



**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA ANIMAL  
UNITAT D'ANTROPOLOGIA**

PROGRAMA DE DOCTORAT BIOLOGIA ANIMAL II: ANTROPOLOGIA BIOLÒGICA (BIENNI 1997-1999)

**POLIMORFISMES EN GENS DE L'HEMOSTASI:  
ESTUDI POBLACIONAL EN LA MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL  
I ASSOCIACIÓ AMB RISC PER A LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

MEMÒRIA PRESENTADA PER  
**ANTONI LÓPEZ ALOMAR**  
PER A OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

AMB EL VIST I PLAU DE:

EL DIRECTOR DE LA TESI

**PEDRO MORAL CASTRILLO**

LA TUTORA,

**CLARA GARCÍA MORO**

Barcelona, Setembre 2002

Aquesta tesi ha estat elaborada gràcies al suport de:

*Generalitat de Catalunya*, beca de Formació d'Investigadors CIRIT (1998FI 00664).  
Gener 1998- Desembre 2001.

*Generalitat de Catalunya. Comissionat per a universitats i recerca, direcció de recerca.*  
"Grupo de biología de las poblaciones humanas" (1998SGR00129). 1998-2000.

*Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGYCIT).* "Variación genética  
en poblaciones de especial interés" (PB98-1235-C03-01). Diciembre 1999-Diciembre 2002.

*Generalitat de Catalunya. Comissionat per a universitats i recerca, direcció de recerca.*  
Títol: "Grupo de biología de las poblaciones humanas" (2000SGR00033). 2000-2002.

*A l'Adela, na Margarida i na Montserrat, les tres dones de la meva vida.*

*A la memòria de mon pare, en Carmelo.*



*"Klaatu, Barada, Niktu..."*

Ultimatum a la Tierra (*The day the Hearth stood still*)

Robert Wise (1951)

*"...E quan fo entre hora nona e vespres, enforti's la mar pel creixement del vent, e feu tanta de mar que en la terça part de la galea, de part de proa, que passava llassús l'aigua de les grans ondes de la mar quan venien. E quan venc que aquesta mar haguem correguda prop del vespre, ans que el sol se pongués, cessà lo vent; e al cessar que féu lo vent, veem l'illa de Mallorques, e destriam la Palomera et Sóller e Almeruig..."*

Jaume I (1208-1276), comte de Barcelona i rei d'Aragó, Mallorca i València. *Llibre dels Feits*, §56.



## AGRAÏMENTS

Al llarg de tot el temps que ha representat l'elaboració d'aquesta tesi que ara llegireu, a part d'aprendre els principis bàsics de l'investigació, he conegut un munt de persones de les que he après moltes coses. A estat una prova molt dura per a mi al llarg de la qual moltes vegades m'he fet el plantejament de començar de zero. Ara, estic molt satisfet d'haver acabat quelcom que ha costat tant d'esforç i a la vegada molt agraït amb les persones que d'una manera o d'altra hi han estat implicades. Elles també han fet un gran esforç per ajudar-me en aquesta tasca quasi faraònica. Així doncs, voldria mostrar el meu agraïment a les següents persones:

Al Pedro Moral, el meu "jefe", perquè sense ell aquesta tesi no hagués estat possible. A part de transmetre'm els seus coneixements com a bon mestre, en tot moment ha dipositat en mi la seva confiança i m'ha guiat pel difícil camí que ha representat aquest treball. Després de tot aquest temps és per a mi com un pare.

A la Neus Valveny, perquè ella ha estat una pionera de l'epidemiologia genètica aplicada a la cardiopatia isquèmica en el grup d'investigació del que formo part. Ella va ser la meva mestra al laboratori, amb la seva tesi va obrir camí al present treball, realitzant la tasca més feixuga de la recopilació de les mostres de famílies.

Al Marc Via, l'Emili González i l'Esther Esteban per ajudar-me en la correcció ortogràfica de la tesi i pels molts suggeriments que m'han fet per tal de que aquesta fos millor. També a la Clara García, la meva tutora de doctorat, pel seu ajut a l'hora de complementar dades de tipus demogràfic.

També he de mostrar el meu agraïment a persones que, encara que no han participat directament en l'elaboració d'aquesta tesi, m'han fet passar moltes bones estones, especialment a les sobretauls de la Unitat:

