872
		13	39	37.313	11.495	0.248		0.6187	0.6366
		14	16	18.285	7.899	0.661		0.4163	0.4096
		15	4	4.475	1.952	0.115		0.7340	0.7251
		16	3	2.749	1.223	0.052		0.9999	0.8094
		Global				8.786	8	0.3607	0.3404
(CCTTT) _n G-954C	96	8/G	3.964	4.355	1.938	0.079		0.7791	0.7645
		9/G	4.023	8.215	2.682	6.550		0.0105	0.1323
		10/G	29.851	25.893	9.449	1.658		0.1979	0.2479
		11/G	28.143	28.602	10.759	0.020		0.8888	0.8902
		12/G	44.109	43.753	15.513	0.008		0.9281	0.9291
		13/G	32.999	31.919	9.691	0.120		0.7289	0.736
		14/G	13.897	15.343	6.682	0.313		0.5761	0.5914
		15/G	4.009	3.352	1.464	0.295		0.5870	0.5812
		16/G	2.005	1.643	0.734	0.178		0.6728	0.5855
		8/C	0.048	0.571	0.246	1.110		0.2921	0.2626
		9/C	0	1.086	0.490	2.411		0.1205	0.2627
		10/C	4.768	4.716	1.677	0.002		0.9676	0.9649
		11/C	6.437	5.515	2.273	0.374		0.5410	0.5534
		12/C	15.012	12.760	5.007	1.013		0.3142	0.3349
		13/C	6.591	5.830	2.069	0.280		0.5969	0.6059
		14/C	2.143	3.361	1.396	1.061		0.3029	0.3461
15/C	0	0.543	0.245	1.206		0.2721	0.2657		
16/C	0	0.543	0.245	1.206		0.9999	0.2673		
		Global				17.329	17	0.4323	0.6914
(CCTTT) _n (AAAT) _n	98	8/4	5.015	5.550	2.444	0.117		0.7325	0.7473
		9/4	5.027	9.967	3.412	7.153		0.0075	0.1230
		10/4	35.623	32.192	11.247	1.047		0.3063	0.3535
		11/4	34.069	32.823	12.226	0.127		0.7216	0.7356
		12/4	52.669	50.323	17.147	0.321		0.5711	0.5703
		13/4	30.019	26.438	8.704	1.473		0.2248	0.3331
		14/4	9.999	11.341	4.608	0.391		0.5319	0.5690
		15/4	0.005	1.662	0.732	3.750		0.0528	0.1813
		16/4	3.008	2.769	1.220	0.047		0.8288	0.8290
		11/5	0.020	0.626	0.237	1.550		0.2132	0.2654
		12/5	6.464	7.231	2.718	0.216		0.6420	0.6552
		13/5	10.053	11.296	4.019	0.384		0.5353	0.5314
		14/5	6.030	6.982	2.976	0.304		0.5811	0.5957
		15/5	3.999	2.801	1.216	1.180		0.2774	0.3144
				Global				16.915	13

Taula IV.21. Resultats destacats del TDT pels polimorfismes i haplotips del NOS2, calculats amb el programa TRANSMIT. En gris i negreta es resalten els resultats citats en el text. N: nombre de famílies incloses en l'anàlisi; Var(O-E): variança de les transmissions observades menys les esperades; gdl: graus de llibertat (si no s'indica res, és 1); BT-p: probabilitat del test bootstrap (10000 repeticions).

Així doncs, els resultats de les anàlisis realitzades permeten afirmar que l'al·lel de 9 repeticions del polimorfisme NOS2 (CCTTT)_n es presenta associat amb la CAI en la nostra mostra de famílies. Aquest al·lel, que té una freqüència de 0.0599 en la mostra de pares i 0.0255 en la de fills, exerciria un paper protector amb un risc relatiu de l'ordre de 0.2-0.3.

LOCUS NOS3

En l'anàlisi epidemiològica del gen NOS3, les úniques desviacions en la transmissió amb cert grau de significació han estat les que implicaven el microsatèl·lit (CA)_n de l'intró 13. A la taula VI.22 es mostren els resultats més destacables de l'anàlisi del TDT en aquesta regió cromosòmica.

L'anàlisi del microsatèl·lit incloent tota la diversitat d'al·lells revela un cert grau d'associació entre l'al·lel de 38 repeticions i la CAI. Aquest al·lel mostra un valor de TDT de 4.375, amb menys transmissions observades de l'esperat. Aquesta associació no resulta validada ni pel test *bootstrap* ($p=0.1606$) ni pel TDT realitzat només a partir de les transmissions inequívokes ($p=0.0833$).

Amb aquests indicis i tenint en compte els estudis previs realitzats per Stangl et al. (2000), on detectaven que els al·lells del dinucleòtid de ≥ 38 repeticions incrementaven el risc per malaltia arterial coronària, es van provar diferents agrupacions al·lèliques dicotòmiques. L'únic llinar de repeticions que va revelar cert grau d'associació va ser el que diferencia entre al·lells de ≥ 38 repeticions respecte la resta. El TDT calculat pel TRANSMIT dona una probabilitat al límit de la significació ($p=0.0509$), confirmada pel test de *bootstrap* (0.0437) i pel càlcul manual ($p=0.0075$, sobre un total de 14 transmissions vàlides). Així, els al·lells de 38 repeticions o més podrien tenir un paper protector enfront de la CAI amb un RR de 0.167 (IC 95%: 0.000-0.492).

Aquesta associació es manté sobretot en el sistema haplotípic ecNOS4a/b-(CA)_n, on l'haplotip b/ ≥ 38 revela una associació tant pel TDT calculat pel TRANSMIT ($p=0.0406$) com pel *bootstrap* ($p=0.0316$) i per les transmissions inequívokes ($p=0.0067$). D'un total d'onze pares heterozigots informatius, només un ha transmès l'haplotip, suposant un RR de 0.1 (IC 95%: 0.000-0.359). Aquest resultat replica el descrit per al·lells de ≥ 38 repeticions del dinucleòtid, perquè

pràcticament tots aquests al·lels presenten un lligament total ($D'=1.0$) amb l'al·lel b.

Així, podem afirmar que hi ha algun factor genètic de susceptibilitat per la CAI associat als al·lels de ≥ 38 repeticions del dinucleòtid $(CA)_n$. Aquests al·lels, que es presenten amb freqüències de 0.036 i 0.066 en fills malalts i pares, respectivament, estarien associats amb variants protectores que suposarien un risc relatiu de 0.1-0.2.

MARCADOR	N	Al·lel o Haplot.	Transmis. Observ.	Transmis. Esper.	Var (O-E)	TDT (χ^2)	gdl	p	BT-p
$(CA)_n$	98	21	1	0.544	0.248	0.838		0.3598	0.2677
		22	1	0.544	0.248	0.838		0.3598	0.2620
		23	1	3.263	1.491	3.436		0.0638	0.2263
		24	2	2.176	0.988	0.031		0.8598	0.8242
		25	3	2.770	1.240	0.043		0.8365	0.8445
		26	4	4.363	1.966	0.067		0.7957	0.7891
		27	5	4.447	1.991	0.154		0.6948	0.6369
		28	12	16.699	7.258	3.042		0.0811	0.2120
		29	14	11.483	4.565	1.388		0.2387	0.2897
		30	16	16.529	6.117	0.046		0.8307	0.8303
		31	19	17.997	7.306	0.138		0.7106	0.7001
		32	19	18.589	7.755	0.022		0.8826	0.8738
		33	21	17.534	5.792	2.074		0.1498	0.2597
		34	20	18.758	8.210	0.188		0.6646	0.6697
		35	30	25.882	10.906	1.555		0.2124	0.3128
		36	12	15.178	6.425	1.572		0.2099	0.2714
		37	9	7.824	3.368	0.411		0.5216	0.5194
		38	4	7.614	2.986	4.375		0.0365	0.1606
		39	1	1.632	0.745	0.536		0.4642	0.5206
		41	0	1.088	0.496	2.384		0.1226	0.2600
42	1	0.544	0.248	0.838		0.3598	0.2576		
43	1	0.544	0.248	0.838		0.3598	0.2679		
		Global			25.273	21	0.2355	0.5246	
$(CA)_n$	99	<38	191	186.900	4.417	3.813		0.0509	0.0437
		≥ 38	7	11.104	4.417	3.813		0.0509	0.0437
		Global			3.813		0.0509	0.0437	
ecNOS4ab $(CA)_n$	99	a/<38	27.455	25.916	9.672	0.245		0.6207	0.6152
		b/<38	168.910	166.310	13.111	0.517		0.4723	0.4642
		a/ ≥ 38	1.045	1.161	0.492	0.027		0.8683	0.7804
		b/ ≥ 38	6.590	10.615	3.866	4.191		0.0406	0.0316
		Global			4.315	3	0.2294	0.2180	

Taula IV.22. Resultats destacats del TDT pels polimorfismes i haplotips del NOS3, calculats amb el programa TRANSMIT. En gris i negreta es resalten els resultats citats en el text. N: nombre de famílies incloses en l'anàlisi; Var(O-E): variància de les transmissions observades menys les esperades; gdl: graus de llibertat (si no s'indica res, és 1); BT-p: probabilitat del test bootstrap (10000 repeticions).

PODER ANALÍTIC DE LA MOSTRA

Tal com s'ha comentat a la secció de Material i Mètodes, l'anàlisi del poder analític indica la potencialitat de la mostra utilitzada per detectar associacions en funció tant del tamany de la mostra com de la magnitud de l'associació a detectar. En aquest sentit, aquesta anàlisi proporciona la probabilitat de què associacions d'una determinada magnitud puguin ser detectades amb un tamany mostral determinat. Així, s'ha calculat la magnitud d'una associació (risc relatiu) que pot ser detectada amb una probabilitat superior al 80% i al 90% (taula IV.23). S'ha de remarcar que aquestes estimacions només s'han efectuat sobre els polimorfismes bial·lèlics, ja que en l'actualitat no es disposa de cap programa informàtic que permeti calcular el poder d'una mostra de famílies per marcadors multial·lèlics.

Assegurant que el poder estadístic d'aquesta mostra sigui superior al 80% (el límit que s'utilitza convencionalment en aquest tipus d'estudis), el tamany mostral emprat en aquest estudi permet descartar la presència no detectada de factors de risc genètic amb un RR igual o superior a 2.00 (o ≤ 0.50) associats als polimorfismes analitzats. Per alguns d'aquests marcadors (com NOS2 A300G, NOS3 T-786C, i NOS3 G894T) es poden descartar associacions no detectades que suposin riscos ≥ 1.80 (o ≤ 0.56).

El fet que el llindar habitualment emprat del 80% pugui semblar una mica limitat ha fet que el risc relatiu mínim descartable hagi estat recalculat reduïnt a la meitat l'error de tipus II, del 20 al 10%. Garantint un poder superior al 90%, encara podem descartar efectes substancials no detectats d'aquests polimorfismes. Amb les característiques de la mostra utilitzada (tamany mostral i freqüències dels polimorfismes bial·lèlics a la mostra de pares), la probabilitat de detectar associacions amb $RR \geq 1.95-2.25$ és superior al 90%. El poder analític per riscos relatius de 2.50 esdevé superior al 95% per tots els polimorfismes.

MARCADOR	RR _{>80%}	RR _{>90%}	MARCADOR	RR _{>80%}	RR _{>90%}
NOS1 C3391T	1.80	1.95	NOS3 T-786C	1.80	1.95
NOS2 G-954C	2.00	2.20	NOS3 ecNOS4a/b	2.05	2.25
NOS2 (AAAT) _n	2.00	2.20	NOS3 G894T	1.80	1.95
NOS2 A300G	1.80	1.95	NOS3 A27C	1.85	2.00
NOS2 C150T	1.95	2.10			

Taula IV.23. Riscos relatius (RR) a partir dels quals el poder de la mostra és superior al 80% i al 90%. S'han calculat a partir de les freqüències al·lèliques a la submostra de pares i amb un error de tipus I de 0.05.

ANÀLISI DELS NIVELLS DE NITRATS I NITRITS EN PLASMA

Tal com s'ha comentat a la introducció, diferents estudis previs han descrit relacions entre alguns dels *loci* analitzats i determinats paràmetres en plasma, amb una especial atenció als nivells de nitrats i nitrits (NO_x). Alguns d'aquests estudis detectaven associacions que no eren replicades per d'altres treballs, o inclús s'obtenien resultats contradictoris. A fi de contribuir a establir i aclarir aquestes possibles relacions genotip/paràmetre plasmàtic, s'ha analitzat la possible influència dels polimorfismes analitzats en les NOS i els seus haplotips en la regulació dels nivells de nitrats i nitrits (NO_x).

Per realitzar aquestes anàlisis va dividir-se la mostra en dos subgrups, pares i fills malalts, per tal d'evitar la correlació que molts paràmetres fisiològics mostren dins els membres d'una mateixa família. Les mitjanes dels paràmetres quantitius analitzats es mostren a la taula IV.24.

PARÀMETRE	PARES		FILLS CAI	
	Mitjana ± DE	N	Mitjana ± DE	N
NO _x	28.8 ± 17.7	75	27.3 ± 19.2	62

Taula IV.24. Mitjana, desviació estàndard i tamany mostral de les quantificacions dels nivells de NO_x en les mostres de pares i fills malalts de CAI, expressats en µM.

La normalitat de la distribució del paràmetre analitzat, condició indispensable per poder fer una anàlisi de la variança, va comprovar-se mitjançant la prova de Kolmogorov-Smirnov.

Abans de l'anàlisi, van eliminar-se dels càlculs els individus que seguien algun tractament farmacològic amb nitrats orgànics i es va comprovar que no hi hagués cap individu vegetarià entre els analitzats. Els medicaments que tenen com a principi actiu els nitrats orgànics (com ara, nitroglicerina o nitroprussiat) i una dieta extremadament rica en vegetals poden interferir en els nivells de nitrats i nitrits presents en plasma i va preferir-se eliminar factors potencialment

problemàtics. A més, es va comprovar que cap individu tingués disfuncions renals, que també poden alterar els nivells de NO_x.

Com a primer pas, es va establir la possible influència de diferents variables ambientals que podien influir en els valors mesurats i havien de ser tingudes en compte en el model. Es van testar les variables sexe, edat, *body mass index* (BMI), consum de tabac, exercici físic, consum d'alcohol, diabetes, hipertensió, tipus de dieta, i tipus de tractament farmacològic. Es va determinar quines d'elles influenciaven la variabilitat dels paràmetres analitzats i en quin percentatge ho feien aplicant una regressió lineal múltiple amb introducció "pas a pas" (*step-wise*) de les variables. En la taula IV.25 se'n presenten els resultats.

La variació quantitativa de nitrats i nitrits (NO_x) només ha aparegut significativament influenciada pel fet de ser hipertens, en la submostra de fills malalts. Un individu hipertens presenta, en promig, uns nivells de NO_x 10.76 µM més elevats que un individu no hipertens.

Aquesta variable ha estat introduïda com a factor fixe (variables discretes) en els posteriors models de la mostra de fills i el percentatge de la variabilitat explicat per aquestes variables (5.6%) s'ha tingut en compte per interpretar el percentatge explicat pels models que incloguin dades genètiques i que resultin ser estadísticament significatius.

	PARES			FILLS		
	Variables	R ² corr.	p	Variables	R ² corr.	p
NO _x	-	-	-	Hip	5.6%	0.037

Taula IV.25. Variables ambientals amb efecte significatiu sobre els nivells de NO_x i percentatge de la variabilitat explicada per les mateixes. Hip: hipertensió.

Per tal d'interpretar els resultats que puguin aportar les anàlisis s'han de tenir en compte els conceptes de consistència horitzontal i vertical. La **consistència horitzontal** implica que la detecció d'un efecte genètic significatiu sobre els nivells d'un paràmetre determinat ha d'observar-se en altres mostres, en els mateixos al·lels, encara que no arribi a la significació.

La **consistència vertical**, per la seva part, implica que, perquè un efecte genotípic tingui una explicació fisiològica, cal que existeixi una mínima correspondència entre els diversos genotips que contenen un mateix al·lel. D'aquesta manera, si els individus homozigots per un determinat al·lel presenten uns nivells significativament més elevats d'un paràmetre, els heterozigots portadors de l'al·lel en qüestió també han de tendir a tenir-los més elevats, encara que les diferències no arribin a ser significatives. És l'anomenat efecte de dosi al·lèlica.

Els únics efectes significatius sobre la variació en els nivells de NO_x han estat els exercits per la variació molecular dels polimorfismes analitzats en el gen NOS1. La resta de polimorfismes i gens analitzats no ha mostrat cap relació amb la variació d'aquest paràmetre.

A la taula IV.26 es mostren els resultats significatius de les anàlisis mitjançant Model Lineal General (GLM) realitzades per detectar els possibles efectes de la variació genètica en el gen NOS1 sobre els nivells de NO_x .

La primera qüestió que cal comentar és la interacció observada entre els polimorfismes $(\text{AAT})_n$, C3391T i $3'-(\text{GT})_n$ i la hipertensió sobre els nivells plasmàtics de NO_x , interacció observada només en la submostra de fills. En analitzar l'efecte d'aquests polimorfismes sobre els nivells de NO_x , s'observa que tots ells mostren interaccions significatives amb el fet de ser hipertens i, quan es té en compte aquesta interacció en el model, el genotip d'aquests polimorfismes esdevé significatiu en molts casos. Aquesta interacció significativa no s'ha d'interpretar com un efecte directe del genotip d'aquests polimorfismes sobre la hipertensió, sinó com un efecte significatiu del genotip sobre els nivells de NO_x quan l'individu és hipertens. En la taula IV.26 es mostren els principals resultats de l'anàlisi per GLM entre els nivells de NO_x i la variació al gen NOS1. Per la submostra de fills, les mitjanes i comparacions entre genotips només inclouen els individus hipertensos, ja que són els únics que presenten diferències significatives.

En la mostra de fills, l'efecte del polimorfisme $(\text{AAT})_n$ esdevé significatiu ($p=0.033$) quan es té en compte la interacció amb el fet de ser hipertens ($p=0.003$, per la interacció). Els individus homozigots per al·lells ≤ 11 repeticions presenten nivells més elevats de NO_x . Si es compara els individus hipertensos homozigots $\leq 11/\leq 11$ amb la resta d'hipertensos, els primers mostren nivells de NO_x $36.83 \mu\text{M}$ més elevats en promig ($p=0.009$ pel genotip i $p=0.001$ per la interacció

hipertensió/genotip). El model que inclou els tres genotips explica el 21.3% de la variació total en els nivells plasmàtics de NO_x i el que compara els homozigots ≤11/≤11 amb la resta, el 23.6%.

FILLS	p-m	N-m	R ² cr.	Genotip	N	Mitjana	DE	p	IC 95%
(AAT) _n	0.003	60	0.213	≤11/≤11	3	68.133	27.202	-	-
				≤11/>11	11	32.164	20.197	0.001	-57.029/-14.910
				>11/>11	2	26.600	6.647	0.007	-71.049/-12.018
	<0.001	60	0.236	≤11/≤11	3	68.133	27.202	0.001	16.431/57.220
				>11/**	13	31.308	18.655	-	-
C3391T	0.017	56	0.159	C/C	2	50.150	24.961	0.097	-4.287/50.416
				C/T	6	50.733	31.256	0.016	4.669/42.626
				T/T	7	27.086	12.352	-	-
	0.003	56	0.190	C/**	8	50.588	28.052	0.009	6.195/40.809
				T/T	7	27.086	12.352	-	-
3'(GT) _n	0.003	59	0.176	<20/<20	10	47.890	25.531	0.008	6.610/43.010
				<20/≥20	5	23.080	11.910	-	-
(AAT) _n C3391T	0.003	52	0.204	≤11-C/**	7	53.800	28.666	0.005	8.338/45.090
				/	7	27.086	12.352	-	-
				>11-T/**	10	32.930	20.913	0.014	-46.938/-5.652
	0.006	52	0.180	**/**	4	59.225	28.473	-	-
C3391T 3'(GT) _n	0.005	54	0.180	C-<20/**	8	50.588	28.052	0.010	5.977/41.026
				/	7	27.086	12.352	-	-
PARES	p-m	N-m	R ² cr.	Genotip	N	Mitjana	DE	p	IC 95%
(AAT) _n	0.027	72	0.074	≤11/≤11	22	29.164	18.085	0.229	-19.857/4.837
				≤11/>11	35	21.383	13.091	0.009	-26.670/-3.911
				>11/>11	15	36.673	27.877	-	-
	0.026	72	0.055	≤11/**	57	24.386	15.534	0.026	-23.091/-1.484
				>11/>11	15	36.673	27.877	-	-
(AAT) _n C3391T	0.004	67	0.129	**/**	37	26.386	15.793	0.003	-40.980/-8.980
				>11-T/**	24	23.192	14.068	0.001	-44.769/-11.581
				>11-T/>11-T	6	51.367	39.152	-	-
	0.001	67	0.137	**/**	61	25.130	15.099	0.001	-41.721/-10.753
				>11-T/>11-T	6	51.367	39.152	-	-

Taula IV.26. Resultats de l'anàlisi del model lineal general sobre els nivells plasmàtics de NO_x i la variació polimòrfica al locus NOS1. Per la submostra de fills, les mitjanes i comparacions entre genotips només inclouen els individus hipertensos. p-m: probabilitat del model corregit; N-m: número d'individus en el model; R² cr.: R² corregida del model; DE: desviació estàndard; p: probabilitat per al test t-Student per les diferències; IC 95%: interval de confiança al 95% per les diferències entre mitjanes.

El marcador C3391T mostra també una interacció significativa ($p=0.024$) amb el fet de ser hipertens en la mostra de fills, tot i que el genotip per si sol no assoleix significació ($p=0.342$). Els fills hipertensos amb genotip T/T mostren nivells de NO_x $23.50 \mu\text{M}$ més baixos que la resta d'hipertensos ($p=0.133$ pel genotip i $p=0.006$ per la interacció).

Els individus hipertensos homozigots per al·lels de <20 repeticions del polimorfisme $3'-(\text{GT})_n$ mostren $24.81 \mu\text{M}$ més de mitjana de NO_x que els heterozigots $<20/\geq 20$. La interacció d'aquest polimorfisme amb la hipertensió no assoleix el llindar de significació ($p=0.060$), però en introduir-la al model, el genotip pel marcador $3'-(\text{GT})_n$ esdevé significatiu ($p=0.014$).

L'anàlisi de l'haplotip format pels marcadors $(\text{AAT})_n$ i C3391T revela que els individus hipertensos portadors de la combinació $\leq 11\text{-C}$ presenten nivells de NO_x $26.71 \mu\text{M}$ més elevats, amb un efecte significatiu tant de l'haplotip ($p=0.036$) com de la interacció haplotip-hipertensió ($p=0.007$). Paral·lelament, els individus hipertensos portadors de l'haplotip $>11\text{-T}$ presenten nivells $26.30 \mu\text{M}$ més baixos que la resta, però l'haplotip no resulta significatiu ($p=0.074$).