Al Marc, perquè gairebé vam entrar de la mà a la Unitat i vam acabar convertint-nos en una extranya parella de bessons-*freaks*, realment m'alegro d'haver-me topat amb tu a les escales aquell dia. Ell em va donar a conèixer el "corner" i a la gent que allí hi vivia, a la que també hi estic agraït, especialment a l'Alfred, la Tana, la Fanny, lo Miquel, l'Eva, la Silvia, l'Ares, el Jordi Sentias i la Magdala. A l'Emili pel seu especial sentit de l'humor i sobre tot el seu seny. A la Meritxell, que està a l'exili italià, perquè m'ha ensenyat que la fantasia no es perd al deixar enrera la infància. A l'Esther per intentar ensenyar-me maneres a taula. A la Neus perquè d'ella vaig aprendre que la persistència és molt important en el món de la investigació. A la Noelia, perdó, Natalia per recordar-me

pacientment el seu verdader nom. A la Mireia, el Joel, el Rolo, la Silvina i la Neus Martínez, els veïns del costat amb els que en lloc de julivert o sal ens intercanviem CDs. A les “*Lourdes girls*”, és a dir, la Blanca, la Barbara, la Bea, l'Araceli i la Mar per la seva comprensió i tolerància, especialment en els debats de després de dinar i al “*Lourdes boy*”, o sigui, en Sergi, per la seva complicitat en el mateix moment del dia i per haver compartit hores intempestives a la unitat. Als companys del fons del passadís, l'Eva per la seva simpatia i el Jordi Galvany per la seva rialla encomanadissa. També al Carles i l'Antonio pel seu sentit de l'humor tant esmolat. Als “*pares*” de tots plegats: el Pedro, la Clara, el Txomin, el Miquel, la Lourdes. A l'avi de tots plegats, el doctor Josep Pons, un incansable jovenet que supera els 80 anys d'edat. Als que viuen a l'estranger i que algun cop van compartir amb mi treball i/o oci com el Nourdin, el Mustafà, la Claire, l'Hervé, l'Estephane, la Lucia i l'Alessandra. Als companys que van marxar a la Pompeu: el Jordi Clarimón, el David, l'Anna, L'Helena i el Francesc. Als companys de psicologia: el David, la Mar i l'Imma.

Finalment voldria mostrar el meu agraïment a l'Adela, la dona a la que estimo, perquè ha estat sempre al meu costat, nit i dia (no exagero) donant-me ànims en els moments més baixos, sempre disposada a ajudar-me en el que fos per tal de que jo pogués acabar amb bon peu aquesta tesi. Ella és la gran dona que hi ha darrera d'aquest petit home que us escriu.



En el treball que es presenta a continuació es porta a terme l'anàlisi de la diversitat present en *loci* implicats en el procés de l'hemostasi per tal d'aprofitar els resultats obtinguts en dos camps ben diferents: l'epidemiologia genètica i la genètica de les poblacions humanes. Mitjançant l'epidemiologia genètica es pretén detectar factors de risc genètics implicats en la susceptibilitat per a la cardiopatia isquèmica. Dins del camp poblacional, es pretén analitzar, per primera vegada, la variació d'aquests marcadors en població general per a la seva aplicació a l'estudi de les relacions genètiques existents entre diverses poblacions de l'àrea mediterrània. Les dades poblacionals així obtingudes presentaran també un interès epidemiològic ja que aquesta regió geogràfica presenta una de les taxes de mortalitat més baixes per a aquesta malaltia conjuntament amb el centre-Est d'Àsia. Aquesta peculiaritat podria reflectir-se en una distribució de les freqüències dels polimorfismes estudiats diferent a la d'altres poblacions amb elevada incidència de la malaltia, com ara el Nord d'Europa o els Estats Units.

## **1. ASPECTE POBLACIONAL DE L'ESTUDI**

Els estudis sobre la diversitat genètica de les poblacions humanes van aparèixer amb la finalitat de ser una nova font de dades per a la reconstrucció de la història de les mateixes complementant la informació proporcionada per la paleontologia, l'arqueologia i la lingüística. Els primers estudis en aquest camp, basats en marcadors clàssics (grups sanguinis), ja van posar de manifest que al voltant d'un 85% de la diversitat genètica total es donava a nivell intrapoblacional, mentre que el 15% restant corresponia a la diversitat interpoblacional (Lewontin, 1972). Aquest resultat va ser confirmat anys després mitjançant marcadors d'ADN (Barbujani et al. 1997). Malgrat tot, la genètica de poblacions ha demostrat ser una eina útil en la investigació de les relacions interpoblacionals (Cavalli Sforza, 1997).

En la present tesi s'aporten noves dades genètiques sobre algunes poblacions de la Mediterrània Occidental. Per poder fonamentar una explicació dels resultats obtinguts en les anàlisis sobre les relacions genètiques entre elles cal tenir un previ coneixement de la seva història.

### **1.1. MARC HISTÒRIC I CULTURAL DE LA MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL**

Desde el punt de vista estrictament poblacional, l'àrea mediterrània ha vist néixer les primeres grans civilitzacions i probablement ha estat l'escenari de grans moviments migratoris com a conseqüència de grans revolucions culturals o invasions de caire bèl·lic que han pogut ésser rastrejades a nivell arqueològic.