A més, l'haplotip C3391T- $3'(\text{GT})_n$ també mostra diferències. Els fills hipertensos portadors de la combinació haplotípica C- <20 mostren nivells significativament més elevats de NO_x que els que no en són portadors, tot i que el genotip no resulta significatiu ($p=0.124$).

En contraposició, en la mostra de pares no s'observa cap efecte significatiu de la hipertensió sobre els nivells de nitrats i nitrits, ni cap interacció entre la hipertensió i cap dels polimorfismes del gen NOS1. L'únic polimorfisme que mostra associació amb els nivells de NO_x és el trinucleòtid $(\text{AAT})_n$ ($p=0.027$), on els homozigots $>11/>11$ mostren nivells més elevats de nitrats i nitrits que els altres individus ($12.29 \mu\text{M}$, en agrupar tots els individus que posseeixen un al·lel de ≤ 11 repeticions).

Entre els pares, l'únic haplotip que mostra diferències en la concentració plasmàtica de NO_x és el $>11\text{-T}$ format pels polimorfismes $(\text{AAT})_n$ i C3391T. Els homozigots per aquest haplotip mostren nivells significativament més elevats que els heterozigots o els homozigots per d'altres haplotips ($p=0.004$). Aquestes

diferències són de 26.24 μM quan es comparen els homozigots >11-T/>11-T amb la resta d'individus ($p=0.001$).

DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha realitzat per primera vegada l'estudi sistemàtic de la variació dels gens NOS a nivell poblacional, mitjançant l'anàlisi de 13 polimorfismes en 9 poblacions europees i mediterrànies. Fins a l'actualitat, no es disposava de dades que analitzessin les diferències poblacionals que existien en aquestes regions, exceptuant alguns treballs que només descriuen les freqüències d'alguns dels marcadors aquí analitzats en grans grups poblacionals. Paral·lelament, i en base al paper funcional d'aquests gens, s'ha analitzat la seva potencial implicació epidemiològica com a factors de susceptibilitat genètica per les malalties cardiovasculars mitjançant un estudi d'associació en una mostra de famílies amb un fill afectat per CAI. D'acord amb la literatura disponible, aquesta anàlisi representa, per alguns dels marcadors examinats, les primeres dades sobre el seu possible efecte en el risc cardiovascular.

En general, les freqüències genotípiques observades en les mostres poblacionals i en la mostra de famílies amb un fill afectat per CAI s'ajusten a les assumpcions de l'equilibri Hardy-Weinberg. Només s'han detectat lleugeres desviacions en un nombre petit de comparacions, però degut a l'elevat nombre de tests realitzats i a que les desviacions no mostren cap consistència per polimorfisme ni per mostra analitzada, es pot assumir que són degudes a l'atzar.

Diversitat poblacional

La variació molecular en els gens de les NOS posa de manifest una diversitat interpoblacional significativa a nivell de la Mediterrània Occidental. La variabilitat conjunta a les tres regions genòmiques analitzades ha presentat uns valors significatius de F_{ST} global consistents entre sí, al voltant del 1%: 0.96% a partir de les freqüències al·lèliques ($p < 10^{-26}$) i 1.08% a partir de les haplotípiques ($p < 10^{-15}$). L'anàlisi d'una bateria de 18 polimorfismes autosòmics d'inserció *Alu* a les mateixes mostres revela valors significatius de variació d'una magnitud semblant als estimats en aquest treball: $F_{ST}=2.2\%$; $p < 10^{-5}$ (González-Pérez, comunicació personal). Tot i això, i com cabria esperar, es detecten diferències notables en la variació poblacional tant a nivell de marcador com de sistema haplotípic i *locus*.

Només tres dels tretze polimorfismes analitzats (NOS2 (AAAT)_n, NOS3 T-786C i NOS3 A27C) no han mostrat significació pel test de diferenciació ni pel valor de F_{ST} . Aquests tres polimorfismes no han demostrat, doncs, una utilitat aparent per analitzar relacions inter poblacionals en aquest marc geogràfic. A l'altre extrem, els polimorfismes amb valors significatius més elevats de F_{ST} han estat tres marcadors bial·lèlics: NOS1 C3391T ($F_{ST}=2.75\%$), NOS2 C150T ($F_{ST}=1.83\%$) i NOS3 G894T ($F_{ST}=1.66\%$).

Un aspecte a resaltar és la baixa variabilitat mostrada pel tetranucleòtid (AAAT)_n de la regió promotora del gen NOS2 tant en les poblacions analitzades com en la mostra de famílies, mostrant només dos al·lèls (de 4 i 5 repeticions) amb unes freqüències relativament homogènies. Aquesta baixa variabilitat queda recolzada per la informació bibliogràfica, que també la indica en poblacions europees, africanes i hindús (Bellamy i Hill, 1997). L'escassa variabilitat polimòrfica i l'homogeneïtat en diferents grups poblacionals d'aquest microsatèl·lit suggereixen l'existència de factors de pressió selectiva que restringeixen l'aparició de nova variació.

La variació haplotípica analitzada en les comparacions poblacionals ha revelat que l'únic sistema haplotípic que no ha mostrat variabilitat significativa a nivell de F_{ST} ha estat el format pels polimorfismes T-786C/ecNOS4ab del gen NOS3, que ja no mostraven significació per separat (tot i que ecNOS4ab sí que en mostra pel test de diferenciació).

Finalment, a nivell de *locus*, el gen NOS3 mostra el valor més baix de F_{ST} (0.52%), no mostra significació pel test de diferenciació, ni cap estructuració poblacional jeràrquica. A més, els seus polimorfismes i haplotips presenten, en termes generals, els valors més baixos de F_{ST} .

Estructuració geogràfico-poblacional de la variació genètica

La variació dels loci de les sintases d'òxid nítric ha presentat una estructuració poblacional al Mediterrani. L'estructuració detectada més consistent és la que separa les poblacions analitzades en tres grups: Europa continental, Sardenya i Nord d'Àfrica. Aquesta agrupació queda patent tant en analitzar conjuntament els tres *loci* (a partir de les freqüències al·lèliques i haplotípiques), com per algunes de les regions genòmiques analitzades individualment. L'anàlisi jerarquitzada de la

variança dona suport a aquesta agrupació quan s'analitzen les freqüències al·lèliques dels polimorfismes dels gens NOS1 i NOS2, així com pels 13 polimorfismes conjuntament. A més, les distàncies genètiques de Reynolds expressades mitjançant un dendrograma *neighbor-joining* i una anàlisi de xarxes de Delaunay corroboren aquesta mateixa estructuració (veure figura IV.12).

Pel que fa a les mostres analitzades, Les **poblacions sardes** de l'interior i de la costa es presenten com a diferenciades tal i com evidencia la tipologia del *neighbor-joining*, on la branca que les separa de la resta de poblacions mostra una robustesa superior al 95%. Aquesta diferenciació sembla ser més important amb el Centre d'Europa i el Nord d'Àfrica que amb les poblacions ibèriques o del Sud de França tal com evidencia l'anàlisi de xarxes de Delaunay i l'anàlisi de coordenades principals. Aquesta menor distància genètica de les poblacions sardes amb les del litoral mediterrani de la Península Ibèrica és consistent amb la postulada per Cao et al. (1989), a partir de l'anàlisi de les mutacions associades a la β -talassèmia, i molt recentment per Falchi et al. (2006), a partir de la seqüència de la regió I de control del mtDNA.

D'altra banda, cal destacar que aquestes dos mostres han mostrat una relativa homogeneïtat entre si, tot i tenir orígens geogràfics diferents. Les poblacions costaneres de Sardenya han tingut més contactes amb altres grups humans de la Mediterrània al llarg de la seva història, mentre que un major aïllament geogràfic ha caracteritzat les poblacions de l'interior muntanyós.

A més, aquestes poblacions s'han mostrat com les menys variables entre les analitzades. Les mostres sardes mostren els valors més baixos de variabilitat (a nivell d'heterozigositats i nombre d'al·lèls, per exemple) per molts dels marcadors analitzats. Una possible explicació podria estar relacionada amb l'aparició de processos de deriva gènica en les seves poblacions tal i com ha estat repetidament postulat (Morelli et al., 2000; Francalacci et al., 2003), encara que en el present cas no pot afirmar-se l'existència d'un coll d'ampolla remarcable, perquè no s'aprecien desviacions significatives de la regressió lineal entre les heterozigositats de les poblacions i la distància d'aquestes al centroide (figura IV.13b). En canvi, sí pot observar-se que, molt probablement, la deriva hauria propiciat la peculiaritat genètica d'aquestes poblacions respecte la resta, i també podria explicar el major grau de desequilibri de lligament de les dos mostres sardes (SAR-C i SAR-I). Aquests

desequilibris es troben entre els més alts en molts casos tant pel nombre de parelles de polimorfismes que mostren un desequilibri significatiu com en els valors de Δ' que presenten. En qualsevol cas cal recordar que l'elevat desequilibri de lligament de les poblacions sardes ha estat objecte de discussió. Així, Taillon-Miller et al. (2000) van analitzar una bateria de SNPs del cromosoma X i van trobar valors més elevats d'homozigositat i desequilibri de lligament en una mostra sarda que en d'altres poblacions europees. Per contra, Eaves et al. (2000) no van detectar aquestes diferències per una bateria de STRs del cromosoma 18. Els resultats aquí presentats, encara que amb un nombre molt menor de marcadors, estarien més propers als postulats per Taillon-Miller et al. (2000).

Les mostres berbers del Mig i l'Alt Atlas han presentat també una relativa diferenciació respecte la resta de poblacions. L'arbre *neighbor-joining*, l'AMOVA jeràrquica, el traçat de possibles barreres genètiques i les anàlisis de coordenades principals ho han posat en evidència.

Tal i com s'ha explicat a la introducció, l'existència d'una barrera genètica a l'estret de Gibraltar ha estat un tema controvertit en la literatura especialitzada. Estudis utilitzant el mateix tipus de marcadors extreuen conclusions oposades sobre el tema (Flores et al., 2000 i Esteban et al., 2004, pel *locus* CD4; Comas et al., 2000 i González-Pérez et al., 2003, per una bateria de marcadors *Alu*) i mentre que l'anàlisi de marcadors clàssics dona suport a l'existència d'aquesta barrera (Bosch et al., 1997; Harich et al., 2002), l'anàlisi del mtDNA sembla detectar un *pool* genètic comú a banda i banda de l'Estret (Plaza et al., 2003). L'anàlisi de la variació genètica de les NOS advoca per l'existència d'una discontinuïtat (una regió de canvi genètic) entre les poblacions ibèriques i les poblacions berbers del Marroc, tot i que d'una magnitud relativa.

A més d'aquesta diferenciació de la resta de les poblacions, aquestes dos mostres berbers mostren una certa heterogeneïtat entre elles que es manifesta en la separació que mostren entre sí en el *neighbor-joining*, en diverses anàlisis de coordenades principals, i en la distribució dels al·lels en alguns polimorfismes. Tot i aquesta heterogeneïtat, en cap cas mostren diferències significatives entre elles pel test exacte de diferenciació. Aquestes diferències poden estar reflectint l'efecte de processos aleatoris de canvi a que han estat sotmeses aquestes

poblacions degut a l'aïllament geogràfic i a l'organització social en clans (Camps, 1998).

La comparació de les freqüències al·lèliques obtingudes amb les aportades per la bibliografia evidencien que, per alguns polimorfismes (com els NOS1 (AAT)_n, NOS2 (CCTTT)_n i NOS3 ecNOS4ab), les poblacions berbers mostren un patró de freqüències intermig entre el descrit per poblacions europees i el descrit per poblacions de l'Àfrica subsahariana. Aquest fet recolza diferents estudis que manifesten una influència subsahariana en la configuració genètica de les poblacions berbers del Magrib occidental (Flores et al., 2000; Esteban et al., 2005).

Les mostres de la **Península Ibèrica**, **Sud de França** i **Alemanya** mostren una relativa homogeneïtat entre elles. Tot i aquesta homogeneïtat, les poblacions del Centre de la Península i d'Alemanya es desmarquen d'aquesta uniformitat per determinats marcadors (com el NOS3 G894T), que queda reflectit en algunes de les anàlisis de coordenades principals i, encara que amb baixa robustesa, en el *neighbor-joining*.

Un relatiu aïllament de la mostra C-IBER pot haver propiciat aquestes peculiaritats, especialment en el marc de la Península Ibèrica. Aquestes diferències ja havien estat constatades en un treball anterior, on la població de la Sierra de Gredos havia mostrat diferències amb d'altres poblacions peninsulars per a polimorfismes proteics (Moral et al., 1994).

La mostra d'Alemanya pot estar reflectint diferències en la composició genètica de les poblacions del centre d'Europa respecte a les del sud-oest. Aquesta ha estat també la població que ha mostrat, en termes generals, el menor grau de desequilibri de lligament entre parelles de polimorfismes així com l'única que es desvia significativament per sota de la regressió lineal entre l'heterozigositat i la distància al centroide (figura IV.13b). Tot i que estudis previs basats en el mtDNA també havien mostrat una relativa diferenciació entre les poblacions del nord i del sud d'Europa (Simoni et al., 2000), el baix nombre d'individus alemanys genotipats per alguns dels polimorfismes pot haver produït cert biaix que hagi accentuat aquestes diferències.

Les regions cromosòmiques de les NOS han presentat una variació poblacional equiparable a la d'altres polimorfismes i la diferenciació poblacional explicada és consistent amb la proporcionada per d'altres marcadors. Així, es pot afirmar que la informació proporcionada pels polimorfismes analitzats en els gens NOS1, NOS2 i NOS3 és útil a l'hora d'inferir les relacions poblacionals a la Mediterrània. Un treball anterior ja ja havia evidenciat la mateixa estructuració poblacional detectada en aquest treball a partir de la variació en els gens reguladors de les apolipoproteïnes i de la fibrinolisi (Moral et al., 2003). A més, d'altres treballs han mostrat que variants genètiques relacionades amb la susceptibilitat a malalties cardiovasculars, com en els gens MTHFR, APOE, PON1, ACE, i d'altres, es distribueixen al llarg d'Europa d'una manera similar a la informació poblacional que proporcionen els marcadors clàssics o els marcadors del cromosoma Y (Lao, 2004). Per tant, els nostres resultats semblen confirmar que la variació en gens funcionals proporciona informació adicional que pot ser utilitzada en estudis de genètica de poblacions humanes.

Variació genètica i susceptibilitat cardiovascular

Al present estudi s'ha avaluat la implicació de la variabilitat genètica dels gens NOS com a factors de susceptibilitat cardiovascular per la CAI mitjançant una anàlisi d'associació genètica basat en gens candidats i utilitzant una mostra de famílies nuclears d'individus afectats per aquesta malaltia, obtinguda a l'àrea metropolitana de Barcelona i que pot considerar-se com a representativa del conjunt de la Península Ibèrica. Així mateix, i en un intent d'obtenir nova informació sobre els potencials mecanismes implicats en les associacions genètiques detectades, s'han determinat també els efectes de la variació genètica sobre els nivells de nitrats i nitrits, d'acord amb el paper fisiològic dels gens analitzats.

Les distribucions trobades per les variants al·lèliques i haplotípiques d'aquests polimorfismes en la mostra de famílies s'ajusten a la variació descrita prèviament en les poblacions de la Península Ibèrica examinades.

L'estructuració de la mostra en famílies ha permès la reconstrucció inequívoca de la fase haplotípica dels individus en la majoria dels casos (veure taula IV.19) i, consegüentment, el càlcul del desequilibri de lligament entre parelles de polimorfismes amb el paràmetre D' de Lewontin (Lewontin, 1964). Aquesta anàlisi ha evidenciat un remarcable grau de desequilibri de lligament al llarg de les tres

regions analitzades sense excloure, no obstant, una certa variabilitat. Destaca, per exemple, la parella NOS2 (AAAT)_n/A300G amb un lligament complert ($D'=1.0$) en pares i fills, tot i estar separats unes 20.45 Kb.

També destaca alguna parella de microsatèl·lits, com la dels marcadors NOS1 5'-(GT)_n i 3'-(GT)_n que es troben separats per 147 Kb i mostren un desequilibri de lligament significatiu amb una D' més elevada que la que mostren cadascun d'ells amb l'SNP C3391T, entremig de tots dos (figura IV.15).

En canvi, al gen NOS3 el microsatèl·lit (CA)_n no presenta desequilibri significatiu amb els altres marcadors del mateix gen, tots a menys de 10 Kb de distància.

Locus NOS1

L'anàlisi de la variabilitat al·lèlica ha revelat associacions estadísticament significatives en el gen NOS1. La variació intragènica mostra relació amb la susceptibilitat a patir CAI, així com amb la variació en els nivells de NO_x.

La transmissió al·lèlica de pares a fills ha mostrat desequilibris significatius per al polimorfisme C3391T i alguns sistemes haplotípics dels que forma part. Concretament, l'al·lel T mostra un nombre de transmissions lleugerament superior al que s'esperaria. Aquest excés es concreta quan s'analitza el sistema haplotípic format pels marcadors C3391T/3'-(GT)_n. Els portadors de l'al·lel T i d'al·lells petits del dinucleòtid (entre 13 i 19 repeticions) presenten un risc incrementat per la CAI amb un RR de 2.00, amb una consistència en els resultats del TDT del TRANSMIT, l'anàlisi de les transmissions inequívokes i el test *bootstrap*. A més, el sistema haplotípic globalment també es mostra associat amb la cardiopatia isquèmica.

La substitució C3391T es troba localitzada a l'exó 18, però no produeix cap canvi aminoacídic. A més, el dinucleòtid 3'-(GT)_n es troba a l'exó 29 a la regió no codificant, amb un possible paper regulador de la transcripció, però només s'associa amb la malaltia quan forma haplotip amb l'SNP. Així, el més probable des del punt de vista funcional és que l'associació detectada es pugui explicar per l'efecte d'un altre polimorfisme a la regió codificant, en un estret desequilibri de lligament amb l'haplotip T/ <20 .

La regió gènica on es localitzen aquests dos polimorfismes correspon al domini reductasa de l'enzim NOS1. Aquest domini inclou la zona d'unió del NADPH, que cedeix els electrons per la reacció enzimàtica, i les zones d'unió de les flavines FAD

i FMN, que transporten aquests electrons al domini oxigenasa, on es forma el NO. Donada aquesta funció de la part distal del gen, pot postular-se l'existència d'alguna mutació desconeguda en aquesta zona, i en desequilibri de lligament amb l'haplotip associat a la CAI, que codifiqui per un enzim NOS1 amb una activitat catalítica inferior a l'habitual, potser per haver alterat estructuralment les regions d'unió de qualsevol d'aquests cofactors de la reacció enzimàtica. Amb aquesta alteració, l'enzim seria menys eficient i la producció constitutiva de NO disminuiria, fent que els vasos sanquinis fossin més susceptible a alteracions mecàniques (per un increment del flux) o a processos aterotrombòtics, per manca del paper antiateroscleròtic del NO. En aquest sentit, s'ha observat l'existència d'aminoàcids a l'extrem C-terminal de la proteïna NOS1 de rata, com per exemple la Phe1395 o l'Arg1400, que garanteixen l'activitat catalítica constitutiva de l'enzim en mantenir una estructura terciària adequada per la interacció entre les zones d'unió a NADPH, FAD i FMN (Konas et al., 2004; Tiso et al., 2005).

Els únics estudis previs sobre el paper del NOS1 com a gen candidat per malalties vasculars no han establert cap efecte significatiu de la variació del polimorfisme 3'-(GT)_n ni d'una bateria d'onze polimorfismes per tot el gen en la susceptibilitat a patir hipertensió (Takahashi et al., 1997b; Iwai et al., 2004). Tot i això, el darrer d'aquests estudis va detectar una associació poc consistent entre un polimorfisme de l'intró 21 i hipertensió en dones. Malgrat aquests resultats negatius, d'altres estudis molt recents han suggerit la possibilitat de que el polimorfisme C276T de la regió no codificant de l'exó 29 estigui relacionat amb la susceptibilitat genètica a malalties com l'Alzheimer, determinats fenotips d'asma o el Parkinson, encara que d'altres estudis són incapaços de replicar aquests resultats (Galimberti et al., 2005; Leung et al., 2005; Levecque et al., 2003). Si aquest polimorfisme és el responsable de les associacions detectades, donada la seva proximitat amb el microsatèl·lit 3'-(GT)_n (uns 200 pb) i l'elevat desequilibri de lligament que presenta el gen NOS1 al llarg de tota la seva seqüència, hauria d'esperar-se la presència d'associació d'alguna variant d'aquest STR amb la CAI, en la mostra de famílies analitzada, o amb la hipertensió en l'estudi de Takahashi et al. (1997b), en contrast amb els resultats trobats. Així, sembla més probable que algun altre polimorfisme proper sigui el responsable de l'associació detectada en aquest treball.

L'anàlisi dels paràmetres quantitius ha posat de manifest que el gen NOS1 és l'únic amb una variació molecular que té un efecte significatiu sobre els nivells plasmàtics de nitrats i nitrits (NO_x). En individus en dejú, com és el cas de la

mostra analitzada, aquesta mesura és un vàlid indicador de la producció de NO donat que més del 90% dels nivells circulants de NO_x es deuen a la producció de les NOS (Rhodes et al., 1995).

El trinucleòtid (AAT)_n i l'haplotip que forma amb la substitució C3391T es mostren associats amb la variació en els nivells de NO_x en les mostres de pares i fills malalts. En la mostra de pares, el model que millor explica la variació en els nivells de NO_x és el que compara els homozigots per l'haplotip >11-T (al·lels de més de 11 repeticions del trinucleòtid i al·lel T del SNP) amb la resta d'individus. Aquests homozigots presenten nivells significativament més elevats de NO_x, amb un model que explica el 13.7% de la variabilitat d'aquest paràmetre (IC 95% de la diferència: 10.75-41.72; p=0.001).

En canvi, els resultats en la mostra de fills presenten diferències importants amb els evidenciats en la mostra de pares. Els fills només mostren efectes genotip-
fenotip quan s'inclou en el model l'efecte significatiu de la interacció entre el fet de ser hipertens i el genotip, i les diferències en els nivells de NO_x només s'observen entre els genotips dels individus hipertensos. En aquests individus, els genotips dels polimorfismes (AAT)_n, C3391T i 3'-(GT)_n, així com els sistemes haplotípics (AAT)_n/C3391T i C3391T/3'-(GT)_n, mostren diferències en els nivells de NO_x. El model que explica un percentatge més elevat de la variabilitat en els nivells de NO_x (un 23.6%) és el que compara els homozigots per al·lels de 11 o menys repeticions del microsatèl·lit (AAT)_n amb la resta d'individus, però la tendència mostrada és la inversa que en la mostra de pares, ja que són els fills homozigots ≤11/≤11 els que presenten nivells significativament més elevats de NO_x (IC 95% de la diferència: 16.43/57.22; p=0.001).