*El Neolític.* Un dels primers aconteixements que podrien haver implicat moviments poblacionals va ser la revolució del Neolític. Es considera que aquesta revolució econòmica hauria arribat al Sud del continent Europeu cap al 6000 a. C. En la seva expansió, a més de la via terrestre, es considera que la via marítima va jugar un paper important escampant el Neolític desde la zona Occidental de la Península Balcànica a tota la Mediterrània Occidental. La rapidesa del procés de neolitització en aquesta regió geogràfica queda reflectida en la ràpida difusió desde la costa adriàtica dels Balcans fins a

la costa atlàntica de Portugal d'un tipus de ceràmica gravada anomenada ceràmica cardial. Al Nord d'Àfrica no existeixen restes de ceràmica cardial encara que si es troben altres tipus de ceràmica gravada d'aquesta època.

***El Calcolític.*** De la mateixa manera que l'agricultura i la ramaderia, els primers indicis de treball amb metalls apareixen a la regió de l'Orient Mitjà, on l'aparició del treball del coure i de l'or al 3er mil·lenni a. C. marca l'inici del període Calcolític. La seva difusió cap a Occident probablement va seguir les mateixes vies que el Neolític. Els primers indicis de metal·lúrgia del coure dins de la Mediterrània Occidental es detecten a Còrsega, Sardenya, Itàlia i Sud d'Espanya. Dos fenòmens de gran extensió podrien indicar moviments poblacionals a l'inici i a la fi d'aquest període: el moviment megalític i l'expansió del vas campaniforme. El moviment megalític, que es caracteritza per construccions realitzades a base de grans blocs de pedra i per la pràctica d'enterraments col·lectius, es troba representat a tota Europa Occidental incloent les illes Balears i Còrsega, Orient Mitjà i Nord d'Àfrica. La segona etapa del Calcolític dins de la Mediterrània Occidental està marcada per l'aparició d'un tipus característic de ceràmica constituïda per gerros en forma de campana invertida o vasos campaniformes i per la pràctica d'enterraments individuals. Són abundants les troballes de vasos campaniformes a la Península Ibèrica, el Sud de França i la vall del Rin; al Nord d'Àfrica només es troba al Marroc no trobant-se a Tunísia ni a Algèria central i oriental. L'origen del vas campaniforme és incert.

***L'Edat del Bronze.*** Aquest període va iniciar-se cap al 2500 a.C., també a l'Orient Mitjà, des d'on es va estendre cap al Nord (Caucas i Anatolia), Egipte, arxipèlag Egeu i Creta. És des d'aquesta darrera illa que es va escampar a tota l'Europa Occidental. Sembla que dins de la segona meitat del segon mil·lenni a.C. Creta perd la seva hegemonia en front de Micenes. En aquest moment, s'afegeix a l'agricultura una important indústria de caire artesanal que es difon per la Mediterrània gràcies a un intens intercanvi comercial i que fa que la influència de la civilització de Micenes es detecti fins i tot a Irlanda o als territoris germànics. Dins de la Península Ibèrica, el més important centre de l'Edat del Bronze va ser El Argar que va destacar per la metal·lúrgia de l'argent. En aquesta època es realitzaven enterraments individuals en grans gerros. Dins de les illes de la Mediterrània Occidental apareixen poblats fortificats amb torres generalment de planta circular a base de grans blocs de pedra representats per les construccions nuràgiques a Sardenya (1500 a.C.-238 a.C.), les torres i monuments megalítics a Còrsega (1800 a.C.-1500 a.C.) i els talaiots a

les illes Balears (1200 a.C.-800 a.C.). Aquests tipus de construccions recorden les presents en algunes illes de l'arxipèlag de les Cíclades.

Dins de l'Edat del Bronze es produeix també l'extensió de la civilització dels Camps d'Urnes, caracteritzada per l'incineració dels morts, a partir del Danubi mitjà cap a Bohèmia, Polònia, centre d'Alemanya, centre d'Itàlia, França Occidental i el Nord d'Espanya. Aquesta extensió ha estat associada a l'expansió dels pobles protoceltes. Els pobles celtes tindrien el seu origen al Sud d'Alemanya dins de l'Edat del Bronze, entre el 1800 i el 1600 a.C., època en la que van començar a envair Gran Bretanya.

A partir del 1200 a.C. es produeix un canvi radical dins de l'Edat del Bronze europea marcat per grans alteracions del món mediterrani, l'origen de les quals és probablement la caiguda dels imperis que s'havien desenvolupat a la Mediterrània Oriental d'entre els que destaca l'imperi de Micenes. En aquesta època, els fenicis van començar a controlar el comerç dins de la Mediterrània. Fenícia estava composta per ciutats-estat independents entre les que destacaven: Arados, Biblos, Sidon i Tir. Aquesta darrera va posseir l'hegemonia entre el 1000 i el 774 a.C. Malgrat tot, les ciutats fenícies van caure sota la influència assíria entre els segles VIII i VI a.C. Possiblement a causa de la pressió assíria, Tir va fundar Cartago l'any 814 a.C., que va exercir la seva hegemonia sobre tot el Sud de la Mediterrània Occidental, incloent el Nord d'Àfrica, el Sud de la Península Ibèrica, les illes Balears, Còrsega, Sardenya i part de Sicília.

**L'Edat del Ferro.** A partir del 800 a.C. s'instaura la 1a Edat del Ferro que dins d'Europa rep el nom d'Edat de *Hallstatt*. L'abundància de jaciments provoca el naixement de la metal·lúrgia del ferro que es va estendre per Croàcia, Bòsnia, Alemanya Occidental i el Nord d'Espanya. Durant aquesta època es produeix l'expansió de pobles de genets (escites, cimeris i tracis) procedents de les estepes Orientals que van exercir la seva influència sobre els pobles indígenes d'arreu d'Europa. Al segle VII a.C. apareixen els primers signes de la civilització dels íbers a la Península Ibèrica. Aquesta civilització de llengua no indoeuropea va conèixer el seu apogeu al segle VI a.C. i es va estendre fins al Llenguadoc jugant un paper important dins de la Mediterrània Occidental abans de la conquesta romana. L'any 750 a.C. una coalició de llatins i sabins va fundar Roma sota la influència etrusca. A partir d'aquest moment el territori sota la dominació romana no deixa de créixer per Europa i cap a Orient, sense arribar a ocupar plenament les regions del Nord, Gran Bretanya i els territoris de les tribus germàniques. Per tant, les poblacions de la Mediterrània Occidental cauen sota la dominació romana. En aquest moment, els bascos o

vascons son citats per primer cop per Saluste cap a l'any 40 a.C. Textos llatins posteriors confirmarien la seva presència fins a Aragó i Castella-Lleó.

Aquestes dades protohistòriques permetrien constatar el desenvolupament de civilitzacions de gran extensió dins Europa sota la influència de les civilitzacions de la Mediterrània. L'expansió d'aquestes cultures no ha d'haver-se acompanyat obligatòriament per moviments poblacionals importants. Dins de l'època històrica existeixen tres moviments que sí podrien haver modificat la composició genètica de les poblacions europees: les invasions cèltiques, les invasions de les tribus germàniques i la onquesta àrab al Sud del continent.

***Les invasions cèltiques.*** A partir del 450 a. C, es va desenvolupar a Europa la segona Edat del Ferro. En aquesta època una primera invasió procedent del Sud d'Alemanya i de l'Est de França va progressar per la vall del Roine, va atravesar els Alps i va penetrar a la vall del Po. Una primera colònia es va establir al Sud de Bolònia i als Apenins. Entre el 400 i el 300 a.C., una segona invasió cèltica, més important que la primera, pren possessió de la major part de la vall del Po. En aquest moment els celtes comencen a penetrar als Balcans i també penetren a França. A continuació es van produir dues onades successives d'invasions, una d'elles es va dirigir cap a la costa mediterrània de França, Espanya i Itàlia; i l'altra cap als Balcans i Orient Mitjà. La decadència dels celtes va començar al final del segle III a.C.

***Les invasions dels pobles germànics.*** Sota aquesta denominació s'engloven les invasions i migracions que es van escampar pel territori de l'Imperi Romà i dels seus estats successors a Europa i Nord d'Àfrica entre la fi del segle IV d.C. i la fi del segle VII d.C. Els pobles germànics van aparèixer a la fi del període Neolític i originalment habitaven el Sud d'Escandinàvia i Dinamarca. Dins dels grups germànics es poden distingir: els pobles germànics del Nord que van romandre a Escandinàvia; els grups germànics de l'Est (vàndals, burgundis i gots) i els grups germànics de l'Oest que inclouen els francs. Els grups germànics de l'Est van ser els que van portar a terme les grans migracions que van portar a la desaparició de l'Imperi Romà d'Occident per la seva substitució per reialmes germanics. Alguns d'aquest pobles van crear reialmes al Sud d'Europa. Les illes de la Mediterrània Occidental van caure sota el poder dels vàndals. Aquests darrers conjuntament amb els sueus i alans, van superar l'any 406 d. C. la frontera del Rin, van

atravessar França i Espanya i van crear al Nord d'Àfrica un reialme vàndal (429-507 d.C.) amb una flota que va dominar tota la Mediterrània Occidental. Per altra banda els visigots van fundar un reialme a Espanya (507-711 d.C.) i els ostrogots (493-553 d.C.) i els llombards (568-774 d.C.) ho van fer a Italia.