En principi, en aquestes diferències és probable que estiguin implicats diferents factors com l'edat i el fet d'haver patit un infart, tal com evidencien alguns estudis en models animals (Damy et al., 2003). No obstant, al nostre cas, la hipertensió apareix com el factor més evident.

La hipertensió no mostra un efecte significatiu en la mostra de pares, mentre que en fills l'efecte del genotip només es detecta en els individus hipertensos. S'ha demostrat que la NOS1 mostra un augment significatiu en la seva expressió quan els vasos estan sotmesos a estímuls de pressió per augment de flux (Papadaki et al., 1998). Aquests estímuls són constants en els individus hipertensos i, per tant, l'augment de l'expressió també seria més important. Aquest augment d'expressió

entre els hipertensos podria explicar que les diferències en l'efecte genètic sobre els nivells de NO_x només puguin ser detectades en els individus que presenten més enzim NOS1. Així, l'efecte de l'al·lel T, del marcador C3391T, en homozigosi disminuint els nivells de NO_x podria estar implicat en l'associació observada entre aquest al·lel i la CAI. L'al·lel T mostra més transmissions de pares a fills de les esperades, fet que l'implica en la susceptibilitat genètica a la CAI, segurament per una menor producció de NO que reguli el to vascular.

En el nostre cas, i dins del marc de les hipòtesis plantejades per explicar les diferències observades entre pares i fills en l'efecte de la variació genètica del NOS1 sobre els nivells de NO_x, no s'ha de descartar el possible efecte del baix nombre d'individus inclosos en els càlculs dels fills. Els models realitzats en els fills inclouen 52-60 individus (segons el genotip o haplotip que analitzen), però les comparacions significatives han estat només les dels fills hipertensos, que constitueixen un nombre baix d'individus (entre 14 i 16). Aquest baix nombre pot haver esbiaixat els resultats, malgrat la significació estadística trobada.

Avaluant el conjunt de les associacions detectades amb la CAI i amb els nivells de NO_x, es pot afirmar que la variació a la regió promotora del gen no sembla exercir cap efecte regulador en la mostra analitzada. En contrast amb els resultats d'aquest treball, estudis recents han mostrat efectes de la variació molecular de la regió 5' del gen amb malalties com la fibrosi quística i l'estenosi pilòrica infantil (Texereau et al., 2004; Saur et al., 2004). Aquestes diferències observades poden ser degudes a que els al·lells de susceptibilitat siguin diferents segons el tipus cel·lular implicat en cada malaltia. El gen NOS1 presenta una regulació molt complexa, amb més de 12 trànscrips diferents (per l'ús de promotors o dianes d'*splicing* alternatius) molts d'ells específics de teixit i d'altres mecanismes de regulació, com la transcripció de RNA *antisense* repressor de l'expressió (Zhang et al., 2004; Korneev i O'Shea, 2002).

En canvi, en les mostres analitzades en aquest treball sembla probable la implicació de variants en regions intragèniques (segurament corresponents al domini reductasa de l'enzim) en la susceptibilitat genètica a la CAI, així com en la mesura directa dels nivells de NO_x, indicadors de l'activitat enzimàtica.

En resum, les dades obtingudes en aquest treball indiquen un efecte significatiu de la variació genètica del NOS1 sobre la malaltia cardiovascular i la producció de NO. L'efecte genotip-fenotip es veu modulats per la hipertensió, especialment en els fills

afectats per CAI. En aquests casos, els genotip amb un efecte més important corresponen a combinacions haplotípiques portadores de l'al·lel T del polimorfisme C3391T. A nivell poblacional, aquest marcador presenta una gran variació a la regió mediterrània, amb els valors més elevats de diversitat interpoblacional ($F_{ST}=2.75\%$). La freqüència de l'al·lel T trobada en la submostra d'afectats per CAI (50.5%) correspon a un dels valors més alts dins del rang de variació detectat (29.7-53.8%).

Locus NOS2

La variació genètica a la regió promotora 5' del gen NOS2 ha presentat associacions significatives amb la CAI, a través de l'anàlisi del TDT. Tal com s'ha destacat a la introducció, aquest gen presenta una regió promotora que s'estén unes 16 Kb, on s'estableix una complexa regulació transcripcional.

L'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid (CCTTT)_n s'ha mostrat associat a la CAI, amb probabilitats inferiors a 0.01 pel TDT i el test *bootstrap* calculats amb el programa TRANSMIT, així com també amb el TDT incloent només la informació de les transmissions inequívokes ($p=0.032$). Aquest al·lel mostra un defecte significatiu en el nombre de transmissions, pel que suposa un paper protector davant el risc de patir CAI amb un RR de 0.273. Aquest resultat es veu replicat per les associacions més febles que mostren els haplotips constituïts pel pentanucleòtid i els altres dos marcadors analitzats a la regió promotora: l'SNP G-954C i el tetranucleòtid (AAAT)_n. Els haplotips formats per l'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid amb els al·lells més freqüents d'aquests dos polimorfismes (els al·lells G i de 4 repeticions, respectivament) presenten associacions amb la malaltia, que impliquen un paper protector per la CAI amb RR de 0.20-0.25.

La manca general d'estudis d'associació previs que analitzin la relació entre malalties cardiovasculars i la variació al gen NOS2 no permeten establir comparacions consistents. L'estudi realitzat per Glenn et al. (1999) sobre l'efecte del pentanucleòtid i el tetranucleòtid en la hipertensió no va detectar cap associació d'aquests marcadors amb la malaltia.

Des d'un punt de vista funcional, els al·lells de menor nombre de repeticions del pentanucleòtid, i especialment el de 9 repeticions, semblen mostrar uns nivells significativament més baixos de transcripció en cultius cel·lulars (Warpeha et al., 1999). Aquesta menor transcripció podria estar relacionada amb l'efecte protector

observat enfront de la CAI, tenint en compte el diferent efecte fisiològic que juguen les concentracions de NO segons quina sigui la isoforma enzimàtica implicada. Les lesions ateroscleròtiques presenten nivells molt elevats de peroxinitrit, juntament amb d'altres radicals oxidants, que exerceixen efectes tòxics (oxidació de lipoproteïnes, desestabilització de membranes cel·lulars, ...). Aquestes concentracions de peroxinitrit es deuen principalment a l'elevada producció de NO per part de la NOS2 estimulada per les citoquines d'aquestes lesions (com a revisió, Wever et al., 1998). En conseqüència, es podria postular que l'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid, en produir menys proteïna NOS2 i menys NO, exerciria un paper protector davant de les malalties cardiovasculars per una menor citotoxicitat en les lesions ateroscleròtiques.

Aquesta menor producció de NO seria conseqüent amb les conclusions dels estudis de Burgner et al. (1998) i González-Gay et al. (2004). Aquests treballs postulen un major risc dels al·lells petits del pentanucleòtid de patir malària i artritis reumatoide en població gambiana i espanyola, respectivament, associant aquest efecte perjudicial a una menor producció de NO. En aquestes malalties, l'efecte de concentracions molt altes de NO (especialment davant la infecció per *Plasmodium*) és considerat com a protector.

Tot i aquest possible paper funcional del pentanucleòtid, en la literatura també es troben resultats contradictoris sobre aquest rol. Així, Levesque et al. (1999) i Hobbs et al. (2002) no detecten associacions entre la variació del pentanucleòtid i la susceptibilitat de patir malària ni tampoc amb els nivells de NO_x o de proteïna NOS2, en diferents mostres africanes.

Aquestes discrepàncies fan que no pugui descartar-se que les associacions detectades siguin exercides per algun altre polimorfisme de la regió promotora en estret desequilibri de lligament amb els al·lells petits del pentanucleòtid. Els al·lells del pentanucleòtid que estarien lligats amb polimorfismes funcionals de la regió promotora podrien variar segons la població analitzada. Aquest fet podria explicar les associacions completament oposades que s'han descrit en població tailandesa entre al·lells de tamany gran i major susceptibilitat de patir malària (Ohashi et al., 2002).

La variació en la regió promotora del gen NOS2 ha estat analitzada repetidament, però la pràctica totalitat d'estudis s'han enfocat a població africana en relació amb la susceptibilitat a malària i la variació que s'hi ha descrit ha resultat inexistent en

d'altres grups humans. Per exemple, s'ha identificat el SNP C-1173T en poblacions de Tanzània i Kènia i se l'hi ha atribuït un paper important en la susceptibilitat a patir malària (Hobbs et al., 2002). En les anàlisis en què s'ha explorat la variació d'aquest polimorfisme en grups humans no africans, s'ha trobat que no presentaven variació. A més, els estudis que han analitzat la variació polimòrfica de la substitució G-954C en poblacions europea, tailandesa i ameríndia havien revelat l'especificitat africana d'aquest marcador (Levesque et al., 1999; Ohashi et al., 2002; Martin et al., 1999). No obstant, la variació presentada per aquest polimorfisme en la mostra de famílies analitzada, així com en població del Sud de la Península Ibèrica i de Còrsega (Dra. A Falchi, comunicació personal) demostra que l'Europa mediterrània, i potser també el Nord d'Àfrica, presenta una major variació polimòrfica que ha de ser examinada i que pot estar relacionada amb diferències en la regulació transcripcional i, per tant, en l'activitat del NOS2. Altres polimorfismes amb un demostrat paper funcional, com el C-1173T o els 11 SNPs descrits per Burgner et al. (2003) en mostres de Gàmbia, potser també mostren variació en aquestes poblacions i podrien estar relacionats amb les baixes incidències de malalties cardiovasculars de la Conca Mediterrània.

L'interès que desperta la variació molecular en la regió promotora es reforça pel fet que el polimorfisme G-954C no mostra desequilibri de lligament ni amb el pentanucleòtid ni amb el tetranucleòtid, tot i la proximitat a què es troben (1627 i 201 pb) i que entre ells sí que n'hi ha ($D'=0.60-0.63$, $p<0.001$). Aquesta manca de desequilibri de lligament és corroborada en la mostra poblacional del Sud de la Península Ibèrica.

El pentanucleòtid del promotor del NOS2 ha presentat una variació interpoblacional considerable a la regió occidental de la Mediterrània ($F_{ST}=1.2\%$, $p<0.00001$). En concret, l'al·lel de 9 repeticions del pentanucleòtid, que s'ha associat amb un menor risc de patir la malaltia en la mostra aquí analitzada, mostra una freqüència que oscil·la entre 0.032 i 0.053 a la Península Ibèrica (i la resta de mostres europees no es desvien gaire d'aquest rang de freqüències), però augmenta significativament en les mostres berbers nord-africanes fins a 0.115-0.142. Aquesta diferència queda més palesa quan es comparen les freqüències dels al·lells de ≤ 9 repeticions: 0.045-0.075 a la Península Ibèrica (0.022-0.080 a Europa) vs. 0.212-0.279 al Nord d'Àfrica. La freqüència de l'al·lel de 9 repeticions en la mostra de fills amb CAI (2.5%) es troba entre les més baixes descrites fins al moment (tant en les poblacions aquí analitzades com en les referenciades en la bibliografia).

La important variació freqüencial trobada en les poblacions humanes, inclús dins de la mateixa àrea mediterrània, i la manca de consistència en els estudis de susceptibilitat, tant en relació amb la malària com amb d'altres malalties, no permeten establir una explicació clara sobre l'associació genètica detectada. En general aquestes dades apunten a la implicació de la regió promotora del gen NOS2 en la susceptibilitat a la malaltia, que en el cas de la nostra mostra estaria lligat als al·lells petits del marcador (CCTTT)_n.

Per altre costat, malgrat l'associació detectada, ni l'al·lel de 9 repeticions ni els haplotips 9/G i 9/4 (amb els marcadors G-954C i (AAAT)_n, respectivament) han mostrat cap efecte destacable sobre els nivells plasmàtics de NO_x.

A la regió intragènica del NOS2, determinada en el nostre cas pels marcadors A300G i C150T, no s'ha detectat cap indicatiu d'associació ni amb la malaltia ni amb els nivells de NO_x, tot i la potencialitat funcional d'aquests SNPs: l'A300G es troba en una regió de regulació de *splicing* alternatiu (Eissa et al., 1996) i el C150T provoca el canvi aminoacídic Ser608Leu a l'exó 16 (Johannesen et al., 2001). Per tant, amb un poder analític de la mostra utilitzada superior al 80%, es pot descartar que aquests polimorfismes estiguin relacionats amb una susceptibilitat diferenciada a patir CAI que impliqui un risc relatiu igual o superior a 1.95 (taula IV.23).

Locus NOS3

La variació molecular analitzada al llarg del gen NOS3 també indica influències significatives amb la CAI. Concretament, el dinucleòtid (CA)_n ha mostrat associacions amb la malaltia mitjançant l'anàlisi del TDT. Els al·lells de ≥ 38 repeticions del motiu (CA) mostren menys transmissions des de pares heterozigots de l'esperat, així com també quan formen haplotip amb l'al·lel b del VNTR ecNOS4a/b. Aquest desequilibri en la transmissió dels al·lells de tamany gran del microsatèl·lit suposaria un efecte protector d'una magnitud considerable enfront de patir cardiopatia isquèmica per als individus que en són portadors (RR=0.17). Tot i aquest valor de RR tan baix, s'ha de tenir en compte que té un interval de confiança bastant ampli (IC 95% 0.00-0.49).

Aquest paper protector detectat podria pensar-se com a relacionat directament amb el propi dinucleòtid. Els polimorfismes de repeticions CA representen al voltant del 0.25% de tot el genoma humà i constitueixen el tipus de dinucleòtid més

comú (Lander et al., 2001). Diversos gens humans com els de l'interferó- γ o el de la fibrosi quística (CFTR) presenten dinucleòtids (CA) $_n$ dins d'introns (Pravica et al., 1999; Mateu et al., 1999).

L'any 1997, Coulter i col·laboradors van descriure que les regions riques en AC representen una classe important d'efectors dels processos d'*splicing*. Aquest efecte regulador ha estat demostrat recentment pel dinucleòtid (CA) $_n$ de l'intró 13 del gen NOS3, on l'eficiència en l'*splicing* està regulada de forma dosi-depenent pel nombre de repeticions del dinucleòtid (Hui et al., 2003b). Tant *in vitro* com *in vivo*, la presència de 38 repeticions en el dinucleòtid implica una major eficiència d'*splicing* que 19 o 32 repeticions. Aquesta millor maduració del mRNA implicaria que els individus portadors d'al·lels de ≥ 38 repeticions tinguessin més quantitat d'enzim NOS3 present i, conseqüentment, una major producció constitutiva de NO. Aquest nivell més elevat de NO produït per la NOS3 podria ser el responsable del paper protector observat, per una millor regulació del to vascular.

Tot i això, aquest paper protector observat pels al·lels de ≥ 38 repeticions és l'oposat al que s'havia descrit fins al moment. Stangl et al. (2000) van descriure que el risc de CAD en població alemanya estava incrementat en els individus portadors d'al·lels de ≥ 38 repeticions, amb una *odds ratio* de 1.94 ($p=0.001$). Posteriorment, els mateixos investigadors van descriure en la mateixa mostra que els al·lels de ≥ 36 repeticions, i especialment de ≥ 38 repeticions, s'associen amb un major risc de patir síndrome coronària aguda entre les dones afectades per CAD amb hiperhomocisteïnèmia (Laule et al., 2003). Aquests autors hipotetitzen que la major eficàcia en l'*splicing* dels al·lels de ≥ 38 repeticions suposaria un increment en l'expressió i l'activitat de la NOS3 que provocaria un augment en la formació d'espècies reactives d'òxid de nitrogen (RNOS), amb un paper proaterogènic.

En els estudis *in vivo*, els al·lels de 38 repeticions mostren una eficàcia d'*splicing* d'entre 1.5 i 2.7 vegades més elevada que els al·lels amb menys repeticions (Hui et al., 2003b). No és gaire plausible que aquest increment d'expressió i activitat de la NOS3 expliqui la diferència entre els efectes directes i indirectes del NO. Els efectes directes, com l'activació de la guanilat ciclasa o la inactivació de radicals lliures, es produeixen a concentracions nanomolars de NO com les que produeixen les isoformes clàssicament considerades com d'expressió constitutiva (NOS1 i NOS3), mentre que els efectes indirectes (derivats de la formació de RNOS) es produeixen

a concentracions diversos ordres de magnitud superiors (Weyrich et al., 1994; Joshi et al., 1999).

Malgrat tot, tant els nostres resultats com els d'aquests autors queden limitats pel mateix problema. Els al·lels de ≥ 38 repeticions presenten una freqüència de 0.066 en la mostra de pares i de 0.042 en la mostra de controls alemanys que utilitzen Stangl et al. (2000), i condicionen que els resultats hagin de ser presos amb precaució. A més, cap dels dos treballs detecta relació entre la variació del dinucleòtid i la variació plasmàtica de paràmetres fisiològics (NO_x en el nostre treball, i colesterol total, HDL-C, LDL-C i triglicèrids), fent més difícil establir una associació clara entre el microsatèl·lit i els processos ateroscleròtics.

Fins a l'actualitat, existia un únic estudi en població espanyola que analitzés la relació entre la CAI i la variació molecular al gen NOS3. Aquest treball havia descrit que els homozigots C/C per al polimorfisme T-786C del promotor presentaven un risc incrementat de patir CAD en un estudi cas-control en població asturiana (Álvarez et al., 2001). En contraposició, el present estudi no confirma aquests resultats i, més aviat, els contradueix. Aquests investigadors troben diferències ($p=0.039$; $\text{OR}=1.67$) entre les freqüències al·lèliques de pacients i controls, però s'ha de destacar que la freqüència significativament més elevada de l'al·lel C detectada en la mostra de malalts (0.456) és molt similar a la descrita per nosaltres en població d'Astúries (0.464), centre (0.442) i sud (0.467) de la Península Ibèrica així com per d'altres autors en població francesa i irlandesa (0.439 i 0.426, respectivament; Poirier et al., 1999). Aquestes dades poblacionals suggereixen que un possible biaix en la selecció dels controls asturians del treball d'Álvarez et al. (2001) no pugui ser descartat.

Entre els estudis realitzats sobre la variació al gen NOS3 i la CAI, destaca la meta-anàlisi realitzada per Casas et al. (2004) sobre la variació dels polimorfismes T-786C, ecNOS4a/b i G894T. Aquest treball havia descrit que els al·lels *a* i T, dels marcadors ecNOS4a/b i G894T, incrementen significativament el risc de patir CAI ($\text{OR}=1.34$ i $\text{OR}=1.31$, respectivament). Tot i que els autors detecten importants diferències poblacionals en la distribució de freqüències al·lèliques en analitzar més de 23000 individus de diferents grups poblacionals (principalment asiàtics i caucàsics), resulta sorprenent que no detectin heterogeneïtat entre els estudis deguda a l'origen ètnic ($p=0.52$). A més, tampoc detecten cap efecte de l'edat, del

sexe o per tabaquisme amb les dades dels estudis dels que disposen de la informació.

Els resultats de les nostres anàlisis no evidencien cap de les associacions d'aquesta meta-anàlisi (exceptuant la possible implicació de l'ecNOS4a/b en l'haplotip que forma amb el dinucleòtid) i venen a engrossir la bibliografia d'associacions no replicades que ja evidenciaven Wang i Wang (2000) en un article de revisió sobre la variació genètica del gen NOS3 i les malalties vasculars. Aquestes associacions inconsistentes entre gens candidats i diferents fenotips patològics és un fenomen habitual en la literatura que pot observar-se inclús en malalties que segueixen models genètics mendelians simples. Malalties com la de Gaucher, Charcot-Marie-Tooth, Creutzfeld-Jakob familiar, la fenilcetonúria, etc. tenen identificades les diferents variants al·lèliques que les provoquen i l'explicació a nivell molecular de la funcionalitat anormal o nul·la causant. Tot i això, factors ambientals, interaccions entre gens i altres factors desconeguts fan que el fenotip patològic variï considerablement inclús entre els individus afectats d'una mateixa família (Dipple i McCabe, 2000). En el cas de malalties com la CAI, aquestes relacions i regulacions són encara més complexes. L'expressió i l'activitat de la NOS3 són modificades per una gran quantitat de factors ambientals com el fum del tabac, la hipercolesterolèmia, la diabetes o la hipertensió (com a revisió, Wever et al., 1998), que fan que aquesta relació genotip-fenotip sigui més difícil d'establir acuradament.

El solapament de l'efecte genètic del NOS3 amb la d'altres factors de risc ambiental ja havia estat descrita per Ichihara et al. (1998) en població japonesa. Aquests autors van detectar una associació del polimorfisme ecNOS4ab i el risc de patir infart de miocardi que quedava especialment evident en aquells individus que no presentaven altres factors de risc per la malaltia, com diabetes, tabaquisme o obesitat. Altres associacions descrites entre la variació genètica a les NOS i malalties com la CAI o la hipertensió s'han vist influenciades per factors ambientals com el tabaquisme (Wang et al., 1996; Glenn et al., 1999). Com a exemple, en un estudi colateral realitzat en el marc d'aquesta tesi (Via et al., 2003b) es va detectar un efecte de l'haplotip b-G del sistema format pels marcadors ecNOS4ab i G894T en el increment d'HDL-colesterol, consistent amb d'altres estudis (Benjafeld i Morris, 2000).

D'altra banda, les anàlisis d'altres estudis que havien establert associacions entre els nivells de NO_x i diferents polimorfismes del gen NOS3 com l'ecNOS4a/b i el G894T no han estat replicades en aquest treball (Wang et al., 1997; Yoon et al., 2000).