**La conquesta àrab.** La conquesta àrab del Sud d'Europa pot haver influenciat la composició genètica de les poblacions d'aquesta regió geogràfica. Són considerats com a àrabs només aquells pobles de parla àrab en els que es pot reconèixer un nexa històric amb els grups arabòfons de l'antiga Aràbia. Existeixen indicis de que la llengua àrab ja era parlada al segle IX a.C. al desert de Síria i al Nord-Est d'Aràbia. Els àrabs procedents d'aquesta regió s'haurien infiltrat fa molt temps cap a Egipte i Mesopotàmia, encara que la gran onada d'arabització es va produir a partir de les conquestes musulmanes. La conquesta del Magreb berber (647-700 d.C.) va precedir la conquesta de la Península Ibèrica entre el 711 i el 713 d.C., aprofitant la decadència visigòtica, i es va perllongar fins al 1492 amb la caiguda del reialme de Granada. Gairebé tota la Península va ser sotmesa i únicament la Serralada Cantàbrica i el Pirineus Occidentals van escapar a la invasió. La conquesta va ser realitzada sota el comandament militar àrab, però les tropes invasores estaven constituïdes fonamentalment per berbers islamitzats, coneguts sota el nom de "moros", reclutats al llarg del Magreb. Els musulmans "moros", que van conquerir les Balears l'any 902 no han de ser confosos amb els sarraïns, que van conquerir l'Itàlia peninsular, els Alps Occidentals i controlaven tota la mar Mediterrània entre el segle IX i X incloent Còrsega i Sardenya.

## **1.2. PROBLEMÀTIQUES PLANTEJADES SOBRE EL POBLAMENT HUMÀ DE LA MEDITERRÀNIA**

Els moviments poblacionals de l'home modern dins de l'àmbit geogràfic de la Mediterrània Occidental són objecte de discussió en la bibliografia. Gran part de la controversia es centra en el grau de fluxe gènic present entre les poblacions de la costa europea o Nord i les poblacions de la costa Sud o Nord-africana de la Mediterrània. En aquest últim grup de poblacions també es discuteix sobre el grau de fluxe genètic existent amb les poblacions de l'Àfrica Sud-sahariana.

Dins de l'àrea mediterrània dues barreres geogràfiques importants han condicionat una direcció Est-Oest del poblament humà: La mar Mediterrània que separa Àfrica d'Europa i el desert del Sàhara que separa el Nord d'Àfrica de l'Àfrica Sud-sahariana. Malgrat tot, aquests impediments per a les migracions humanes no tenen perquè haver estat infranquejables en el passat. Existeixen proves de que durant la primera meitat de l'Holocè predominava un clima humit a la regió del Sàhara que va afavorir l'aparició d'assentaments humans, encara que durant els darrers 5000 anys el Sahara ha sofert una gradual aridificació que l'ha portat a ser el desert que és actualment (Said i Faure, 1990). Pel que respecta a la Mar Mediterrània, aquesta només presenta una amplada de 15 km a l'Estret de Gibraltar i ambdues ribes son perfectament visibles desde l'oposada. Malgrat tot, existeixen fortes corrents marines que fan difícil la seva navegació.

Diversos estudis de genètica poblacional basats en STRs autosòmics (Bosch et al. 2000) en ADN mitocondrial (Rando et al. 1998) i en haplotips al cromosoma Y (Bosch et al. 1999) mostren una clara diferenciació entre les poblacions Nord-africanes i les de la Península Ibèrica, reconeixent en l'Estret de Gibraltar una barrera genètica important. Malgrat tot, els mateixos estudis, especialment els basats en STRs i en ADN mitocondrial detecten l'existència d'un petit flux gènic entre aquestes dues regions geogràfiques, especialment al Sud de la Península Ibèrica. Aquest fet confirmaria que durant el passat l'Estret de Gibraltar va esser atravesat, malgrat els perills que implicava la seva navegació, per un nombre considerable d'individus que van deixar el seu patrimoni genètic a la Península. Alguns autors creuen que aquest petit flux gènic es remontaria a l'època de la dominació àrab de la Península Ibèrica que, en el Sud de la mateixa, va durar gairebé 8 segles. Per d'altres autors, l'impacte genètic d'aquest aconteixement històric sobre les poblacions peninsulars va ser quasi inexistent (Hitti, 1990).

Per tal de buscar altres causes per les quals el flux genètic entre la Península Ibèrica i el Nord d'Àfrica sembla haver estat limitat, alguns autors suposen que el Neolític va implicar dues onades paral·leles d'expansió poblacional d'Est a Oest, una a cada banda de la Mediterrània. Aquest fet hauria causat una diferenciació genètica important entre les poblacions de la Península Ibèrica i les del Nord-Oest d'Àfrica. L'onada poblacional de la riba Nord hauria introduït a Europa les llengües indoeuropees, mentre que la de la riba Sud hauria introduït al Nord d'Àfrica les llengües afroasiàtiques. Aquesta diferència ha generat una barrera cultural que pot haver contribuït a l'aïllament genètic entre la Península i el Nord d'Àfrica (Renfrew, 1991; Barbujani 1994).