Des del punt de vista poblacional, les freqüències trobades pels al·lels de ≥ 38 repeticions del polimorfisme (CA)_n són relativament baixes en totes les mostres analitzades (<7%) i no proporcionen informació adicional rellevant per la interpretació de l'associació genètica detectada.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- L'exploració de la variació molecular als gens de les sintases d'òxid nítric (NOS1, NOS2 i NOS3) realitzat a través de l'anàlisi poblacional i epidemiològica de 13 marcadors polimòrfics ha evidenciat una elevada variabilitat d'aquestes regions genòmiques amb la identificació d'un total de 94 variants al·lèliques diferents.
- La variació analitzada en cadascuna de les tres regions analitzades ha presentat un elevat grau de desequilibri de lligament, sense excloure un cert grau de diferenciació tant a nivell poblacional com a nivell de parella de marcadors.
- La distribució poblacional de les freqüències al·lèliques i haplotípiques ha permès la caracterització de les poblacions examinades de la Conca Mediterrània i del Centre d'Europa, proporcionant nova informació adicional per a completar la definició genètica de les poblacions humanes.
- Les regions genòmiques han evidenciat un important grau de variació interpoblacional, d'una magnitud equivalent al que presenten d'altres polimorfismes en regions no codificants habitualment utilitzats en estudis de genètica de poblacions humanes. Aquesta important variació interpoblacional suggereix la utilitat dels marcadors en regions funcionals per als estudis de genètica de poblacions humanes.
- S'han detectat diferències notables en el grau de variació interpoblacional entre els tres *loci* analitzats, sent els polimorfismes del gen NOS3 els que presenten menor diversitat entre poblacions malgrat que alguns d'ells mostren el major grau de variació intrapoblacional. En conseqüència, els polimorfismes analitzats en el NOS3 semblen menys adequats per detectar relacions interpoblacionals.
- La variació identificada als gens NOS1 i NOS2, i en menor grau al NOS3, presenta una estructuració poblacional significativa consistent en l'agrupació de les poblacions analitzades en tres grups: Europa continental, Sardenya i Nord d'Àfrica.
- Les poblacions sardes es revelen com les més diferenciades, amb una gran homogeneïtat genètica entre elles i baixa variabilitat intrapoblacional. Aquestes característiques concorden amb les descrites en altres estudis que utilitzen d'altres marcadors.

- En el Nord d'Àfrica, les poblacions berbers mostren una relativa diferenciació de la resta, però amb una elevada diversitat intrapoblacional i una notable heterogeneïtat entre elles, possiblement relacionada amb fenòmens d'aïllament, organització en clans i possibles influències de poblacions subsaharianes.
- Per les poblacions de l'Europa continental, els marcadors analitzats evidencien una marcada homogeneïtat, tot i que en alguns casos les poblacions d'Alemanya i el Centre de la Península Ibèrica es desmarquen de la resta. Amb tot, i malgrat les diferències en les incidències de malalties cardiovasculars i de malària en el passat entre el Centre d'Europa i la Conca mediterrània, la variació en els gens NOS no permet detectar cap variació important entre Alemanya i els grups de la Península Ibèrica i Sud de França.
- La variació en les tres sintases d'òxid nítric ha mostrat associacions significatives amb la cardiopatia isquèmica en la mostra de famílies de Barcelona, que en alguns casos també es presenta associada a la variació en les concentracions plasmàtiques de nitrats i nitrits.
- L'al·lel T del polimorfisme C3391T del gen NOS1, tant individualment com en combinacions haplotípiques, apareix associat significativament a la CAI amb un risc relatiu de 1.8-2.0. L'anàlisi de la influència genètica sobre els nivells de NO_x suggereix que el possible mecanisme d'aquesta associació podria estar relacionat amb una reducció dels nivells de producció de NO relacionada amb aquest al·lel. No obstant, la manca de funcionalitat d'aquest polimorfisme fa suposar que l'efecte directe sobre el risc de CAI sigui degut a una altra variant funcional polimòrfica (possiblement a la regió codificant pel domini reductasa de l'enzim) lligada en *cis* amb l'al·lel T. Aquesta associació aquí descrita constitueix la primera implicació del gen NOS1 en la susceptibilitat a la malaltia cardiovascular.
- L'al·lel de 9 repeticions del STR (CCTTT)_n del gen NOS2 ha presentat associació significativa amb la malaltia, exercint un paper protector amb un risc relatiu de 0.27. Tot i així, la baixa freqüència d'aquest al·lel i la manca de correlació amb els nivells de NO_x no permeten establir la consistència d'aquesta associació. Amb tot, aquesta associació i les diferències poblacionals i epidemiològiques descrites per aquest polimorfisme suggereixen que un estudi exhaustiu de la

regió promotora del gen NOS2 podria ser molt prometedora per l'aclariment de la implicació d'aquest gen en la malaltia cardiovascular.

- Al gen NOS3, els al·lels grans (≥ 38 repeticions) del dinucleòtid (CA)_n de l'intró 13 es mostren significativament associats a un menor risc (RR=0.17) per la CAI en la mostra de Barcelona. Estudis *in vivo* i *in vitro* indiquen que el possible mecanisme d'aquesta associació estaria relacionat amb una major eficiència en els processos d'*splicing* i una conseqüent major producció constitutiva de NO. El paper protector detectat per aquests al·lels constitueix una sorprenent novetat respecte als estudis existents fins al moment, que indicaven precisament un paper contrari. Nous estudis serien necessaris per tal d'explicar la contradicció detectada en aquest estudi.

LLISTAT D'ABREVIATURES

AMOVA: anàlisi de la variança molecular (de l'anglès *Analysis of MOlecular VAriance*)

BMI: índex de massa corporal (de l'anglès *Body Mass Index*)

CAD: malaltia arterial coronària (de l'anglès *Coronary Artery Disease*)

CAI: cardiopatia isquèmica

GLM: model lineal general (de l'anglès *General Linear Model*)

HDL: lipoproteïna d'alta densitat (de l'anglès *High Density Lipoprotein*)

IC 95%: interval de confiança del 95%

IHD: cardiopatia isquèmica (de l'anglès *Ischaemic Heart Disease*)

LDL: lipoproteïna de baixa densitat (de l'anglès *Low Density Lipoprotein*)

mtDNA: DNA mitocondrial

NO_x: nivells de nitrats i nitrits en sèrum

PCA: anàlisi de coordenades principals (de l'anglès *Principal Coordinates Analysis*)

PCR: reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*)

RNOS: espècies reactives d'òxid de nitrogen (de l'anglès *Reactive Nitrogen Oxide Species*)

RR: risc relatiu

SNP: polimorfisme d'un nucleòtid (de l'anglès *Single-Nucleotide Polymorphism*)

SSRE: element responsiu d'estrès per fregament (de l'anglès *Shear-Stress Responsive Element*)

STR: repetició curta en tàndem (de l'anglès *Short Tandem Repeat*)

TAG: triacilglicerol (triglicèrid).

VNTR: nombre variable de repeticions en tàndem (de l'anglès *Variable Number of Tandem Repeats*).

LLISTAT DE FIGURES

Figura I.1. Freqüència de l'al·lel de persistència a la lactasa (LCT*P) en diferents poblacions (marcat en gris fosc).

Figura I.2. Cent dos pacients islandesos afectats per asma veuen com la seva genealogia conflueix en una parella fundadora nascuda a mitjans del segle XVII.

Figura I.3. Extensió de l'Imperi Romà. En color clar es mostra l'extensió màxima de l'imperi (corresponent al període 98-117 d.C.).

Figura I.4. Anàlisi de barreres genètiques al Mediterrani Occidental a partir de la determinació d'una sèrie de polimorfismes Alu.

Figura I.5. Classificació de les malalties d'origen ateroscleròtic.

Figura I.6. Evolució d'una placa d'aterosclerosi.

Fig. I.7. Efecte del NO en proteïnes amb dits de zinc.

Figura I.8. Model d'activació de la guanilat ciclase pel NO.

Figura I.9. Dominis estructurals de les tres NOS humanes.

Figura I.10. Reacció de formació d'òxid nítric.

Figura I.11. Model de la biosíntesi de NO.

Figura I.12. a) Estructura del gen NOS1. b) Estructura total de la proteïna NOS1.

Figura I.13. Localització dels quatre polimorfismes analitzats en el gen NOS1.

Figura I.14. Estructura del gen NOS2.

Figura I.15. Localització dels cinc polimorfismes analitzats en el gen NOS2.

Figura I.16. Estructura del gen NOS3.

Figura I.17. Localització dels cinc polimorfismes analitzats en el gen NOS3.

Figura III.1. Localització geogràfica de les mostres poblacionals analitzades.

Figura III.2. Fotografia d'una electroforesi per determinar el polimorfisme eNOS4a/b del gen NOS3.

Figura III.3. Fotografia d'electroforesi per determinar els polimorfismes NOS1 C3391T i NOS3 G894T.

Figura III.4. Electroforograma resultant de l'electroforesi en capil·lar per l'anàlisi dels microsatèl·lits NOS3 (CA)_n, NOS1 5'-(GT)_n i NOS2 (CCTTT)_n.

Figura III.5. Resultats possibles segons la coincidència entre sondes i al·lels en un assaig de Real Time PCR per genotipar SNPs.

Figura III.6. Resultats de la lectura i anàlisi d'un SNP amb el programa SDS 2.0.

Figura IV.1. Distribució de les freqüències al·lèliques dels microsatèl·lits del gen NOS1 a les poblacions estudiades.

Figura IV.2. Coordenades principals de les distàncies genètiques per als polimorfismes del gen NOS1.

Figura IV.3. Representació del desequilibri de lligament detectat entre marcadors del gen NOS1 en les diferents poblacions analitzades.

Figura IV.4. Anàlisi de coordenades principals a partir de la informació del sistema haplotípic (AAT)_n/C3391T.

Figura IV.5. Distribució de les freqüències al·lèliques del polimorfisme (CCTTT)_n del gen NOS2 a les poblacions estudiades.

Figura IV.6. Coordenades principals de les distàncies genètiques per als polimorfismes del gen NOS2.

Figura IV.7. Representació del desequilibri de lligament detectat entre marcadors del gen NOS2 en les diferents poblacions analitzades.

Figura IV.8. Anàlisi de coordenades principals a partir de la informació dels sistemes haplotípics (CCTTT)_n/(AAT)_n i A300G/C150T.

Figura IV.9. Coordenades principals de les distàncies genètiques per als polimorfismes del gen NOS3.

Figura IV.10. Representació del desequilibri de lligament detectat entre marcadors del gen NOS3 en les diferents poblacions analitzades.

Figura IV.11. Anàlisi de coordenades principals a partir de la informació dels sistemes haplotípics T-786C/ecNOS4ab i G894T/A27C.

Figura IV.12. Representacions de la matriu de distàncies genètiques de Reynolds pel conjunt de polimorfismes analitzats.

Figura IV.13. Anàlisis realitzades a partir de la informació dels dels sistemes haplotípics dels gens NOS1 (sistema (AAT)_n/C3391T), NOS2 (sistemes (CCTTT)_n/(AAAT)_n i A300G/C150T) i NOS3 (sistemes T-786C/ecNOS4ab i G894T/A27C).

Figura IV.14. Gràfics de freqüències al·lèliques dels polimorfismes multial·lèlics analitzats en la mostra de famílies.

Figura IV.15. D' de desequilibri de lligament entre parelles de marcadors dels tres loci analitzats en les mostres de pares i fills malalts.

LLISTAT DE TAULES

Taula I.1. Principals causes de mortalitat als EUA els anys 1900 i 1990.

Taula I.2. Taxes brutes de mortalitat per malaltia coronària a diferents països l'any 2002.

Taula I.3. Característiques principals de les tres isoformes de NOS humanes.

Taula I.4. Estudis realitzats en els polimorfismes del gen NOS1 analitzats en aquest treball de tesi.

Taula I.5. Estudis realitzats en els polimorfismes del gen NOS2 analitzats en aquest treball de tesi.

Taula I.6. Estudis realitzats en els polimorfismes del gen NOS3 analitzats en aquest treball de tesi.

Taula III.1. Composició de les famílies que formen part de la mostra de CAI.

Taula III.2. Distribució per sexes i rangs d'edat del total d'individus que integren les famílies que han participat a l'estudi.

Taula III.3. Resum de les dades sobre els antecedents personals i familiars dels 101 malalts de CAI.

Taula III.4. Condicions d'amplificació per PCR de tots els marcadors analitzats.

Taula III.5. Condicions d'amplificació dels RFLPs analitzats i els al·lels possibles amb els tamanyos de les bandes observables.

Taula III.6. Descripció de la seqüència i marcatge de les sondes TaqMan-MGB emprades en cada anàlisi.

Taula IV.1. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS1 analitzats en les diferents poblacions.

Taula IV.2. Diferenciació entre parells de poblacions per als marcadors del gen NOS1.

Taula IV.3. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS1 recollides de la bibliografia.

Taula IV.4. Valors de Δ' , probabilitats de desequilibri de lligament i nombre d'individus per les parelles de marcadors del gen NOS1.

Taula IV.5. Freqüències haplotípiques de les parelles de polimorfismes (AAT)_n/C3391T i C3391T/3'(GT)_n.

Taula IV.6. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS2 analitzats en les diferents poblacions.

Taula IV.7. Diferenciació entre parells de poblacions per als marcadors del gen NOS2.

Taula IV.8. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS2 recollides de la bibliografia.

Taula IV.9. Valors de Δ' i probabilitats de desequilibri de lligament per les parelles de marcadors del gen NOS2.

Taula IV.10. Freqüències haplotípiques de les parelles de polimorfismes (CCTTT)_n/(AAT)_n i A300G/C150T.

Taula IV.11. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS3 analitzats en les diferents poblacions.

Taula IV.12. Diferenciació entre parells de poblacions per als marcadors del gen NOS3.

Taula IV.13. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen NOS3 recollides de la bibliografia.

Taula IV.14. Valors de Δ' i probabilitats de desequilibri de lligament per les parelles de marcadors del gen NOS3.

Taula IV.15. Freqüències haplotípiques de les parelles de polimorfismes T-786C/ecNOS4ab i G894T/A27C.

Taula IV.16. Valors d'heterozigositat i nombre mitjà d'al·lels per locus pel conjunt de polimorfismes analitzats.

Taula IV.17. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes bial·lèlics analitzats en la mostra de famílies amb fills afectats per la CAI.

Taula IV.18. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes multial·lèlics analitzats en la mostra de famílies amb fills afectats per la CAI.

Taula IV.19. Nombre d'individus en que s'ha pogut reconstruir inequívocament el seu haplotip i proporció respecte el total d'individus.

Taula IV.20. Resultats destacats del TDT pels polimorfismes i haplotips del NOS1, calculats amb el programa TRANSMIT.

Taula IV.21. Resultats destacats del TDT pels polimorfismes i haplotips del NOS2, calculats amb el programa TRANSMIT.

Taula IV.22. Resultats destacats del TDT pels polimorfismes i haplotips del NOS3, calculats amb el programa TRANSMIT.

Taula IV.23. Riscos relatius (RR) a partir dels quals el poder de la mostra és superior al 80% i al 90%.

Taula IV.24. Mitjana, desviació estàndard i tamany mostral de les quantificacions dels nivells de NO_x en les mostres de pares i fills malalts de CAI, expressats en μM

Taula IV.25. Variables ambientals amb efecte significatiu sobre els nivells de NO_x i percentatge de la variabilitat explicada per les mateixes.

Taula IV.26. Resultats de l'anàlisi del model lineal general sobre els nivells plasmàtics de NO_x i la variació polimòrfica al locus NOS1.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Akar N, Akar E, Cin S, Deda G, Avcu F, Yağcı A (1999) Endothelial nitric oxide synthase intron 4, 27 bp repeats polymorphism in Turkish patients with deep vein thrombosis and cerebrovascular accidents. *Thrombosis Research* 94:63-64.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357:593-615.
- Alonso J, Sánchez de Miguel L, Montón M, Casado S, López-Farré A (1997) Endothelial cytosolic proteins bind to 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Molecular and Cellular Biology* 17 (10):5719-5726.
- Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E (2001) Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5 (4):343-348.
- Angius A, Melis PM, Morelli L, Petretto E, Casu G, Maestrale GB, Fraumene C, Bebbere D, Forabosco P, Pirastu M (2001) Archival, demographic and genetic studies define a Sardinian sub-isolate as a suitable model for mapping complex traits. *Human Genetics* 109:198-209.
- Arnaiz-Villena A, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J (2002) Population genetic relationships between Mediterranean populations determined by HLA allele distribution and a historic perspective. *Tissue Antigens* 60 (2):111-121.
- Baader SL & Schilling K (1996) Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *Journal of Neurosciences* 16: 1440-1449.
- Balligand JL & Cannon PJ (1997) Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 17:1846-1858.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bellamy R & Hill AV (1997) A bi-allelic tetranucleotide repeat in the promoter of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Clinical Genetics* 52:192-193.
- Benjafield AV & Morris BJ (2000) Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 13:994-998.
- Black WC & Krafus ES (1985) A FORTRAN program for the calculation and analysis of two-locus linkage disequilibrium coefficients. *Theoretical and Applied Genetics* 70:491-496.
- Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F (1995) Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 91:96-102.
- Bosch E, Calafell F, Perez-Lezaun A, Comas D, Mateu E, Bertranpetit J (1997) Population history of North Africa: Evidence from classical genetic markers. *Human Biology* 69 (3):295-311.
- Bosch E, Calafell F, Perez-Lezaun A, Clarimon J, Comas D, Mateu E, Martinez-Arias R, Morera B, Brakez Z, Akhayat O, Sefiani A, Hariti G, Cambon-Thomsen A, Bertranpetit J (2000) Genetic structure of north-west Africa revealed by STR analysis. *European Journal of Human Genetics* 8 (5):360-366.
- Brassel KE & Reif D (1979) A procedure to generate Thiessen polygons. *Geogr Anal* 11:289-303.
- Burgner D, Xu W, Rockett KA, Gravenor M, Charles IG, Hill AV, Kwiatkowski D (1998) Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet* 352:1193-1194.
- Burgner D, Rockett KA, Kwiatkowski D (1999) Nitric oxide and infectious diseases. *Archives of Disease in Childhood* 81:185-188.
- Burgner D, Usen S, Rockett K, Jallow M, Ackerman H, Cervino A, Pinder M, Kwiatkowski DP (2003) Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Human Genetics* 112 (4):379-386.
- Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SM, Mallet C, Ricard S, Behague I, Hallet V, Blanc H, Loukaci V, Thillet J, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L (1999) Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *American Journal of Human Genetics* 65(1):183-191.
- Camps G (1998) Los Bereberes: de la orilla del Mediterráneo al límite meridional del Sáhara. CIDOB-Icaria, Barcelona.
- Cao A, Gossens M, Pirastu M (1989) Beta-Thalassemia Mutations in Mediterranean Populations. *British Journal of Haematology* 71 (3):309-312.

- Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD (2004) Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 109 (11):1359-1365.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1994) The history and geography of human genes. Princeton University Press, New Jersey.
- CEIPC - Comité Español Interdisciplinario para la Prevención Cardiovascular (2004) Guía europea para la prevención de las enfermedades cardiovasculares en la práctica clínica. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS (1994) Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Journal Biological Chemistry* 269 (9):6765-6772.
- Chen WM & Deng HW (2001) A general and accurate approach for computing the statistical power of the transmission disequilibrium test for complex disease genes. *Genetic Epidemiology* 21:53-67.
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS (2002) Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *PNAS* 99 (12):8306-8311.
- Chung E, Curtis D, Chen G, Marsden PA, Twells R, Xu W, Gardiner M (1996) Genetic evidence for the neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) as a susceptibility locus for infantile pyloric stenosis. *American Journal of Human Genetics* 58:363-370.
- Clayton D & Jones H (1999) Transmission/disequilibrium tests for extended marker haplotypes. *American Journal of Human Genetics* 65:1161-1169.
- Clayton D (1999) A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. *American Journal of Human Genetics* 65:1170-1177.
- Comas D, Calafell F, Benchemsi N, Helal A, Lefranc G, Stoneking M, Batzer MA, Bertranpetit J, Sajantila A (2000) Alu insertion polymorphisms in NW Africa and the Iberian Peninsula: evidence for a strong genetic boundary through the Gibraltar Straits. *Human Genetics* 107:312-319.
- Cooke, JP (1996) Role of nitric oxide in progression and regression of atherosclerosis. *Western Journal of Medicine* 164, 419-424.
- Coulter LR, Landree MA, Cooper TA (1997) Identification of a new class of exonic splicing enhancers by *in vivo* selection. *Molecular and Cellular Biology* 17: 2143-2150.
- Crane BR, Rosenfeld RJ, Arvai AS, Ghosh DK, Ghosh S, Tainer JA, Stuehr DJ, Getzoff ED (1999) N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *EMBO Journal* 18: 6271-6281.
- Damy T, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Oliviero P, Boczkowski J, Ebrahimian T, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2003) Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB Journal* 17(13): 1934-1936.
- DeVera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Billiar TR, Geller DA (1996) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: Initial analysis of the human NOS2 promoter. *PNAS* 93:1054-1059.
- Dipple KM & McCabe ER (2000) Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: Thresholds, modifiers, and systems dynamics. *American Journal of Human Genetics* 66:1729-1735.
- Dobrusin M, Corbex M, Kremer I, Murad I, Muhaheed M, Bannoura I, Müller DJ, Schulze TG, Reshef A, Blanaru M, Gathas S, Rietschel M, Belmaker RH, Maier W, Ebstein RP (2001) No evidence for linkage by transmission disequilibrium test analysis of microsatellite marker D22S278 and schizophrenia in a Palestinian Arab and in a German population. *American Journal of Medical Genetics* 105:328-331.
- Eaves IA, Merriman TR, Barber RA, et al. (1998) Comparison of linkage disequilibrium in populations from the UK and Finland. *American Journal of Human Genetics* 63(suppl.): A1212.
- Eaves IA, Merriman TR, Barber RA, Nutland S, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Cucca F, Todd JA (2000) The genetically isolated populations of Finland and Sardinia may not be a panacea for linkage disequilibrium of common disease genes. *Nature Genetics* 25:320-323.
- Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J (1996) Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 43:27184-27187.
- Esteban E, González-Pérez E, Harich N, Lopez-Alomar A, Via M, Luna F, Moral P (2004) Genetic relationships among Berbers and South Spaniards based on CD4 microsatellite/Alu haplotypes. *Annals of Human Biology* 31 (2):202-212.
- Esteban E, Via M, González-Pérez E, Santamaría J, Dugoujon JM, Vona G, Harich N, Luna F, Saetta AA, Bissar N, Moral P. (2005) An unexpected wide population variation of the G1733A polymorphism of the

- androgen receptor gene: data on the Mediterranean region. *American Journal of Human Biology* 17: 690-695.
- Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC (2001) Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 276(28):26674-26679.
- Falchi A (2004) *Aspects épidémiogénétiques et anthropobiologiques des maladies cardiovasculaires dans les populations méditerranéennes*. Tesi doctoral. Università di Cagliari - Université de Corse (Itàlia-França).
- Falchi A, Giovannoni L, Calo CM, Piras IS, Moral P, Paoli G, Vona G, Varesi L (2006) Genetic history of some western Mediterranean human isolates through mtDNA HVR1 polymorphisms. *Journal of Human Genetics* 51(1): 9-14.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP: Phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Flores C, Maca-Meyer N, Gonzalez AM, Cabrera VM (2000) Northwest African distribution of the CD4/Alu microsatellite haplotypes. *Annals of Human Genetics* 64:321-327.
- Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB Journal* 12:773-790.
- Francalacci P, Morelli L, Underhill PA, Lillie AS, Passarino G, Useli A, Madeddu R, Paoli G, Tofanelli S, Calo CM, Ghiani ME, Varesi L, Memmi M, Vona G, Lin AA, Oefner P, Cavalli-Sforza LL (2003) Peopling of three Mediterranean islands (Corsica, Sardinia, and Sicily) inferred by Y-chromosome biallelic variability. *American Journal of Physical Anthropology* 121 (3):270-279.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18 (6):499-502.
- Fuster V, Ross R, Topol EJ (1997) *Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria*. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona.
- Galimberti D, Venturelli E, Gatti A, Lovati C, Fenoglio C, Mariani C, Forloni G, Bresolin N, Scarpini E (2005) Association of neuronal nitric oxide synthase C267T polymorphism with Alzheimer's disease. *Journal of Neurology* 252: 985-986.
- German Z, Chambliss KL, Pace MC, Arnet UA, Lowenstein CJ, Shaul PW (2000) Molecular basis of cell-specific endothelial nitric-oxide synthase expression in air epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 275 (11):8183-8189.
- Gerstman BB (2003) *Epidemiology kept simple: an introduction to classic and modern epidemiology*. Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey (EUA).
- Glenn CL, Wang WYS, Morris BJ (1999) Different frequencies of inducible nitric oxide synthase genotypes in older hypertensives. *Hypertension* 33:927-932.
- Goldbourt U, de Faire U, Berg K (1994) *Genetic factors in coronary heart disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- González-Gay MA, Llorca J, Sánchez E, López-Nevot MA, Amoli MM, García-Porrua C, Ollier WER, Martín J (2004) Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology* 43 (9):1182-1185.
- González-Pérez, E., Via, M., Esteban, E., López-Alomar, A., Mazières, S, Harich, N., Kandil, M., Dugoujon, J. M., Moral, P. (2003) Alu insertions in the Iberian Peninsula and North West Africa: Genetic boundaries of melting pot? *Collegium Antropologicum* 27(2), 491-500.
- Grant PJ (2003) The genetics of atherothrombotic disorders: a clinician's view. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1(7): 1381-1390.
- Grasemann H, Drazen JM, Deykin A, Israel E, DeSanctis GT, Pillari A, Yandava CN (1999a) Simple tandem repeat polymorphisms in the neuronal nitric oxide synthase gene in different ethnic populations. *Human Heredity* 49:139-141.
- Grasemann H, Yandava CN, Drazen JM (1999b) Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 29 (S4):39-41.
- Grasemann H, Knauer N, Büscher R, Hübner K, Drazen JM, Ratjen F (2000) Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162:2172-2176.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and 15N-nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry* 126:131-138.
- Greenberg D & Doneshka P (1996) Partitioned association-linkage test: distinguishing "necessary" from "susceptibility" loci. *Genetic Epidemiology* 13: 243-252.
- Griess P (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH:Wesely and Benedikt "Über einige Azoverbindungen". *Ver. Deutsch. Chem. Ges.* 12:426-428.