D'altra banda, la població basca ha mostrat en diversos estudis sobre marcadors autosòmics certa peculiaritat genètica respecte a la resta de poblacions europees (Bertranpetit i Cavalli-Sforza, 1991). Aquest fet ha estat interpretat com el producte de l'acció de la deriva genètica en una població que ha viscut aïllada en valls montanyoses durant llargs períodes de temps. Malgrat tot, hi ha autors que afirmen que la població basca actual representaria el darrer reducte de la població de la Península Ibèrica anterior a l'arribada de la suposada onada poblacional neolítica, i que a més tindria un origen comú a la població berber en base a que presenten freqüències similars en alguns haplotips del sistema HLA (Martínez Laso, 1995; Arnaiz Villena et al. 1995 i 1997). Aquest fet implicaria l'existència d'un flux poblacional molt anterior al Neolític a través de l'Estret de Gibraltar. Per a alguns autors, el Neolític va arribar al extrem Occidental de la Mediterrània, tant al Nord com al Sud de l'Estret de Gibraltar, com una transmissió cultural i no pas com un moviment poblacional.

Per últim, cal assenyalar que les dades genètiques confirmen l'existència de cert flux genètic continu entre l'Àfrica Sud-sahariana i l'Àfrica Nord-Occidental a través del desert del Sàhara (Lefranc et al. 1979; Rando et al. 1998). Aquest flux gènic ha generat una variació clinal d'influència genètica Sud-sahariana que és més intensa en la part Sud de l'Àfrica Nord-Occidental. Aquest fet pot haver contribuït a la diferenciació de la població Nord-africana respecte a la de la Península Ibèrica.



## 2. LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA

### 2.1. CONCEPTES GENERALS

Sota el nom de malaltia cardiovascular s'engloba un grup de patologies que poden tenir 3 orígens diferents: ateroscleròtic, infeccions i congènit.

La **cardiopatia isquèmica** (CAI) pertany al grup de malalties cardiovasculars d'origen ateroscleròtic, amb la particularitat d'afectar les artèries coronàries. Existeixen altres malalties amb el mateix origen però que afecten artèries localitzades a altres llocs de l'organisme (figura I.1).

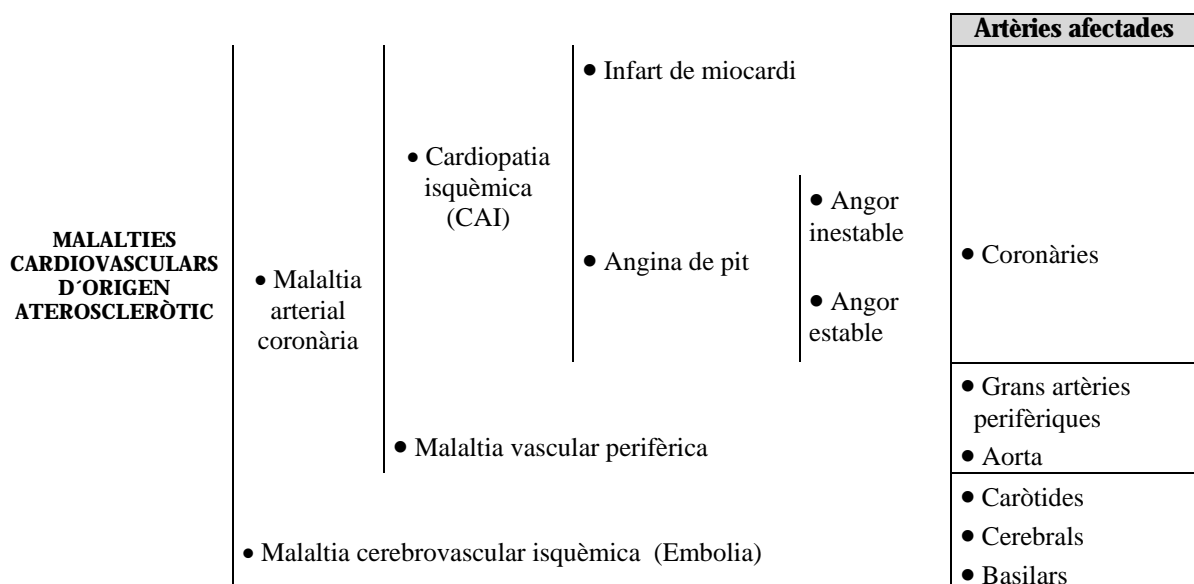
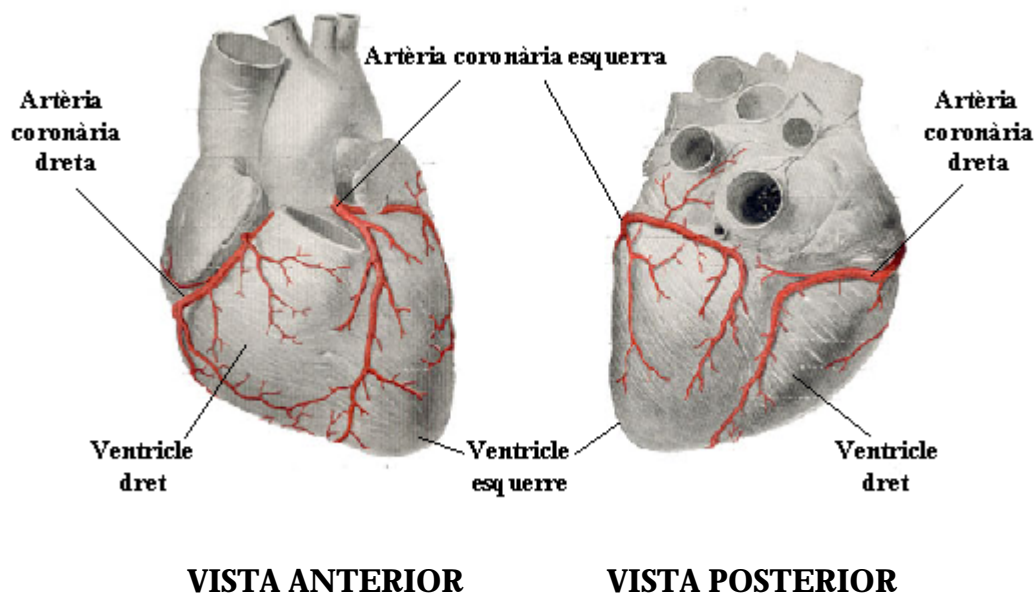


Figura I.1. Classificació de les malalties cardiovasculars d'origen ateroscleròtic.

L'**aterosclerosi**, procés que es troba en la base de totes aquestes manifestacions clíniques, es defineix com una lesió de l'arbre arterial que es localitza en gran part dins de la capa íntima de la paret de l'artèria. Formant part d'aquesta lesió es troben diversos tipus cel·lulars, d'entre els que destaquen cèl·lules musculars llises procedents de la capa mitja arterial, trobant-se també macromolècules, i acúmul de lípids i d'elements generats en processos d'alteració degenerativa com la necrosi cel·lular en el si de la lesió. Cal tenir en compte que el terme **aterosclerosi** (del grec *atero* = lípids i *sclero* = dur) no és sinònim del

terme **arteriosclerosi** (del grec *arterio* = artèria i *sclero* = dur). Arteriosclerosi és un terme més general que defineix totes aquelles lesions en les que es dona un engruiximent de la paret vascular. D'aquesta manera l'aterosclerosi és un tipus d'arteriosclerosi que es caracteritza per la proliferació de cèl·lules de múscul llis en les artèries musculars i elàstiques de mida mitjana i gran.

La **cardiopatia isquèmica** (CAI) es defineix estrictament com l'isquèmia del miocardi, és a dir, la manca (total o parcial) d'aport d'oxigen a la musculatura que constitueix el miocardi. Aquesta alteració és provocada fonamentalment per una disminució del fluxe sanguini a les artèries coronàries (figura I.2), 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.



*Figura I.2. Localització de les artèries coronàries al miocardi. Modificació a partir de Spalteholz (1965).*

Donat que l'aterosclerosi pot cursar assíptomàticament fins a estats molt avançats, en un estudi com el present, en el que es pretén investigar sobre algunes de les bases genètiques de la CAI, els individus afectats d'angina de pit o supervivents d'infart de miocardi són la mostra més adient.

**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 seu 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, aquesta afecta al 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 circumscribida 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, opressió 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 d'entre 1 i 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.
- Freqüent aparició d'un tercer i quart sorolls en l'auscultació i desdoblament del segon soroll, podent aparèixer els anomenats "soplos" 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 arteries coronàries. Aquesta estenosi ha d'ésser de més del 60% 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 classificacions; la més utilitzada a nivell clínic que té només en compte l'evolució del dolor en el temps, és la següent:

1) **Angina estable o crònica:** aquesta apareix com a conseqüència de l'activitat física o per un augment de la demanda miocàrdica d'oxigen. No presenta empitjorament en quant a freqüència o intensitat al llarg del darrer mes. Es subdivideix en quatre graus d'intensitat de menor (I) a major (IV) en funció de la limitació que produeix en l'activitat física del pacient. Presenta una mortalitat que oscil·la entre el 4 i el 20%, mentre que un terç dels afectats esdevenen assintomàtics.

2) **Angina inestable o evolutiva:** aquesta apareix com a conseqüència de l'activitat física o per un augment en la demanda miocàrdica d'oxigen i, a més, presenta empitjorament en quant a freqüència o intensitat al llarg del darrer mes o quan encara no