- Groen JJ, Medalie JH, Neufeld HN, et al. (1968) An epidemiological investigation of hypertension and ischemic heart disease within a defined segment of the adult male population in Israel. *Israel Journal of Medicine Science* 4: 177-94.
- Gross SS & Levi R (1992) Tetrahydrobiopterin Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 267(36): 25722-25729.
- Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA (1994) Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J.Biol.Chem.* 269 (52):33082-33090.
- Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G (2003) Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107:3152-3158.
- Harich N, Esteban E, Chafik A, Lopez-Alomar A, Vona G, Moral P (2002) Classical polymorphisms in Berbers from Moyen Atlas (Morocco): genetics, geography, and historical evidence in the Mediterranean peoples. *Annals of Human Biology* 29 (5):473-487.
- Harpending H & Jenkins T (1973) Genetic distance among southern African populations. En: *Methods and Theories of Anthropological Genetics*. University of New Mexico Press, pp. 177-199.
- Harvald B & Hauge M (1970) Coronary occlusion in twins. *Acta of Genetica Medica in Gemellology* 19: 248-50.
- Haynes SG, Feinleib M, Kannel WB (1980) The relationship of psychosocial factors to coronary heart disease in the Framingham study. III. Eight-year incidence of coronary heart disease. *American Journal of Epidemiology* 111(1): 37-58.
- Hegsted DM, Ausman LM (1988) Diet, alcohol and coronary heart disease in men. *Journal of Nutrition* 118: 1184-1189.
- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S (1998) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 32:521-526.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ (1999) A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu²⁹⁸->Asp) is a major risk for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100 (14):1515-1520.
- Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, Pole A, Coon H, Kariuki S, Nahlen BL, Mwaikambo ED, Lal AL, Granger DL, Anstey NM, Weinberg JB (2002) A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 360:1468-1475.
- Holden C & Mace R (1997) Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Human Biology* 69:605-628.
- Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL (1999) The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIb gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* 116 (4):880-886.
- Hui J, Reither G, Bindereif A (2003a) Novel functional role for CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *RNA* 9:931-936.
- Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A (2003b) HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nature Structural Biology* 10 (1):33-37.
- Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N, Yokota M (1998) Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *American Journal of Cardiology* 81:83-86.
- Ignarro LJ (1989a) Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Research* 65(1): 1-21.
- Ignarro LJ (1989b) Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: Regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Seminars in Hematology* 26: 63-76.
- Immervoll T, Loesgen S, Dütsch G, Gohlke H, Herbon N, Klugbauer S, Dempfle A, Bickeböller H, Becker-Follmann J, Rüschemdorf F, Saar K, Reis A, Wichmann HE, Wjst M (2001) Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Human Mutation* 18:327-336.
- Iwai N, Tago N, Yasui N, Kokubo Y, Inamoto N, Tomoike H, Shioji K (2004) Genetic analyses of 22 candidate genes for hypertension in the Japanese population. *Journal of Hypertension* 22(6):1119-1126.

- Izaabel H, Garchon HJ, Caillat-Zucman S, Beaurain G, Akhayat O, Bach JF, Sanchez-Mazas A (1998) HLA class II DNA polymorphism in a Moroccan population from the Souss, Agadir area. *Tissue Antigens* 51 (1):106-110.
- Johannesen J, Pie A, Pociot F, Kristiansen OP, Karlsten AE, Nerup J (2001) Linkage of the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes. *Journal of Endocrinology and Metabolism* 86 (6):2792-2796.
- Johnson R, McNutt P, MacMahon S, Robson R (1997) Use of the Friedewald formula to estimate LDL-cholesterol in patients with chronic renal failure on dialysis. *Clinical Chemistry* 43 (11):2183-2184.
- Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR (1999) Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 27:1357-1366.
- Kannel WB, Wolf PA, Garrison RJ (1988) *The Framingham Study: an epidemiological investigation of cardiovascular disease*. Bethesda (EEUU): NIH Publication. National Heart, Lung and Blood Institute.
- Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SLM, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GKT, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA (1999) Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *Journal of Biological Chemistry* 274 (5):3076-3093.
- Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, Myara A, Ben Farhat M, Miled A, Maaroufi K, Trivin F (2006) Hyperhomocysteinemia, endothelial nitric oxide synthase polymorphism, and risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 52(1): 53-58.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH (1986) The diet and the 15-year death rate in the seven countries study. *American Journal of Epidemiology* 124: 903-915.
- Konas DW, Zhu K, Sharma M, Aulak KS, Brudvig GW, Stuehr DJ (2004) The FAD-shielding residue Phe1395 regulates neuronal nitric-oxide synthase catalysis by controlling NADP⁺ affinity and a conformational equilibrium within the flavoprotein domain. *Journal of Biological Chemistry* 279(34): 35412-35425.
- Korneev S & O'Shea M (2002) Evolution of Nitric Oxide Synthase Regulatory Genes by DNA Inversion. *Molecular Biology and Evolution* 19:1228-1233.
- Kun JFJ, Mordmuller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D, Kremsner PG (1998) Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* 351:265-266.
- Kwiatkowski DP (2005) How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American Journal of Human Genetics* 77: 171-192.
- Lander ES, Linton LM, Birren B et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Lao O (2004) *Història natural de les malalties mendelianes i complexes en poblacions humanes*. Tesi doctoral. Universitat Pompeu Fabra.
- Laule M, Meisel C, Prauka I, Cascorbi I, Malzahn U, Felix SB, Baumann G, Roots I, Stangl K, Stangl V (2003) Interaction of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and hyperhomocysteinemia in acute coronary syndromes: evidence of gender-specific differences. *Journal of Molecular Medicine* 81:305-309.
- Laval F & Wink DA (1994) Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis* 15(3): 443-7.
- Leung TF, Liu EKH, Tang NLS, Ko FWS, Li CY, Lam CWK, Wong GWK (2005) Nitric oxide synthase polymorphisms and asthma phenotypes in Chinese children. *Clinical and Experimental Allergy* 35: 1288-1294.
- Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal JS, Amouyel P, Tzourio C, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC (2003) Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Human Molecular Genetics* 12 (1):79-86.
- Levesque MC, Hobbs MR, Anstey NM, Vaughn TN, Chancellor JA, Pole A, Perkins DJ, Misukonis MA, Chanock SJ, Granger DL, Weinberg JB (1999) Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in tanzanian children with malaria. *Journal of Infectious Diseases* 180:1994-2002.
- Lewontin RC & Kojima K (1960) The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* 14:450-472.
- Lewontin RC (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 49:49-67.
- Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igbo-Pemu P, Lankford B, Morgan J, Nkemdechi S, Liu G, Pack C, Silvestrov N, von Deutsch DA, Song Q, Abukhalaf IK, Ofili E (2004) Relation of endothelial nitric oxide

- synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *American Journal of Hypertension* 17:560-567.
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
- Lin KF, Chao L, Chao J (1997) Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. *Hypertension* 30 (3):307-313.
- Locatelli I, Lichtenstein P, Yashin AI (2004) The heritability of breast cancer: a Bayesian correlated frailty model applied to Swedish twins data. *Twin Research* 7(2): 182-191.
- López-Nevot MA, Ramal L, Jiménez-Alonso J, Martin J (2003) The inducible nitric oxide synthase promoter polymorphic does not confer susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 42:113-116.
- Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P (2004) Genetics of atherosclerosis. *Annual Reviews of Genomics and Human Genetics* 5:189-218.
- Marenberg ME (1992) *Age and genetic risk of coronary heart disease and stroke mortality in the swedish twin registry - a dissertation*. Presented to the faculty of the grade school of Yale University in candidacy for the degree of doctor of philosophy. Yale: Yale University.
- Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, Powell JF (1998) Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke* 29:1908-1911.
- Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemistry* 268 (23):17478-17488.
- Martin J, Calzada JE, Nieto A (1999) Inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene polymorphism and parasitic disease. *Lancet* 353:72.
- Mateu E, Calafell F, Bonn -Tamir B, Kidd JR, Casals T, Kidd KK, Bertranpetit J (1999) Allele frequencies in a worldwide survey of a CA repeat in the first intron of the CFTR gene. *Human Heredity* 49: 15-20.
- Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y, Ogoshi S, Hashimoto K, Kawai C, Sasayama S, Shizuta Y (1994) Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *European Journal of Biochemistry* 223:719-726.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K (1998) Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32:3-8.
- Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, Valsecchi G, Lucotti P, Pozza G, Bernardinelli L, Casari G, Piatti PM (2003) Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 52:1270-1275.
- Mora R, Lupu F, Simionescu N (1987) Prelesional events in atherogenesis: colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis*. 67: 143-154.
- Moral P, Vives S, Fisac R, Martin J, Mesa MS (1994) Serum protein polymorphisms (HP, TF-, GC- and PI subtypes) in two mountain communities of Sierra de Gredos (central Spain). *Gene Geography* 8(3):215-222.
- Moral P, Valveny N, López-Alomar A, Calo C, Kandil M, Harich N, González-Pérez E, Via M, Esteban E, Dugoujon JM, Vona G. (2003) Molecular variation at functional genes and the history of human populations - Data on candidate genes for cardiovascular risk in Mediterranean. *Collegium Anthropologicum* 27(2): 523-536.
- Morelli L, Grosso MG, Vona G, Varesi L, Torroni A, Francalacci P (2000) Frequency distribution of mitochondrial DNA haplogroups in Corsica and Sardinia. *Human Biology* 72 (4):585-595.
- Morris BJ, Glenn CL, Wilcken DEL, Wang XL (2001) Influence of an inducible nitric oxide synthase promoter variant on clinical variables in patients with coronary artery disease. *Clinical Science* 100:551-556.
- Morris BJ, Markus MA, Glenn CL, Adams DJ, Colagiuri S, Wang XL (2002) Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *Journal of Molecular Medicine* 80:96-104.
- Muna WFT (1993) Cardiovascular disorders in Africa. *World Health Statistics Quarterly* 46: 125-133.
- Myles S, Bouzekri N, Haverfield E, Cherkaoui M, Dugoujon JM, Ward R (2005) Genetic evidence in support of a shared Eurasian-North African dairying origin. *Human Genetics* 117(1):34-42.

- Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F (1994) Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198 (3):1027-1033.
- Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Izumi Y, Kanmatsuse K, Esumi M (1997) Association analysis of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Clinical Genetics* 51:26-30.
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K (1999) T⁻⁷⁸⁶-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864-2870.
- Nathan C & Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 269: 13725-13728.
- Neel JV (1962) Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American Journal of Human Genetics* 14: 353-362.
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41:225-233.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Newton DC, Bevan SC, Choi S, Robb GB, Millar A, Wang Y, Marsden PA (2003) Translational regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5'-untranslated region leader exon. *Journal of Biological Chemistry* 278 (1):636-644.
- Nishida CR & Ortiz de Montellano PR (1999) Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *Journal of Biological Chemistry* 274 (21):14692-14698.
- Norusis MJ (1992) SPSS Advanced Statistics. Chicago: SPSS.
- Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S (1994) Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200 (2):802-807.
- Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K (2002) Significant association of longer forms of CCTTT microsatellite repeat in the inducible nitric oxide synthase promoter with severe malaria in Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 186:578-581.
- Pance A, Chantome A, Reveneau S, Bentrari F, Jeannin JF (2002) A repressor in the proximal human inducible nitric oxide synthase promoter modulates transcriptional activation. *FASEB J.* 16:631-633.
- Papadaki M, Tilton RG, Eskin SG, McIntire LV (1998) Nitric oxide production by cultured human aortic smooth muscle cells: stimulation by fluid flow. *American Journal of Physiology* 274:H616-H626.
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 43 (3):509-520.
- Park CS, Park R, Krishna G (1996) Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. *Life Sciences* 59 (3):219-225.
- Patel RP, Levonen AL, Crawford JH, Darley-Usmar VM (2000) Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 47 (3):465-474.
- Pedersen NL, McLean GE, Plomin R, Nesselroade JR, Berg S, de Faire U (1991) The Swedish adoption/twin study. An update. *Acta of Medical Gemellology* 40: 7-20.
- Plaza, S., Calafell, F., Helal, A., Bouzerna, N., Lefranc, G., Bertranpetit, J., Comas, D. (2003) Joining the Pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the Western Mediterranean. *Annals of Human Genetics* 67, 312-328.
- Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB, Arvelier D, Luc G, Tiret L, Soubrier F, Cambien F (1999) Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *European Journal of Clinical Investigation* 29:284-290.
- Ponting CP, Phillips C, Davies KE, Blake DJ (1997) PDZ domains: targeting signalling molecules to sub membraneous sites. *Bioessays* 19: 469-479.
- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1999) In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. *European Journal of Immunogenetics* 26(1): 1-3.
- Pritchard JK (2001) Are Rare Variants Responsible for Susceptibility to Complex Diseases? *American Journal of Human Genetics* 69:124-137.

- Pulkkinen, A., Vitonen, L., Kareinen, A., Lehto, S., Laakso, M. (2000) Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 151, 207.
- Qian H, Neplioueva V, Shetty G, Channon KM, George SE (1999) Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 99 (23):2979-2982.
- Raymond M., Rousset F. (1995) GENEPOP (1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Reed T, Quiroga J, Selby JV, Carmelli D, Christian JC, Fabsitz RR, Grim CE (1991) Concordance of ischemic heart disease in the NHBLI twin study after 14-18 years of follow-up. *Journal of Clinical Epidemiology*. 44: 797-805.
- Reich DE & Lander ES (2001) On the allelic spectrum of human disease. *Trends in Genetics* 17: 502-510.
- Rhodes P, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S (1995) The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209: 590-6.
- Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD (2002) Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 6 (2):178-185.
- Rich A & Zhang S (2003) Z-DNA: the long road to biological function. *Nature Reviews in Genetics* 4(7): 566-572.
- Richards M (2003) The neolithic invasion of Europe. *Annual Review of Anthropology* 32:135-162.
- Ripamonti U (1988) Paleopathology in *Australopithecus africanus*: a suggested case of a 3-million-year-old prepubertal periodontitis. *American Journal of Physical Anthropology* 76 (2): 197-210.
- Risch N & Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
- Rodriguez-Pascual F, Hausding M, Ihrig-Biedert I, Furneaux H, Levy AP, Förstermann U, Kleinert H (2000) Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *Journal of Biological Chemistry* 275 (34):26040-26049.
- Ross R & Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 180: 1332-1339.
- Rossi GP & Maiolino G (2004) Do meta-analyses of association studies of endothelial nitric oxide synthase variants and ischemic heart disease provide conclusive answers? *Circulation* 110 (11):e305-e306.
- Rubinstein P, Walker M, Carpenter C, Carrier C, Krassner J, Falk C, Ginsberg F (1981) Genetics of HLA-disease associations. The use of the haplotype relative risk (HRR) and the "Haplo-delta" (Dh) estimates in Juvenile Diabetes from three racial groups. *Human Immunology* 3: 384.
- Rutherford S, Johnson MP, Curtain RP, Griffiths LR (2001) Chromosome 17 and the inducible nitric oxide synthase gene in human essential hypertension. *Human Genetics* 109:408-415.
- Saitou N & Nei M (1973) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Ciancio G, Cantini F, Salvi F, Malatesta R, Govoni M, Trotta F, Filippini D, Paolazzi G, Nicoli D, Farnetti E, Macchioni P (2002) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease. *Journal of Rheumatology* 29:535-540.
- Saur D, Vanderwinden JM, Seidler B, Schmid RM, De Laet MH, Allescher HD (2004) Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *PNAS* 101(6): 1662-1667.
- Schepens J, Cuppen E, Wieringa B, Hendricks W (1997) The neuronal nitric oxide synthase PDZ motif binds to -G(D,E)XV* carboxyterminal sequences. *FEBS Letters* 409: 53-56.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. (2000) Arlequin (Ver 2.000): A software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Lab. University of Geneva.
- Searles CD, Miwa Y, Harrison DG, Ramasamy S (1999) Posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth. *Circulation Research* 85:588-595.
- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE, De Benedictis G, Francalacci P, Kouvatsi A, Limborska S, Marcikiae M, Mika A, Mika B, Primorac D, Santachiara-Benerecetti AS, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA (2000) The genetic legacy of paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: A Y chromosome perspective. *Science* 290 (5494):1155-1159.

- Sham PC & Curtis D (1995) An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Annals of Human Genetics* 59: 323-336.
- Shaw JT, Purdie DM, Neil HA, Levy JC, Turner RC (1999) The relative risks of hyperglycaemia, obesity and dyslipidaemia in the relatives of patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 24-27.
- Shen J, Wang WT, Wang LW, Xu YC, Wang RW (2004) A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 10 (22):3278-3283.
- Silvagno F, Xia H, Bredt DS (1996) Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 271: 11204-11208.
- Sim AS, Wang J, Wilcken DEL, Wang XL (1998) *MspI* polymorphism in the promoter of the human endothelial constitutive NO synthase gene in Australian caucasian population. *Molecular Genetics and Metabolism* 65:62.
- Simoni L, Gueresi P, Pettener D, Barbujani G (1999) Patterns of gene flow inferred from genetic distances in the Mediterranean region. *Human Biology* 71: 399-415.
- Simoni L, Calafell F, Pettener D, Bertranpetit J, Barbujani G (2000) Geographic Patterns of mtDNA Diversity in Europe. *American Journal of Human Genetics* 66(1):262-278.
- Sing CF & Moll P (1990) Genetics of atherosclerosis. *Annual Review of Genetics* 24: 171-87.
- Song J, Yoon Y, Park KU, Park J, Hong YJ, Hong SH, Kim JQ (2003) Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations, and enzyme activity in cultured human endothelial cells. *Clinical Chemistry* 49 (6):847-852.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal of Human Genetics* 52:506-516.
- Spitsin SV, Farber JL, Bertovich M, Moehren G, Koprowski H, Michaels FH (1997) Human- and mouse-inducible nitric oxide synthase promoters require activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and NF-KB. *Molecular Medicine* 3 (5):315-326.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.
- Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH (1992) A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 268: 877-881.
- Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Klein T, Stangl V, Rost S, Wernecke KD, Felix SB, Bindereif A, Baumann G, Roots I (2000) High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 10:133-140.
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S (2004) Update on Mechanism and Catalytic Regulation in the NO Synthases. *J.Biol.Chem.* 279 (35):36167-36170.
- Swallow DM & Hollox EJ (2000) The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. En: *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Mc-Graw-Hill, Nova York, pp. 1651-1663.
- Taillon-Miller P, Bauer-Sardina I, Saccone NL, Putzel J, Laitinen T, Cao A, Kere J, Pilia G, Rice JP, Kwok PY (2000) Juxtaposed regions of extensive and minimal linkage disequilibrium in human Xq25 and Xq28. *Nature Genetics* 25 (3):324-328.
- Takahashi Y, Nakayama T, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K (1997a) CA repeat polymorphism of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Human Heredity* 47:58-59.
- Takahashi Y, Nakayama T, Soma M, Uwabo J, Izumi Y, Kanmatsuse K (1997b) Association analysis of TG repeat polymorphism of the neuronal nitric oxide synthase gene with essential hypertension. *Clinical Genetics* 52:83-85.
- Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA (2001) Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 11:719-725.
- Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J (2000) Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *PNAS* 97 (6):2832-2835.
- Texereau J, Marullo S, Hubert D, Coste J, Dusser DJ, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT (2004) Nitric oxide synthase 1 as a potential modifier gene of decline in lung function in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 59:156-158.
- Tiso M, Konas DW, Panda K, Garcin ED, Sharma M, Getzoff ED, Stuehr DJ (2005) C-terminal tail residue Arg1400 enables NADPH to regulate electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 280(47): 39208-39219.

- Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HH, Wilcox CS, Madsen KM (1994) Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 4: 1438-1447.
- Torrioni A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards M, Cruciani F, Rengo C, Martínez-Cabrera V, Villemis R, Kivisild T, Metspalu E, Parik J, Tolk HV, Tambets K, Forster P, Karger B, Francalacci P, Rudan P, Janicijevic B, Sykes B, Hickey E, Novelletto A, Moral P, Sellitto D, Coppa A, Al-Zaheri N, Santachiara-Benerecetti A, Semino O, Scozzari R (2001) A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *American Journal of Human Genetics* 69:844-852.
- Twells R, Xu W, Ball D, Allotey R, Williamson R, Chamberlain S (1995) Exclusion of the neuronal nitric oxide synthase gene and the human *achaete-scute* homologue 1 gene as a candidate loci for spinal cerebellar ataxia 2. *American Journal of Human Genetics* 56:336-337.
- Valveny MN (2000) *Factors de risc genètic per a la cardiopatia isquèmica, polimorfismes en gens del metabolisme lipoproteic*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ (1997) Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 272: 1276-1282.
- Via M, González-Pérez E, Esteban E, López-Alomar A, Vacca L, Vona G, Dugoujon JM, Harich N, Moral P (2003a) Molecular variation in endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS) in Western Mediterranean populations. *Collegium Antropologicum* 27 (1):117-124.
- Via M, López-Alomar A, Valveny N, González-Pérez E, Bao M, Esteban E, Pintó X, Domingo E, Moral P. (2003b) Lack of association between eNOS gene polymorphisms and ischemic heart disease in the Spanish population. *American Journal of Medical Genetics* 116A: 243-248.
- Virchow R (1856) *Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin*. Frankfurt-am- Main: Meidinger Sohn and Company, Phlogose und thrombose mi gefassystem. p. 458.
- Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DEL (1996) A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nature Medicine* 2(1):41-45.
- Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RF, Wilcken DEL (1997) Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 17:3147-3153.
- Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA (1999) RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *PNAS* 96 (21):12150-12155.
- Wang XL & Wang J (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 70:241-251.
- Warpeha KM, Xu W, Liu L, Charles IG, Patterson CC, Ah-Fat F, Harding S, Hart PM, Chakravarty U, Hughes AE (1999) Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)_n repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J*. 13:1825-1832.
- Weir BS & Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data*. Sunderland: Sinauer.
- Wever RMF, Lüscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ (1998) Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 97: 108-112.
- Weyrich AS, Ma XL, Buerke M, Murohara T, Armstead VE, Lefer AM, Nicolas JM, Thomas AP, Lefer DJ, Vinten-Johansen J (1994) Physiological concentrations of nitric oxide do not elicit an acute negative inotropic effect in unstimulated cardiac muscle. *Circulation Research* 75(4):692-700.
- WHO-MONICA (1988) The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *Journal of Clinical Epidemiology* 41(2): 105-114.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.
- Xu W, Liu L, Emson PC, Harrington CR, Charles IG (1997) Evolution of a homopurine-homopyrimidine pentanucleotide repeat sequence upstream of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Gene* 204:165-170.
- Xu W, Humphries S, Tomita M, Okuyama T, Matsuki M, Burgner D, Kwiatkowski D, Liu L, Charles IG (2000) Survey of the allelic frequency of a NOS2A promoter microsatellite in human populations: assessment of the NOS2A gene and predisposition to infectious disease. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 4 (4):379-383.

Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ (2000) Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 46 (10):1626-1630.

Zhang T, Haws P, Wu Q (2004) Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue-specific gene regulation. *Genome Research* 14: 79-89

HIPERLINKS

Arlequin Software: <http://anthro.unige.ch/arlequin/>

deCODE genetics: <http://www.decode.com/>

GENETIX Software: <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>

HapMap Project: <http://www.hapmap.org/index.html.en>

HUGO Gene Nomenclature Committee: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>

MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities):

<http://www.meddramsso.com>

NCBI (National Center for Biotechnology Information):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

NCBI Entrez SNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

NIEHS Environmental Genome Project: <http://egp.gs.washington.edu>

PHYLIP Software: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

TDT Power Calculator Software: <http://www.biostat.jhsph.edu/~wmchen/pc.html>

TRANSMIT software: <http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/>

WHO (Organització Mundial de la Salut): <http://www.who.int>

WHO International Classification of Disease:

<http://www3.who.int/icd/vol1htm2003/fr-icd.htm>

WHO Mortality Database: <http://www3.who.int/whosis/menu.cfm?path=mort>

ANNEXOS

ANNEX 1 - FULL DE CONSENTIMENT I QÜESTIONARI DE LA MOSTRA DE FAMÍLIES

FULL DE CONSENTIMENT

**PROJECTE:
BASES GENÈTIQUES DE LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA: ESTUDI
D'ASSOCIACIÓ EN FAMÍLIES UTILITZANT GENS CANDIDATS
RELACIONATS AMB EL METABOLISME DE LES LDL.**

La finalitat principal d'aquest estudi és la identificació dels factors genètics implicats en l'infart de miocardi, així com la seva relació amb els factors ambientals. Per a realitzar l'estudi genètic és fonamental poder disposar de petites mostres de sang de persones que han estat afectades per aquesta malaltia així com dels seus pares. Per això necessitem la seva ajuda. La seva col.laboració pot contribuir a la millor comprensió i prevenció d'aquesta malaltia en el futur.

La donació d'aquesta mostra no suposarà cap risc per a cap de les persones participants. La privacitat de les dades obtingudes així com de la identitat dels participants està completament garantida.

MOLTES GRÀCIES.

CONSENTIMENT:

Sí, estic d'acord a donar una mostra de sang per a realitzar estudis genètics sobre l'infart de miocardi.

Nom:

Data:

Signatura:

Qüestionari sobre diagnòstic i factors de risc per la cardiopatia coronària

DATA:

1. DADES PERSONALS

Nº identificació estudi:

Nº referència hospital:

Malalt/a _ Pare _ Mare _ Germà/na_

Nom:

Sexe: V M

Telèfon:

Data naixement:

Edat pare:

Edat mare:

Lloc de naixement:

Lloc de naixement avis paterns: /

Lloc de naixement avis materns: /

Pes: kg.

Alçada: m.

Dejú en el moment de l'extracció de sang: SI NO (hores última ingestió:)

2. DIAGNÒSTIC

(només malalts i familiars que pateixen o han patit la malaltia)

CLÍNIC:

Infart de miocardi _

Angor evolutiu _

Angor crònic _

By pass _

ACTP _

Altres (especificar) _ _____

ANGIOGRÀFIC: 1 vas _ 2 vasos _ 3 vasos _

Especificacions:

QUIRÚRGIC:

Data diagnòstic actual:

*Si hi ha episodis antics de la malaltia especificar data i diagnòstic:

3. ANTECEDENTS FAMILIARS

1. De malaltia cardiovascular (especificar edat i diagnòstic):

- Pare: NO_ SI _
 - Mare: NO_ SI _
 - Germà: NO_ SI _
 - Germana: NO_ SI _
 - Altres familiars: NO_ SI _
-
-
-
-

2. Dislipèmia NO_ SI_

3. Hipertensió: NO_ SI_

4. Diabetes: NO_ TIPUS I_ TIPUS II_

5. Mort súbita: NO_ SI_

6. AVC: NO_ SI_
 (especificar a quina edat)

6. Claudicació Intermitent: NO_ SI_
 (Malaltia vascular perifèrica)(especificar a quina edat)

4. ANTECEDENTS PERSONALS

1. Tabaquisme: No fumador/a _
 Ex-fumador/a _
 < 15 _
 15-25 _
 > 25 _

2. Exercici: NO _
 Moderat _
 Fort _

3. Obesitat: Normal _
 Sobrepès (BMI 25-30) _
 Obès (BMI >30) _

4. Alcohol: NO

Moderat (<30 gr/dia)	—
Important (>30 gr/dia)	—
<u>5. Hipertensió:</u>	NO_ SI_
<u>6 .Diabetes:</u>	NO_ TIPUS I_ TIPUS II_
<u>7. Tract. hormonal:</u>	NO_ SI_
<u>8. Dislipèmia:</u> (especificar, si es coneix, el tipus)	NO_ SI_
<u>9. Hiperuricèmia:</u>	NO_ SI_
<u>10.AVC:</u>	NO_ SI_
AIT	NO_ SI_
Art. Perif.	NO_ SI_
Claudicació intermitent (Malaltia vascular perifèrica)	NO_ SI_
<u>11. Estrés:</u>	NO_ SI_
<u>12. Personalitat tipus A :</u>	NO_ SI_
<u>13. Dieta:</u>	Normal_
Rica en greixos	—
Per diabètics	—
Altres (especificar)	— _____
<u>14. Estudis:</u> Cap/ Primaris	—
Secundaris	—
Llicenciat. o superior	—
<u>15. Situació laboral:</u>	Actiu/va —
Baixa laboral	—
Invalidesa perm.	—
Atur	—
Altres (especificar)	— _____
<u>16. Estat civil:</u>	Casat/da, ajuntat/da —
Solter/a	—
Vidu/a	—
Separat/da o divorciat/da	—
Altres	—

5. TRACTAMENTS ACTUALS

1. DIETA: NO_ SI_
2. HIPOLIPEMIANTS: NO_ SI_
3. ALTRES: NO_ SI_

ANNEX 2 - LABORATORI

PROTOCOL FENOL-CLOROFORM D'EXTRACCIÓ DE DNA

1er DIA

1. Es parteix de 5 ml de sang total per tub o 1-2 ml de fracció enriquida de leucòcits.
2. Afegir 8 ml de tampó de lisi 1.
3. Deixar 10 minuts en gel agitant per inversió.
4. Centrifugar 10 minuts a 4°C i a 3000 rpm.
5. Extreure el sobrenedant i resuspendre el sediment amb 1 ml de TBS.
6. Barrejar amb la pipeta.
7. Afegir 1 ml de tampó de lisi 2 i 50 µl de proteïnasa K (10 mg/ml).
8. Barrejar per inversió.
9. Incubar 1-2 hores a 55°C perquè actui l'enzim.
10. Posar els 2 ml de mostra, un cop freds, en un tub cònic amb resina de sílica-gel.
11. Afegir 1 ml de fenol i 1 ml de cloroform-alcohol isoamílic (24:1).
12. Agitar per inversió durant 5 minuts.
13. Centrifugar 7 minuts a 2500 rpm a temperatura ambient.
14. Repetir els punts 11 a 13.
15. Afegir 2 ml de cloroform-alcohol isoamílic en el mateix tub.
16. Agitar per inversió durant 5 minuts.
17. Centrifugar 7 minuts a 2500 rpm a temperatura ambient.
18. Posar la fase superior en un tub de 30 ml.
19. Afegir 0.67 ml d'acetat d'amoni 10 M (5X) per cada 2 ml de mostra.
20. Afegir 2.5 volums d'etanol al 95%.
21. Invertir diverses vegades.
22. Deixar tota la nit a -20°C o 45 minuts a -80°C.

2on DIA

23. Centrifugar 30 minuts a temperatura ambient a 8000 rpm.
24. Treure el sobrenedant, afegir 2 volums d'etanol al 70% i agitar en vòrtex.
25. Centrifugar igual que en el punt 25.
26. Treure el sobrenedant i assecar el pellet de DNA al buit.
27. Resuspendre en un màxim de 300 µl de TE en un tub eppendorf de 1.5 ml.
28. Incubar 10 minuts a 65°C.
29. Fer un spin.
30. Diluir 50 vegades en TE i mesurar la DO a 260 nm i 280 nm, emprant el TE de blanc.
31. Calcular la concentració.
32. Guardar l'ADN a -20°C.

Solucions utilitzades per a l'extracció de l'ADN:

TAMPÓ DE LISI 1:

10 mM TrisHCl pH 7.5
10 mM NaCl
3 mM MgCl₂
S'autoclava

TAMPÓ DE LISI 2:

400 mM TrisHCl pH 8
100 mM EDTA pH 8
1% SDS
S'autoclava abans de posar l'SDS
L'SDS s'afegeix filtrat

TBS: 20 mM TrisHCl pH 7.5
150 mM NaCl
S'autoclava

TE: 10 mM TrisHCl pH 8
1 mM EDTA pH 8
S'autoclava

PROTEINASA K:

10 mg/ml en H₂O_{be}
No s'autoclava

ACETAT D'AMONI:

10 M Acetat d'amoni en H₂O_{be}
Es filtra

PROTOCOL DE PURIFICACIÓ I SEQÜENCIACIÓ DE PRODUCTES AMPLIFICATS

Per tal de seqüenciar els productes que havien estat amplificats per PCR, es van seguir diferents tècniques per purificar-los (GeneClean II, kits amb columnes, ...). En aquest apartat s'especifica el mètode usat en la majoria dels casos que va consistir en la utilització del *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN). Aquest kit purifica seqüències de DNA amplificades d'entre 100 pb fins a 10 Kb, i totes les centrifugacions especificades són 10000 g.

1. Afegir 5 volums de *buffer* PB a un volum de producte de PCR amplificat.
2. Posar una columna *QIAquick spin* en un tub de 2 ml.
3. Per unir el DNA a la columna, es posa la barreja del pas 1 a la columna i es centrifuga durant 30-60 segons.
4. Es descarta el filtrat i es torna a col·locar la columna al tub, ara buit, de 2 ml.
5. Per rentar el producte a purificar, es posen 750 µl de *buffer* PE a la columna i es centrifuga durant 30-60 segons.
6. Es descarta el filtrat, es torna a col·locar la columna al tub de 2 ml i torna a centrifugar-se 60 segons.
7. Posar la columna *QIAquick* en un tub eppendorf de 1.5 ml.
8. Per eluir el DNA purificat, afegir 30-50 µl de *buffer* EB o d'aigua al centre de la membrana de la columna i es centrifuga un minut.

Amb el producte de PCR ja purificat, va procedir-se a l'amplificació de seqüenciació utilitzant el *ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems). La composició de la PCR i el programa van ser els següents:

DNA purificat	2-5 µl	96°C	10''	
Oligonucleòtid	2 µl	55°C	5''	25 cicles
Mix	8 µl	60°C	4'	
H ₂ O _{be}	8 µl	4°C		
V _t	20 µl			

La precipitació del producte de seqüenciació va consistir en els següents punts:

1. Afegir a un tub de 1.5 ml amb el producte de la reacció de seqüenciació: 19 µl de MgCl₂ 2 mM, i 55 µl d'etanol 70%.
2. Agitar amb vòrtex i deixar precipitar durant 10-15'.
3. Centrifugar 20' a 14000 rpm.
4. Eliminar el sobrenedant.
5. Afegir 200 µl d'etanol 70%.
6. Centrifugar 5' a 14000 rpm.
7. Eliminar el sobrenedant.
8. Repetir 2 vegades més els punts 5-7, apurant el sobrenedant al màxim l'últim cop.
9. Secar el pellet a l'aire o amb bomba de buit.

Les mostres així preparades van ser portades als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona, on van ser analitzades en un seqüenciador de DNA per electroforesi capil·lar *ABI PRISM 3700* (Applied Biosystems).

PROTOCOL DE VALORACIÓ DE NITRATS I NITRITS (NO_x) EN PLASMA

- Descongelar els plasmes.
- Centrifugar les mostres a 13000 rpm (10' a 4°C) per precipitar els lípids i evitar que interfereixin en les següents reaccions.
- Preparació de 6 rèpliques per cada mostra:
 - 2 mostres: 50 µl tampó fosfat 50 mM pH=7.5
50 µl de mostra
50 µl H₂O mQ
20 µl nitrat reductasa (*Cayman Chemicals*)
20 µl cofactor (*Cayman Chemicals*)
 - 2 recuperació: 50 µl tampó fosfat 50 mM pH=7.5
50 µl de mostra
50 µl solució NO₃⁻ 10µM
20 µl nitrat reductasa
20 µl cofactor
 - 2 basals: 50 µl tampó fosfat 50 mM pH=7.5
50 µl de mostra
50 µl H₂O mQ
40 µl tampó fosfat 20 mM pH=7.4
- Preparar els patrons: dilucions d'una solució mare de nitrat sòdic (0, 5, 10, 15, 40 i 200 µM).
- Càrrega de mostres i patrons en plaques multipou de 96 pouets.
- Agitar placa durant 3'.
- Incubar 3h a temperatura ambient, resguardat de la llum.
- Afegir 100 µl de solució de Griess preparat al mateix moment:
 - 50 µl Griess A (sulfanilamina, *SIGMA*) 0,2% en H₂O mQ
 - 50 µl Griess B (N-(1-naftil)etilendiamina, *SIGMA*) 2% en H₃PO₄ al 5%
- Incubar 10' a temperatura ambient, resguardat de la llum.
- Lectura a 540nm en un lector de plaques d'ELISA.

A l'absorbància mitjana de la mostra se li restava l'absorbància del patró a 0 µM (blanc) i l'absorbància basal de la mostra (calculada a partir de la mateixa mostra incubada sense enzim). Es calculava la concentració de NO_x en la mostra en base a la recta de regressió de les lectures dels patrons i es corregia qualsevol sobreestimació o infraestimació de la concentració a partir de les recuperacions de cada mostra (mostres a les que s'ha afegit una concentració coneguda de nitrats, i que funcionen com a controls interns).

D'aquesta manera s'aconseguia evitar diferents factors que podrien interferir en les valoracions, com ara l'efecte de l'anticoagulant i la turbidesa basal de la mostra.

EQUIVALÈNCIES MICROSATÈL·LITS

	Tamany (pb)	Nº repetíc.		Tamany (pb)	Nº repetíc.	
NOS1 5'-(GT) _n	181	18	NOS2 (CCTTT) _n	176	8	
	183	19		181	9	
	185	20		186	10	
	189	22		191	11	
	191	23		196	12	
	193	24		201	13	
	195	25		206	14	
	197	26		211	15	
	199	27		217	16	
	201	28				
	203	29		NOS2 (AAAT) _n	313	4
	205	30			317	5
	207	31				
	209	32				
NOS1 (AAT) _n	328	9	NOS3 (CA) _n	143	21	
	331	10		145	22	
	334	11		147	23	
	337	12		149	24	
	340	13		151	25	
	343	14		153	26	
	346	15		155	27	
	349	16		157	28	
		159		29		
		161		30		
		163		31		
		165		32		
		167		33		
		169		34		
		171		35		
		173		36		
		175		37		
		177		38		
		179		39		
		181		40		
		183		41		
		185	42			
		187	43			
NOS1 3'-(GT) _n	169	13				
	173	15				
	175	16				
	177	17				
	179	18				
	181	19				
	183	20				
	185	21				
187	22					

ANNEX 3 - RESULTATS POBLACIONALS

	N-IBER	C-IBER	S-IBER	M-ATL	A-ATL	SAR-C	SAR-I	S-FRA
C-IBER	0.0135							
S-IBER	0.0076	0.0093						
M-ATL	0.0206	0.0172	0.0170					
A-ATL	0.0160	0.0151	0.0169	0.0107				
SAR-C	0.0176	0.0239	0.0168	0.0213	0.0194			
SAR-I	0.0120	0.0242	0.0138	0.0175	0.0204	0.0075		
S-FRA	0.0034	0.0135	0.0087	0.0186	0.0148	0.0141	0.0103	
ALEM	0.0070	0.0092	0.0100	0.0242	0.0166	0.0253	0.0219	0.0096

Matriu de distàncies de Reynolds pels tretze polimorfismes analitzats conjuntament.

ANNEX 4 - RESULTATS EPIDEMIOLÒGICS

TDT dels polimorfismes analitzats i no destacats en el capítol de Resultats i Discussió.

MARCADOR	N	Al·lel	Transmis. Observ.	Transmis. Esper.	Var(O-E)	TDT	gdl	p	BT-p
NOS1 5'-(GT) _n	92	18	0	0.549	0.246	1.225		0.2684	0.2603
		19	35	33.877	12.949	0.097		0.7550	0.7679
		20	9	10.441	4.551	0.456		0.4993	0.4797
		22	1	0.549	0.246	0.825		0.3639	0.2737
		23	3	1.657	0.721	2.499		0.1139	0.1843
		24	47	43.707	14.707	0.737		0.3905	0.3977
		25	9	8.912	3.951	0.002		0.9649	0.9598
		26	3	2.710	1.224	0.069		0.7930	0.7068
		27	0	0.549	0.246	1.225		0.2684	0.2695
		28	19	19.477	6.803	0.033		0.8548	0.8339
		29	21	18.590	7.087	0.820		0.3653	0.4087
		30	40	44.461	15.185	1.311		0.2523	0.3066
		31	2	2.796	1.230	0.515		0.4731	0.4991
32	1	1.723	0.736	0.710		0.3996	0.4534		
		Global				9.301	13	0.7498	0.7766
NOS1 (AAT) _n	97	9	3	5.981	2.692	3.302		0.0692	0.2193
		10	94	97.704	22.365	0.613		0.4335	0.4867
		11	1	0.542	0.247	0.848		0.3570	0.2661
		12	4	3.227	1.485	0.403		0.5256	0.4586
		13	40	39.240	12.765	0.045		0.8316	0.8288
		14	46	42.996	14.128	0.639		0.4242	0.4394
		15	11	9.766	4.352	0.350		0.5542	0.5832
		16	1	0.544	0.244	0.853		0.3557	0.2616
		Global				6.937	7	0.4355	0.5368
NOS1 3'-(GT) _n	94	13	1	0.547	0.245	0.837		0.3602	0.2587
		15	1	1.099	0.489	0.020		0.8878	0.7326
		16	5	3.934	1.705	0.667		0.4141	0.4354
		17	146	144.900	15.321	0.079		0.7792	0.7770
		18	17	17.531	7.015	0.040		0.8410	0.8280
		19	4	3.903	1.655	0.006		0.9396	0.9450
		20	2	1.095	0.490	1.674		0.1957	0.2591
		21	18	20.990	7.737	1.155		0.2824	0.3587
		Global				4.057	7	0.7732	0.7876
NOS2 G-954C	99	G	167	169.340	14.055	0.391		0.5320	0.5254
		C	37	34.657	14.055	0.391		0.5320	0.5254
		Global				0.391		0.5320	0.5254
NOS2 (AAAT) _n	95	4	170	167.800	10.582	0.457		0.4992	0.4880
		5	26	28.198	10.582	0.457		0.4992	0.4880
		Global				0.457		0.4992	0.4880
NOS2 A300G	91	A	104	105.610	19.532	0.133		0.7149	0.7369
		G	80	78.385	19.532	0.133		0.7149	0.7369
		Global				0.133		0.7149	0.7369
NOS2 C150T	93	C	151	153.620	14.914	0.460		0.4977	0.4843
		T	41	38.381	14.914	0.460		0.4977	0.4843
		Global				0.460		0.4977	0.4843

MARCADOR	N	Al·lel	Transmis. Observ.	Transmis. Esper.	Var(O-E)	TDT	gdl	p	BT-p
NOS3 T-786C	97	T	108	111.540	24.626	0.509		0.4758	0.4615
		C	92	88.461	24.626	0.509		0.4758	0.4615
		Global				0.509		0.4758	0.4615
NOS3 ecNOS4a/b	98	a	28	26.602	10.187	0.192		0.6613	0.6704
		b	174	175.400	10.187	0.192		0.6613	0.6704
		Global				0.192		0.6613	0.6704
NOS3 G894T	96	G	103	103.250	21.949	0.003		0.9577	0.9542
		T	95	94.752	21.949	0.003		0.9577	0.9542
		Global				0.003		0.9577	0.9542
NOS3 A27C	97	A	136	139.240	18.339	0.574		0.4487	0.4625
		C	62	58.756	18.339	0.574		0.4487	0.4625
		Global				0.574		0.4487	0.4625

N: nombre de famílies incloses en l'anàlisi

Var(O-E): variança de les transmissions observades menys les esperades

gdl: graus de llibertat (si no s'indica res, és 1)

BT-p: probabilitat del test bootstrap (10000 repeticions).

ANNEX 5- PUBLICACIONS DERIVADES D'AQUEST TREBALL

Lack of Association Between eNOS Gene Polymorphisms and Ischemic Heart Disease in the Spanish Population

Marc Via,¹ Antonio López-Alomar,¹ Neus Valveny,¹ Emilio González-Pérez,¹ Meritxell Bao,¹ Esther Esteban,¹ Xavier Pintó,² Enric Domingo,³ and Pedro Moral^{1*}

¹Unitat d'Antropologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Unitat d'Aterosclerosi, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain

³Unitat d'Hemodinàmica, Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Through the nitric oxide (NO) production in the vascular system, the endothelial nitric oxide synthase (eNOS or NOS3) is a key enzyme in blood pressure regulation and atherosclerosis control. Several previous studies have suggested an important role of eNOS as a genetic risk factor for cardiovascular diseases. In this context, a genetic association study was carried out between two eNOS polymorphisms (the ecNOS4a/b VNTR and the G894T substitution) in a sample of 101 nuclear families having one affected offspring of ischemic heart disease (IHD). Transmission disequilibrium test (TDT) revealed partial associations between the VNTR marker and IHD in patients with a type A behavior pattern (TABP) ($P = 0.0325$, $RR = 3.67$) and for the haplotype formed by variant b of the VNTR and the T mutation of the G894T substitution in the IHD-affected subgroup having body mass index (BMI) lower than 25 ($P = 0.0348$, $RR = 0.22$). However, once multiple testing correction was applied, the associations became nonsignificant. A significant effect of the haplotype b-G increasing high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) plasma levels was detected

($P = 0.021$ after Bonferroni correction). From a population point of view, frequencies found for G894T substitution in Spain were significantly different from other populations.

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: eNOS; nitric oxide; transmission disequilibrium; ischemic heart disease; lipid levels; Spanish populations

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is a gaseous metabolite endogenously produced by three nitric oxide synthases (NOS) that plays a very important role in many different biological processes. In cardiac muscle and in vessel endothelium, NO inhibits platelet aggregation, relaxes smooth vascular musculature, reduces monocyte adhesion to endothelium [Balligand and Cannon, 1997; Rudic and Sessa, 1999], and attenuates atherogenic processes [Qian et al., 1999].

The three NOS isoforms map in different chromosomes (7, 12, and 17) and are the product of gene duplication from a common ancestral gene [Nathan and Xie, 1994]. The first discovered NOS enzyme was the neuronal NOS (nNOS or NOS1) from neurons and cerebellum of rats and pigs. Later, the inducible NOS (iNOS or NOS2) was isolated from macrophages, and finally, a third NOS isoform, called endothelial NOS (eNOS or NOS3), was identified due to its presence in endothelial cells.

The endothelial NOS isoform is mainly involved in cardiovascular system regulation, and different polymorphisms within the gene have been tested for associations with different cardiovascular pathologies, leading to conflicting results.

In order to validate previous results, here we tested for genetic association of two eNOS polymorphisms with ischemic heart disease. The 27-bp VNTR in intron 4 of the eNOS gene, called ecNOS4a/b, has been postulated to have an influence both in NO and enzyme production

Grant sponsor: Dirección General de Investigación Científica y Técnica from Spain; Grant number: PB98-1235-C3-01; Grant sponsor: Commissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya; Grant number: 2000 SGR00033; Grant sponsor: Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya; Grant number: 2001FI 00177 UB.

*Correspondence to: Prof. Pedro Moral, Laboratory of Anthropology, Department of Animal Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.
E-mail: pmoral@bio.ub.es

Received 7 December 2001; Accepted 6 June 2002

DOI 10.1002/ajmg.a.10805

levels [Wang et al., 1997, 2000], and the allele ecNOS4*a of this polymorphism has been positively associated with different cardiovascular pathologies [Wang et al., 1996; Ichihara et al., 1998; Hooper et al., 1999]. Nevertheless, this polymorphism lies in an intron and its functional role is doubtful. The second examined eNOS polymorphism refers to the G894T substitution in exon 7 of the gene leading to an amino acidic change from Glu to Asp in the 298 site (also called Glu298Asp). This change was supposed to cause different susceptibility to spontaneous enzyme cleavage into two fractions, not affecting the efficiency to produce NO in vitro [Tesauro et al., 2000], but subsequent papers show that this could be a product of sample preparation [Fairchild et al., 2001]. Associations with different diseases have been reported for this nucleotide substitution with controversial results concerning the allele and/or genotype implied [Miyamoto et al., 1998; Hingorani et al., 1999; Elbaz et al., 2000]. Nevertheless, it does not seem to have a major role on vascular activity in atherosclerosis [Guzik et al., 2001].

In contrast to many previous studies based on case-control designs, we used a family-based strategy to try to minimize possible confounding effects due to the heterogeneity between cases and controls for other variables different from disease. This approximation was carried out by the transmission disequilibrium test (TDT) designed by Spielman et al. [1993] and its extension for multiple allelic markers [Sham and Curtis, 1995]. Besides, the geographic origin of the population examined represents an additional interest due to both the low cardiovascular incidences in the Mediterranean countries (according to World Health Organization data) and the fact that these populations have been scarcely investigated for genetic risk factors for cardiovascular disorders, with few exceptions [Poirier et al., 1999; Elbaz et al., 2000].

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 101 families (n = 302) were recruited from four hospitals in the area of Barcelona, Spain, each family consisting of one individual diagnosed for ischemic heart disease (IHD) and both parents. In the cases where one or both parents were not available, brothers and sisters were recruited in order to reconstruct the parental genotype and haplotype. The criteria to include an individual were the following: age younger than 55 (in order to give priority to genetic component) and affected by myocardial infarction or angina pectoris diagnosed by an expert cardiologist. Myocardial infarction was diagnosed by clinical, enzymatic (CPK levels >200 U/l), and electrocardiography changes typical in myocardial ischemic injury and necrosis, and angina pectoris by coronariography with an obstruction of more than 50% in a main coronary artery.

All subjects supplied written informed consent, together with a blood sample and a complete questionnaire of cardiovascular risk factors (individual, environmental, and family variables) and pharmacological treatments. From blood samples, DNA was extracted

by the phenol/chloroform method using the leukocyte fraction.

Genetic Analyses

The ecNOS4a/b polymorphism was typed by polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotide primers (forward, 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCCTT-3'; reverse, 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTTCAC-3') flanking the region of the 27-bp repeat in intron 4, as described previously [Wang et al., 1996], with minor modifications. A 25- μ l reaction volume was used for each PCR, including 12.5 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 10% DMSO, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 U of Taq polymerase (Ecogen), and 1 \times buffer (supplied by the manufacturer) together with 250 ng of genomic DNA. The thermocycling procedure consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. Two alleles were identified in the samples: one having four repeats of the consensus sequence (allele ecNOS4*a of 393 bp) and one having five (allele ecNOS4*b of 420 bp).

The G894T substitution variants were determined by RFLP-PCR. The amplification used two oligonucleotide primers (forward, 5'-GCATTCAGCACGGCTGGA-3'; reverse, 5'-GCTCCAGGGGCACCTCAA-3') that amplified a 129-bp region in exon 7. A 25-ml reaction volume was used, including the same products and concentrations as for the ecNOS4a/b polymorphism, but without DMSO. Thermocycling was performed using a Perkin-Elmer 9600 thermocycler and a protocol with an initial denaturation at 94°C for 5 min, 32 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 60°C for 30 sec, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min. Twelve microliters of the PCR products were then digested together with 4 U of BanII restriction enzyme in a total volume of 20 μ l at 37°C overnight. The digestion products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining, allowing the distinction between the allele G bearing the restriction site and the allele T carrying a mutation in this restriction site.

Statistical Analyses

Genotypic frequencies for both polymorphisms were computed by SPSS version 10.0 for Windows [SPSS, 1999]. Allelic frequencies, Hardy-Weinberg adjustment, linkage disequilibrium, and haplotypic frequencies were calculated by Arlequin version 2.000 [Schneider et al., 2000].

The allele-wise TDT [Sham and Curtis, 1995] and standard biallelic TDT [Spielman et al., 1993] were calculated by the TRANSMIT program [Clayton, 1999]. This program computes result probabilities by a bootstrap test. In the present study all results were calculated with 100,000 bootstraps. In some cases, TDT was calculated manually using the criteria presented by Spielman et al. [1993], taking into account only

unequivocal informative transmissions. Allelic relative risks (RR) were calculated as follows: $RR = T/NT$, where T is the number of transmitted alleles and NT the number of nontransmitted alleles. Significance levels must be considered cautiously due to multiple testing.

The evaluation of genetic effect on lipid parameters was estimated by multiple regression and analysis of variance (ANOVA) using SPSS version 10.0. These lipid parameters analyzed included total cholesterol, triglycerids, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and ApoB, and were measured using enzymatic and turbidimetric standardized procedures [Valveny, 2000]. ApoB was used as an indicator of low-density lipoprotein (LDL-C) cholesterol, as it is highly correlated (0.90) with LDL-C levels, as previously described [Livshits et al., 1997].

RESULTS

Allele and Haplotype Frequencies

After genotyping, three of the 101 families were omitted because of the impossibility of the existence of a Mendelian inheritance pattern. A recombination or an ex-paternity event must have occurred within these families.

Frequency distributions for the two markers in IHD patients, their parents, and the total sample are shown in Table I. In all cases, observed genotype values fitted well the expected frequencies under Hardy-Weinberg equilibrium assumptions. The most common allele in each marker was ecNOS4*b (0.867 in patients, 0.854 in parents, and 0.869 in the whole sample) and G (0.515 in probands, 0.522 in parents, and 0.514 in the total), and no frequency differences between patient and parent subgroups were detected. It is interesting to note that the relatively high frequency of the T allele in our Spanish sample (for instance, 0.478 in parental sub-series) contrasts to results in other populations, suggesting an important population variation of this polymorphism (see below).

Maximum likelihood haplotype frequencies (Table I) were practically identical to unequivocal frequencies calculated by direct counting from the reconstructed haplotypes (93.4%) on the basis of family genotype information. Haplotype distribution indicates that the most prevalent haplotypes were b-T and b-G. Variation in the two loci was statistically correlated with an excess of b-T chromosomes. Linkage disequilibrium coefficient, D' , equals 0.569 in the patient subgroup, 0.697 in parents, and 0.662 in the total sample.

Transmission Disequilibrium Analysis

A first general approach applying TDT to the global family data failed to detect significant transmission disequilibrium for individual alleles or haplotypes of the two markers examined (Table II). Then, the patient sample was stratified on the basis of environmental risk factors (smoking, hypertension, type A behavior pattern (TABP), stress, sex, and body mass index (BMI)), and TDT analysis was applied to the different subgroups in order to detect the potential importance of genetic factors in relation to several environmental factors.

In patients with TABP, a remarkable transmission deviation was observed for the ecNOS4a/b marker ($\chi^2 = 3.209$, bootstrap test $P = 0.0628$, as indicated in Table III; $\chi^2 = 4.57$, $P = 0.0325$, from manual calculation). Allele ecNOS4*b was significantly transmitted more times than expected, showing an associated relative risk of 3.67.

Furthermore, the b-T haplotype showed a significant association with a BMI of <25 in the patient subsample when unequivocal informative transmissions were considered ($\chi^2 = 4.454$, $P = 0.0348$). In this case, the estimated RR for the b-T haplotype was 0.22 and this haplotype would be negatively associated with the disease. In Table III, chi-square and bootstrap P values are shown as calculated by the TRANSMIT program.

However, it should be noted that these significances could be attributed to either multiple testing or low sample sizes. In fact, the associations found must be considered nonsignificant due to multiple testing, although they show some trends in interactions between genetics and environment on the basis of cardiovascular pathologies.

Effect of Polymorphisms on Lipid Levels

Lipid mean values of total cholesterol, HDL-C, triglycerids, and ApoB in probands and parents are shown in Table IV. The analysis was independently performed for IHD patients and their parents to avoid the effect of internal correlations among relative members of each family unit. Our data reveal an interaction between the b-G haplotype and HDL-C. Among probands, both heterozygotes and homozygotes for the b-G haplotype present higher HDL-C levels than those individuals lacking this haplotype, presenting an excess of 5.262 mg/dl ($P = 0.007$, and $P = 0.021$ after Bonferroni correction), as shown in Table V. The regression model explains 19.1% of the total variation in HDL-C levels ($P = 0.025$), but 13.8% of this variation is due to the

TABLE I. Genotypic and Haplotypic Frequencies*

	ecNOS4a/b					G894T					ecNOS4a/b-G894T						
	aa	ab	bb	N	HW	H	GG	GT	TT	N	HW	H	a-G	a-T	b-G	b-T	LD
Total	.017	.223	.759	291	1.0	.227	.261	.509	.230	287	.814	.510	.106	.025	.407	.461	.00001
Parents	.022	.245	.734	139	1.0	.248	.248	.547	.204	137	.318	.547	.124	.022	.398	.456	.00039
Children	.020	.220	.760	100	.672	.234	.293	.455	.253	99	.425	.459	.101	.032	.414	.453	.04181

*The samples are divided in three subsamples: total sample, parents and affected children. N, number of individuals genotyped; HW, probability assuming Hardy-Weinberg equilibrium; H, heterozygosity; LD, probability of linkage disequilibrium for the haplotype.

TABLE II. TDT Results for Both Markers Individually and for the Haplotype

Marker/s	N	Genotype/haplotype	Freq.	Obs. trans.	Exp. trans.	Var (O-E)	χ^2	D.F.	Prob.
ecNOS4ab/G894T	98	a-G	0.1011	20.79	20.99	7.22	0.0052	1	0.9393
		b-G	0.4113	83.38	83.28	23.09	0.0005	1	0.9811
		a-T	0.0287	5.71	5.65	2.35	0.0011	1	0.9725
		b-T	0.4589	92.12	92.08	22.68	0	1	0.9925
ecNOS4a/b	100	a	0.1294	28	27.1	10.44	0.0776	1	0.7915
		b	0.8706	178	178.9	10.44	0.0776	1	0.7915
							0.0776	1	0.7915
							0.0028	1	0.9532
G894T	96	G	0.5177	103	103.25	21.95	0.0028	1	0.9532
		T	0.4823	95	94.75	21.95	0.0028	1	0.9532

N, number of families included; Obs. trans., number of informative transmissions of allele or haplotype under estimation observed in the sample; Exp. trans., number of transmission expected under mendelian inheritance; Var (O-E), variance of the observed minus expected transmissions; D.F., degrees of freedom; Prob., probability obtained after bootstrap test.

significant covariables (sex, age, and smoking) and 5.3% is explained by the combined genotype. Among parents, the whole model is only significant for the differences between b-G/b-G homozygotes and the other genotypes ($P = 0.030$), but the differences between genotypes do not stand after Bonferroni correction.

DISCUSSION

The general feature of this study is the lack of strong association between molecular variation in the eNOS gene and IHD that does not support any important role for this gene as a major determinant of IHD susceptibility in the Spanish population. Hence, our analyses do not confirm genetic associations reported in other studies [Wang et al., 1996; Ichihara et al., 1998; Miyamoto et al., 1998; Hingorani et al., 1999; Hooper et al., 1999; Elbaz et al., 2000]. However, partially significant associations may suggest certain trends that deserve some comment.

The potential importance of ecNOS4a/b variation in modulating IHD risk in probands with a type A behavior may have a physiological explanation. TABP was first defined by Friedman and Rosenman [1959] from characteristics such as impatience, hostility, and competitiveness, and it has been associated with a greater cardiovascular reactivity [Albright et al., 1988; Fichera and Andreassi, 1998]. The association between an eNOS polymorphism and IHD in TABP individuals might be related to the role of NO in blood pressure regulation. Individuals prone to blood pressure rises might have

increased susceptibility to IHD if they are carriers of an eNOS variant with low efficiency in NO production. In this way, results from Wang et al. [2000], demonstrating that the eNOS protein produced by ecNOS4*b homozygous had a reduced activity, may support the association found between IHD and the ecNOS4*b allele in this study.

The other described association suggests a decreased risk for IHD among the subjects who were b-T haplotype carriers when they were not overweight or obese. This is the first association study that uses the haplotype of both markers, and it is not possible to make comparisons with previous works.

At any rate, in spite of the risk of being too restrictive, the significances found could easily be attributed to multiple testing. So partial associations found here should be interpreted as suggestions for further studies designed to assess the interrelations between molecular variation in eNOS genes and other factors, as organic reaction to stress or body constitution, and their involvement in the susceptibility to cardiovascular disorders.

Concerning the genetic impact of eNOS variation on plasma lipids, only an influence on HDL-C levels was detected. The presence of the b-G haplotype in the affected subsample is significantly associated with higher levels of HDL-C. This influence is consistent between subsamples (the same effect is present in parents too, but not reaching significance after the Bonferroni correction), and a dose-dependent effect has been observed in both subsamples. b-G homozygotes

TABLE III. TDT Results for Subdivisions of the Sample for Environmental Risk Factors

Marker/s	N	Genot/haplot.	Freq.	Obs. trans.	Exp. trans.	Var (O-E)	χ^2	D.F.	Prob.
TABP patients									
ecNOS4a/b	34	a	0.1525	8	11.6	4.03	3.209	1	0.0628
		b	0.8475	64	60.4	4.03	3.209	1	0.0628
Patients with BMI < 25									
ecNOS4ab/G894T	19	a-G	0.1801	7.9	6.84	2.29	0.489	1	0.4155
		b-G	0.3639	15.1	13.83	4.49	0.3592	1	0.4913
		a-T	0.0638	3.1	2.42	1.04	0.435	1	0.4954
		b-T	0.3923	11.9	14.9	4.32	2.0906	1	0.0256
						2.2496	3	0.3627	

TABLE IV. Mean Values of the Four Lipid and Apolipoprotein Parameters Analyzed in the Subsamples

	Total cholesterol	Tryglicerids	HDL-cholesterol	ApoB
Patients (mg/dl)	194.1 ± 8.3	124.9 ± 13.5	36.2 ± 1.6	96.9 ± 4.9
Parents (mg/dl)	206.8 ± 6.8	109.7 ± 9.8	46.8 ± 1.9	98.8 ± 3.9

TABLE V. Correlation Analysis Between HDL-C and the Haplotype b-G in Affected Individuals

	N	Mean ± SD (mg/dl)	Relative effect	P
b-G absent	29	33.19 ± 9.37	-5.262	0.007 (0.021) ^a
b-G present	55	37.14 ± 8.47	0	—

All values have been calculated by multiple regression and analysis of the variance (ANOVA) using SPSS ver. 10.0.

^aProbability after Bonferroni correction.

show higher HDL-C levels than b-G heterozygotes, although these differences are not significant once multiple testing is taken into account. However, it is difficult to impute a special relevance for IHD risk since the same effect was present in probands and their parents. In comparison with other studies, the only association described between some of these polymorphisms and lipid levels [Elbaz et al., 2000] was not confirmed in the present study.

As for the human population variation, our data indicate that the variation range of some eNOS markers is remarkably wider than that in previous studies. In the case of the eNOS4a/b polymorphism, only the alleles of four and five repeats have been found here, whose frequencies do not differ from those previously described for Asian and Caucasian populations [Wang et al., 1996; Ichihara et al., 1998; Miyamoto et al., 1998; Yoon et al., 2000; Zanchi et al., 2000]. Alleles of two, three, and six repeats found in African-American populations [Hooper et al., 1999] and in Berber and African populations (data not shown) were not detected in the present study.

On the other hand, the present frequencies for the T allele of the G894T polymorphism (0.478 and 0.485 in the parents and offspring subsamples, respectively) are among the highest so far described. Previous described frequencies range between 0.05 and 0.07 for Asian populations [Miyamoto et al., 1998; Yoon et al., 2000] and 0.31 and 0.37 for Caucasian populations [Markus et al., 1998; Hingorani et al., 1999], with a maximum value of 0.393 for the French population [Elbaz et al., 2000]. These data, jointly with the frequencies of 0.496 for a South Spanish population and 0.433 for a North Spanish sample (data from our laboratory), seem to indicate a north-to-south cline variation for the frequencies of this polymorphism that is paralleled by cardiovascular incidences but whose relationship has to be demonstrated.

REFERENCES

- Albright GL, Andreassi JL, Steiner SS. 1988. Interactive effects of type A personality and psychological and physical stressors on human cardiovascular functions. *Int J Psychophysiol* 6:315-326.
- Balligand JL, Cannon PJ. 1997. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1846-1858.
- Clayton D. 1999. A generalization of the transmission disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. *Am J Hum Genet* 65:1170-1177.
- Elbaz A, Poirier O, Moulin T, Chédru F, Cambien F, Amarengo P. 2000. Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. *Stroke* 31:1634-1639.
- Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. 2001. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu298 → Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276:26674-26679.
- Fichera LV, Andreassi JL. 1998. Stress and personality as factors in women's cardiovascular reactivity. *Int J Psychophysiol* 28:143-155.
- Friedman M, Rosenman R. 1959. Association of a specific overt behaviour pattern with increases in blood cholesterol, in blood clotting time, incidence of arcus senilis and clinical artery disease. *J Am Med Assoc* 169:1286-1296.
- Guzik TJ, Black E, West NEJ, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. 2001. Relationship between the G894T polymorphism (Glu298Asp variant) in endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated endothelial function in human atherosclerosis. *Am J Med Genet* 100:130-137.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. 1999. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298 → Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100:1515-1520.
- Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL. 1999. The relationships between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* 116:880-886.
- Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N, Yokota M. 1998. Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol* 81:83-86.
- Livshits G, Vaider M, Graff E, Blettner M, Schettler G, Brunner D. 1997. Tel-Aviv-Heidelberg three generation offspring study: genetic and environmental sources of variation and covariation among plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *Am J Hum Biol* 9:357-370.
- Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, Powell JF. 1998. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke* 29:1908-1911.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. 1998. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32:3-8.
- Nathan C, Xie Q. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-918.
- Norusis MJ. 1992. *SPSS Advanced Statistics*. Chicago: SPSS.

- Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB, Arvelier D, Luc G, Tiret L, Soubrier F, Cambien F. 1999. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene—no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest* 29:284–290.
- Qian HS, Neplioueva V, Shetty GA, Channon KM, George SE. 1999. Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 99:2979–2982.
- Rudic RD, Sessa WC. 1999. Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet* 64:673–677.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sham PC, Curtis D. 1995. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet* 59:323–336.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. 1993. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Gen* 52:506–516.
- Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. 2000. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2832–2835.
- Valveny N. 2000. Factors de risc genètics per a la Cardiopatia Isquèmica. Barcelona: Universitat de Barcelona. 348 p.
- Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DEL. 1996. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 2:41–45.
- Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DEL. 1997. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3147–3153.
- Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GAC, Trudinger B, Wang J. 2000. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 471:45–50.
- Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. 2000. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 46:1626–1630.
- Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS. 2000. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int* 57:405–413.

Molecular Variation in Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene (eNOS) in Western Mediterranean Populations

Marc Via¹, Emili González-Pérez¹, Esther Esteban¹, Antonio López-Alomar¹, Lucia Vacca², Giuseppe Vona², Jean Michel Dugoujon³, Nourdin Harich⁴ and Pedro Moral¹

¹ Department of Animal Biology-Anthropology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Department of Experimental Biology, Section of Anthropological Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy

³ Center of Anthropology, UMR 8555, CNRS, University Paul Sabatier, Toulouse, France

⁴ Department of Biology, University Chouaib-Doukkali, El Jadida, Morocco

ABSTRACT

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS or NOS3) is the main responsible for nitric oxide (NO) production in vascular system and different polymorphisms have been identified in epidemiological studies. Trying to test the eNOS genetic variation in general populations we studied the 27-bp VNTR in intron 4 and G894T substitution in exon 7 markers in 6 Western Mediterranean populations (3 from Iberian Peninsula, 1 from North Africa, and 2 from Sardinia) and a sample from Ivory Coast. The VNTR frequencies in Western Mediterranean and Ivory Coast fit well into the ranges previously described for Europeans and Sub-Saharanans respectively, and a typical African allele has been detected in polymorphic frequencies in the Berber sample. The G894T substitution presents the highest frequencies described for the T allele in the North Mediterranean populations. Linkage disequilibrium is present between both markers in all populations except in the Ivory Coast sample. The variation found for these polymorphisms indicates that they may be a useful tool for population studies even at microgeographical level.

Key words: eNOS, NOS3, nitric oxide, Mediterranean populations, haplotypes

Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule with important roles as a second messenger. All these actions are played by a single electron in its $2p-\pi$ antibonding orbital¹. In cardiac muscle and vessel endothelium, NO inhibits platelet aggregation, relaxes smooth vascular musculature, reduces monocyte adhesion to endothelium^{2,3}, and attenuates atherogenic processes⁴.

NO is endogenously produced by a family of three nitric oxide synthases (NOS). These enzymes are encoded by three different genes originated by duplications from a common ancestral gene⁵ and received their names in the order they were discovered: NOS1 (or nNOS), NOS2 (or iNOS), and NOS3 (or eNOS). Although they share the same functional domains, their cellular expression and regulation is different for each NOS isoform. The NOS isoform mostly involved in cardiovascular system regulation is NOS3, and is the one with a well-known endothelium vessel expression (that is why is so called eNOS or endothelial NOS).

eNOS gene maps in chromosome 7 (7q35–7q36) and expands 22 Kb containing 26 exons. Different polymorphisms have been described all over the sequence, but no populational study has been made on them. The two most well-known markers on eNOS gene are ecNOS4a/b and G894T. ecNOS4a/b is a 27-bp VNTR located in intron 4 with two main alleles called ecNOS4*a and ecNOS4*b (with 4 and 5 repeats of the consensus 27-bp sequence, respectively) and two rare alleles found only in African-origin samples called ecNOS*c and ecNOS4*y (with 6 and 3 repeats, respectively). The other polymorphism is the G894→T substitution in exon 7, leading to an aminoacidic substitution from glutamate to aspartate.

Previous studies performed on eNOS polymorphisms focused on possible asso-

ciations between them and many different diseases, most of them in the cardiovascular system (for a review, see Wang and Wang, 2000⁶). Moreover, the majority of these studies did not take into account the ethnical origin of their samples and only some of them considered the major origin of the individuals⁷ (Caucasians, African-Americans, or Asians).

In a previous study of our group⁸, frequencies for the G894T polymorphism in a Spanish population were significantly different from that described in other studies, except that published recently for an Italian population in an association study⁹. The samples used in these two studies belong to the same geographical area: the Mediterranean Basin. According to World Health Organization data, this area has one of the lowest cardiovascular disease incidences only comparable to far East populations (e. g. China and Japan) and the eNOS genetic variation in Mediterranean Basin has been scarcely investigated.

In this context, the aim of the present work is to explore variability in eNOS gene in a set of Western Mediterranean populations in order to analyze their genetic background and establish possible similarities among these populations.

Materials and Methods

Samples

A total of six Western Mediterranean populations were included in the present work. Three samples came from the Iberian Peninsula: one from Asturias (in the north, n=114), one from Center (n=120), and one from Andalusia (in the South, n=121). Two were from Sardinia: one from Nuoro (n=94) and one from Cabras (n=95). The last one was a Berber sample (n=120) from Khénifra in Morocco. As an outgroup, we analyzed a Sub-Saharan sample (n=112) from Ahizi, in Ivory Coast. All individuals were healthy blood donors

with the four grandparents coming from the same geographical area. They were also informed on the objectives of the study and written consent was obtained for all individuals.

Genetic and statistical analyses

Determination of both polymorphisms included amplification by a PCR procedure and run in a 2% agarose gel electrophoresis as described previously³. For the G894T marker, prior to electrophoresis a digestion with 4U of BanII enzyme was performed.

Genotypic frequencies for both polymorphisms were computed by SPSS version 10.0 for Windows¹⁰. Allelic frequencies, Hardy-Weinberg adjustment, linkage disequilibrium, and haplotypic frequencies were calculated by Arlequin version 2.000¹¹. Intrapopulation genetic variation, total gene diversities, and coefficients of gene differentiation were computed using the Genetix 4.02 software package.

Reynolds genetic distances between pairs of populations and neighbor joining trees were constructed using the PHYLIP 3.6 package¹². The topology was assessed through 1000 bootstrap iterations. A prin-

cipal components analysis (PCA) was performed using SPSS 10.0¹⁰ to assess genetic relationships between populations.

For the comparative purposes other data on control samples as those from Tanus-Santos et al.⁷, Salvarani et al.⁹, Miyamoto et al.¹³, Hibi et al.¹⁴, Yoon et al.¹⁵, Benjafield et al.¹⁶, and Pulkkinen et al.¹⁷ were included in some analyses.

Results

Allelic frequencies are shown in Table 1. In all populations, the most common allele for the 27-bp VNTR is ecNOS4*b, but its frequency ranges from 0.9121 (in the Cabras population) to 0.6116 (in Ivory Coast), showing lower values in the African samples (Ivory Coast and Berbers). The ecNOS4*c allele is present in polymorphic frequencies only in both African samples, although one individual from the Asturias sample was heterozygous for this allele. The ecNOS4*y allele was not present.

For the G894T substitution, frequencies for the T allele range from 0.5270 (in Nuoro) to 0.0759 (in Ivory Coast), showing the highest values in the North-Mediterranean populations.

TABLE 1
ALLELIC FREQUENCIES AND HARDY-WEINBERG PROBABILITIES FOR BOTH POLYMORPHISMS

	AST	CENT	AND	CABR	NUOR	BERB	IVOR
ecNOS4ab							
a	0.1409	0.1695	0.1154	0.0879	0.1351	0.1822	0.3571
b	0.8545	0.8305	0.8846	0.9121	0.8649	0.7944	0.6116
c	0.0045					0.0234	0.0313
HW p	0.1705	0.7424	0.6488	1.0000	0.1088	0.7193	0.7869
G894T							
G	0.5773	0.6441	0.5128	0.5055	0.4730	0.6355	0.9241
T	0.4227	0.3559	0.4872	0.4945	0.5270	0.3645	0.0759
HW p	0.0453	0.2313	0.2601	0.1456	0.0419	1.0000	0.4788

AST = Asturias; CENT = Center Spain; AND = Andalusia; CABR = Cabras; NUOR = Nuoro; BERB = Berbers from Khénifra; IVOR = Ivory Coast

TABLE 2
HAPLOTYPIC FREQUENCIES, LINKAGE DISEQUILIBRIUM PROBABILITY (P LD), LINKAGE DISEQUILIBRIUM COEFFICIENT (D'), AND TOTAL GENE DIVERSITY (GD)

	AST	CENT	AND	CABR	NUOR	BERB	IVOR
a-G	0.1152	0.1518	0.1027	0.0879	0.1013	0.1518	0.3571
a-T	0.0257	0.0177	0.0127		0.0338	0.0305	
b-G	0.4576	0.4923	0.4101	0.4176	0.3717	0.4604	0.5402
b-T	0.3970	0.3382	0.4745	0.4945	0.4932	0.3340	0.0714
c-G	0.0045					0.0234	0.0268
c-T							0.0045
D'	0.5814	0.7066	0.7741	1.0000	0.5253	0.5932	-
p LD	0.035	0.0072	0.0005	0.0005	0.0200	0.0218	0.1870
GD	0.6206	0.6226	0.5972	0.5765	0.6086	0.6516	0.5774

AST = Asturias; CENT = Center Spain; AND = Andalusia; CABR = Cabras; NUOR = Nuoro; BERB = Berbers from Khénifra; IVOR = Ivory Coast

For both markers, observed genotype values fitted well the expected frequencies under Hardy-Weinberg equilibrium assumptions with two minor exceptions for the G894T polymorphism, for which Asturias and Nuoro show probability values only slightly lower than 0.05 (0.0453 and 0.0419, respectively).

The most common haplotypes in all populations were b-G and b-T, except in the Ivory Coast sample, where b-G and a-G haplotypes presented the highest frequencies (see Table 2) as expected from both the low T and the high ecNOS4*a allele frequencies in this population.

Both polymorphisms showed linkage disequilibrium in all populations, except in the Ivory Coast sample (see Table 2). D' values range from 0.5253 (in Nuoro sample) to 1 (in Cabras sample).

Gene diversity was very similar in all populations, ranging from 0.6516 to 0.5765.

Intrapopulation genetic variation (Hs), total gene diversity (Ht), and coefficients of gene differentiation (Gst) are shown in Table 3. Ht for both markers is 0.397, and Gst is 0.0689. Ivory Coast population in-

crease the total value of Gst because of its differentiation from all other populations here analyzed. Gst calculated without the Ivory Coast sample decreases to 0.0111.

From genetic distances analysis, a neighbor-joining tree with the seven analyzed populations was constructed (Figure 1). All the Mediterranean populations were joined at one side of the tree with the two Sardinian populations in the same sub-branch, while Berbers were closer to the Sub-Saharan than any other Mediterranean population.

In order to get a more general genetic picture, distance analyses were repeated adding seven populations from which data on the two polymorphisms were avail-

TABLE 3
INTRAPOPULATION GENETIC VARIATION (Hs), TOTAL GENE DIVERSITY (Ht), AND COEFFICIENT OF GENE DIFFERENTIATION (Gst) FOR EACH POLYMORPHISM AND FOR BOTH TOGETHER

	Hs	Ht	Gst
ecNOS4a/b	0.3015	0.3181	0.0522
G894T	0.4379	0.4760	0.0800
Total	0.3697	0.3970	0.0689

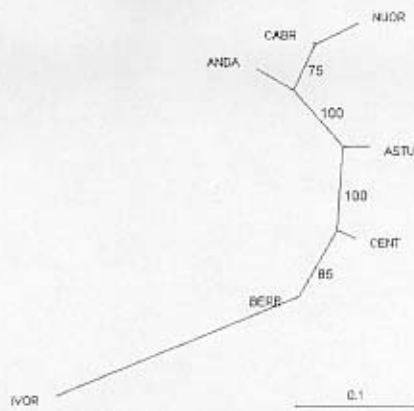


Fig. 1. Neighbor-joining tree of the seven analyzed populations. AST = Asturias; CENT = Center Spain; AND = Andalusia; CABR = Cabras; NUOR = Nuoro; BERB = Berbers from Khénifra; IVOR = Ivory Coast

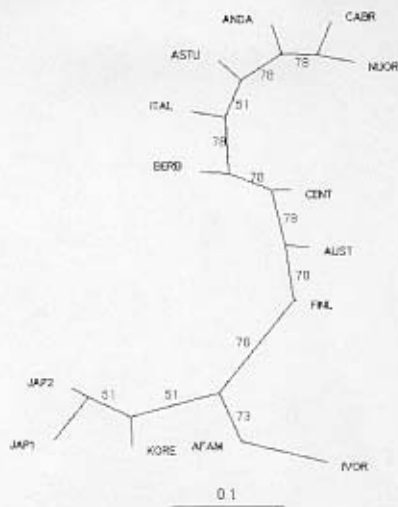


Fig. 2. Neighbor-joining tree of the seven analyzed populations together with seven populations taken from references. AST = Asturias; CENT = Center Spain; AND = Andalusia; CABR = Cabras; NUOR = Nuoro; BERB = Berbers from Khénifra; IVOR = Ivory Coast; ITAL = Italy; AUST = Australia; FINL = Finland; AFAM = African-Americans; KORE = Korea; JAP1 and JAP2 = Japan

able. These populations were: Italians⁹, African-Americans⁷, two Japanese populations from Kyoto¹³ and Kanagawa¹⁴, Koreans¹⁵, Australian Caucasians¹⁶, and Finnish¹⁷.

Population relationships among these populations are depicted in a neighbor-joining tree (Figure 2) and a PCA (Figure 3). Asian and Sub-Saharan populations appeared grouped in clearly particular clusters. European and North African samples were grouped together. PCA explained 85.803% of the total variation in allele frequencies for both markers and slight differences could be observed in the Europe/North-Africa cluster. North-Center European-origin populations (Australians and Finnish) are slightly separated from other samples and Berbers are slightly closer to African samples.

Discussion

The present study has examined the genetic distribution of the eNOS4a/b VNTR and the G894T substitution in the

eNOS gene in a set of six Mediterranean populations and in a Sub-Saharan population. These are the first genetic data on the populational variation of NO production genes. Our results are slightly different from that published for an epidemiological study in an Italian population⁹, where eNOS4*a allele was present in a frequency of 0.219, higher than any European Mediterranean population here analyzed. Furthermore, the present data confirm that eNOS4*c allele is only present in polymorphic frequencies in African-origin populations, as previously suggested in African-American populations in association studies^{7,18}.

By the other hand, G894T frequencies in all European populations here analyzed (with the exception of Center

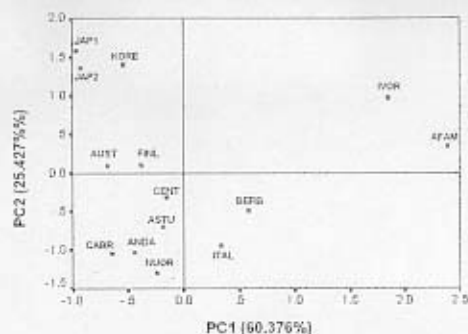


Fig. 3. Principal components analysis on fourteen populations.

AST = Asturias; CENT = Center Spain; AND = Andalusia; CARR = Cabras; NUOR = Nuoro; BERB = Berbers from Khénifra; IVOR = Ivory Coast; ITAL = Italy; AUSTR = Australia; FINL = Finland; AFAM = African-Americans; KORE = Korea; JAP1 and JAP2 = Japan

Spain) together with that previously described^{8,9} confirm that European Mediterranean populations show the highest T allele frequencies ever described.

Cabras (with the lowest frequency for ecNOS4*a allele) and Nuoro (with the lowest frequency for G allele) presented the extreme values in genetic variation. That might be related to the effect of geographical isolation.

Linkage disequilibrium between both markers was expectable as the two markers are separated only 1.8 Kb. Ivory Coast sample shows no linkage disequilibrium and this fact is in accordance with previous reports on the lack of linkage disequilibrium between some polymorphisms in African populations¹⁹. That is, it might be attributed to the constrictions in the recent settlement of Europe and the Mediterranean Basin²⁰.

As expected, each principal component (PC) correlate with the information

of each polymorphism, but PCA was performed in order to group the populations in a two-dimensional representation. Thus, PC1 resemble ecNOS4a/b variation and PC2 G894T variation with a correlation coefficient higher than 90%. PCA and neighbor-joining trees clearly differentiate Asian, Sub-Saharan, and European-Mediterranean populations in different clusters. In the Europe-Mediterranean cluster, two sub-groups can be observed: Northern-Central Europe origin, and Mediterranean populations.

PCA and neighbor-joining trees put Berber population together with the other Mediterranean populations with some trends towards Sub-Saharan origin populations. This might reflect a slight degree of genetic influence of Sub-Saharan populations in Berber genetic background.

As summary, the genetic variation showed in eNOS gene makes it a useful tool for populational studies, even at a microgeographical level. This variation is still poorly-known at population level, and further approaches should be done. Population studies on functional genes are showing an increasing importance in epidemiology and new disciplines, such as pharmacogenetics.

Acknowledgements

This work was supported by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica from Spain (PB98-1235-C3-01), the Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (2000 SGR00033) and the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (2001FI 00177 UB and 2002FI 00516 grant).

REFERENCES

1. STAMLER, J. S., D. J. SINGEL, J. LOSCALZO, Science, 258 (1992) 1898. — 2. BALLIGAND, J. L., P. J. CANNON, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17 (1997) 1846. — 3. RUDIC, R. D., W. C. SESSA, Am. J. Hum. Genet., 64 (1999) 673. — 4. QIAN, H. S., V. NEPLIOUEVA, G. A. SHETTY, K. M. CHANNON, S. E. GEORGE, Circulation, 99 (1999) 2979. — 5. NATHAN, C., Q. XIE, Cell, 78 (1994) 915. — 6. WANG, X. L., J. WANG, Mol. Genet. Metabol., 70 (2000) 241. — 7. TANUS-SANTOS, J. E., M. DESAI, D. A. FLOCKHART, Pharmacogenet., 11 (2001) 719. — 8. VIA, M., A. LÓPEZ-ALOMAR, N. VALVENY, E. GONZÁLEZ-PÉREZ, M. BAO, E. ESTEBAN, X. PINTÓ, E. DOMINGO, P. MORAL, Am. J. Med. Genet., 116A (2003) 243. — 9. SALVARANI, C., L. BOIARDI, B. CASALI, L. OLIVIERI, G. CIANCIO, F. CANTINI, F. SALVI, R. MALATESTA, M. GOVONI, F. TROTTA, D. FILIPPINI, G. PAOLAZZI, D. NICOLI, E. FARNETTI, P. MACCHIONI, J. Rheumatol., 29 (2002) 535. — 10. NORUSIS, M. J.: SPSS. Advanced Statistics. (SPSS, Chicago, 1992). — 11. SCHNEIDER, S., D. ROESSLI, L. EXCOFFIER: Arlequin, Ver. 2000: A software for population genetics data analysis. (Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000). — 12. FELSENSTEIN, J., Cladistics, 5 (1989) 164. — 13. MIYAMOTO, Y., Y. SAITO, N. KAJIYAMA, M. YOSHIMURA, Y. SHIMASAKI, M. NAKAYAMA, S. KAMITANI, M. HARADA, M. ISHIKAWA, K. KUWAHARA, E. OGAWA, I. HAMAKA, N. TAKAHASHI, T. KANESHIGE, H. TERAOKA, T. AKAMIZU, N. AZUMA, Y. YOSHIMASA, T. YOSHIMASA, H. ITOH, I. MASUDA, H. YASUE, K. NAKAO, Hypertension, 32 (1998) 3. — 14. HIBI, K., T. ISHIGAMI, K. TAMURA, S. MIZUSHIMA, N. NYUI, T. FUJITA, H. OCHIAI, M. KOSUGE, Y. WATANABE, Y. YOSHII, M. KIHARA, K. KIMURA, M. ISHII, S. UMEMURA, Hypertension, 32 (1998) 521. — 15. YOON, Y., J. SONG, S. H. HONG, J. Q. KIM, Clin. Chem., 46 (2000) 1626. — 16. BENJAFIELD, A. V., B. J. MORRIS, Am. J. Hypertens., 13 (2000) 994. — 17. PULKKINEN, A., L. VITANEN, A. KAREINEN, S. LEHTO, M. LAAKSO, Atherosclerosis, 151 (2000) 207. — 18. HOOPER, W. C., C. LALLY, H. AUSTIN, J. BENSON, A. DILLEY, N. K. WENGER, C. WHITSETT, P. RAWLINS, B. L. EVATT, Chest, 116 (1999) 880. — 19. TISHKOFF, S. A., E. DIETZSCH, W. SPEED, A. J. PAKSTIS, J. R. KIDD, K. CHEUNG, B. BONNÉ-TAMIR, A. S. SANTACHLARA-BENERECETTI, P. MORAL, M. KRINGS, S. PAABO, E. WATSON, N. RISCH, T. JENKINS, K. K. KIDD, Science, 271 (1996) 1380. — 20. SIMONI, L., P. GUERESI, D. PETTENER, G. BARBUJANI, Hum. Biol., 71 (1999) 399.

P. Moral

Division of Anthropology, Department of Animal Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

MOLEKULARNE VARIJACIJE U GENU ZA ENDOTELIJALNU SINTAZU DUŠIKOVOG OKSIDA U POPULACIJAMA ZAPADNOG MEDITERANA

SAŽETAK

Endotelijalna sintaza dušikovog oksida (eNOS ili NOS3) u najvećoj je mjeri odgovorna za proizvodnju dušikovog oksida (NO) u vaskularnom sustavu i različiti polimorfizmi identificirani su u epidemiološkim studijama. Cilj ove studije je testirati varijacije eNOS gena u općoj populaciji ispitivanjem VNTR-a veličine 27-pb u intronu 4 i G894T supstitucije u exonu 7, u 6 populacija zapadnog Mediterana (3 iz Iberijskog poluotoka, 1 iz sjeverne Afrike, 2 iz Sardinije) te u uzorku iz Obale slonovače. Učestalosti VNTR-a u zapadnom Mediteranu i Obali slonovače odgovaraju rasponima koji su već opisani za europske, odnosno, sub-saharske populacije, a tipičan afrički alel je pronađen s polimorfnom učestalošću u uzorku populacije Berbera. Supstitucija G894T

pokazala je najveće učestalosti opisane za T alel u populacijama sjevernog Mediterana. Disekvilibrij vezanosti gena prisutan je između oba biljega u svim populacijama osim u uzorku populacije Obale slonovače. Varijacija koja je nađena za te polimorfizme ukazuje kako bi oni mogli biti korisno oruđe u populacijskim studijama čak i na mikrozemljopisnoj razini.