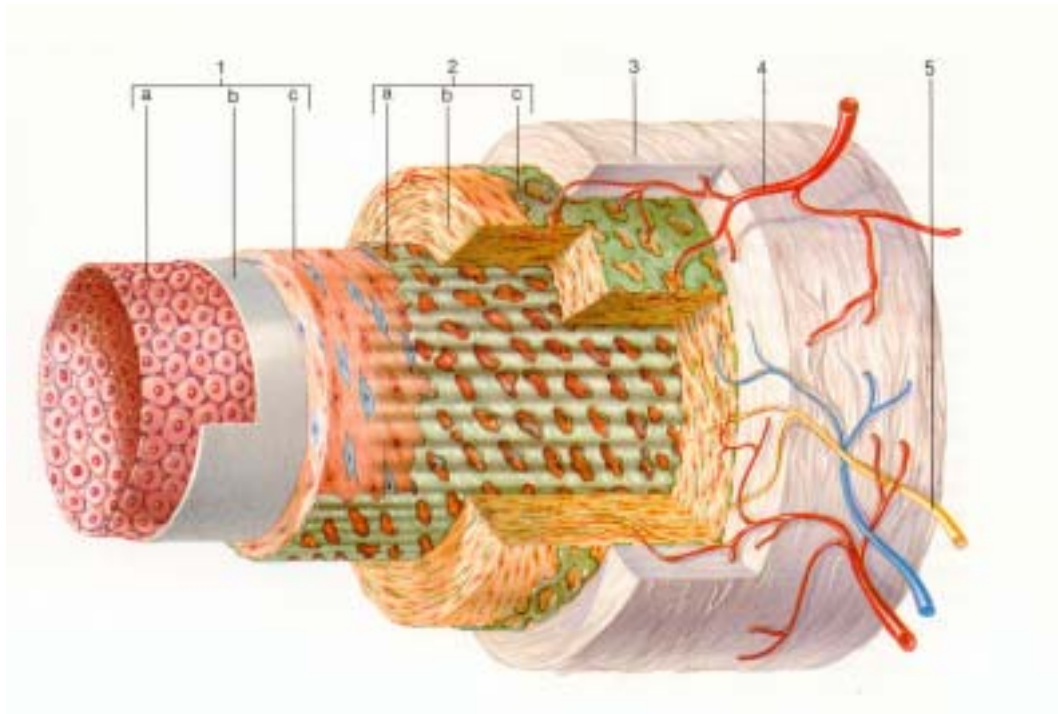
ha transcorregut un mes des de la seva primera aparició. Aquesta denominació inclou també l'angina que es produeix espontàniament, sense relació aparent amb canvis en el consum d'oxigen miocàrdic. En el transcurs d'un any entre un 15 i un 25% dels afectats pateixen un infart de miocardi i entre un 8 i un 20% moren.

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%.

## **2.2. FISIOPATOLOGIA DE LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

La malaltia ateroscleròtica afecta principalment artèries de calibre mitjà, com les coronàries, caròtides, renals, basilar, cerebrals i l'aorta. En la figura I.3 es mostra l'estructura d'una artèria coronària normal. 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 de les artèries i té funcions molt importants: a) manté l'equilibri dinàmic trombotic-antitrombotic ja que segrega antiagregants plaquetaris i molècules que inhibeixen les cascades de coagulació, però també pot desencadenar una resposta protrombòtica activa; b) impedeix l'adhesió de leucòcits i trombòcits; c) constitueix una barrera de permeabilitat que controla l'intercanvi de nutrients sang-teixits; d) controla el to arterial mitjançant la formació de substàncies vasodilatadores o vasoconstrictores; 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.

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



*Figura I.3. Estructura d'una artèria coronària. Extret de Tomàs i Domingo (1990).  
1. Túnica íntima: 1a. endoteli (cèl·lules epitelials); 1b. membrana basal; 1c. làmina pròpia (fibres elàstiques longitudinals). 2. Túnica mitja o groga: 2a. membrana elàstica interna; 2b. fibres musculars i elàstiques transversals; 2c. membrana elàstica externa. 3. Túnica adventícia; 4. Vasa vasorum; 5. Nervi simpàtic.*

## **A. HIPÒTESI DE L'ATEROGÈNESI DE RESPOSTA A UNA LESIÓ**

Aquesta hipòtesi va ésser formulada per Ross i Glomset (1973) basant-se en la idea de que alguna forma de lesió de la paret arterial podria jugar 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'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 la capa mitja arterial. Segons aquesta hipòtesi en el desenvolupament d'una lesió ateroscleròtica tindrien lloc de manera consecutiva els següents processos fisiològics:

1) **Lesió a l'endoteli vascular.** En determinades circumstàncies poden originar-se lesions a l'endoteli. Aquestes lesions s'originen especialment en llocs de fluxe turbulent de la sang, es a dir, en les bifurcacions i en les vies de fluxe de sortida de la sang en les artèries musculars mitjanes o grans i també a l'aorta. Aquest procés es veu potenciat per factors metabòlics (hiperlipidèmia), mecànics (hipertensió), immunològics (dipòsit d'immunocomplexes) i químics (monòxid de carboni, nicotina) entre d'altres. Aquestes lesions es revestiran per una monocapa o una bicapa de trombòcits sense arribar a constituir un trombe.

2) **Acúmulo de lípids i macròfags 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 l'endoteli sobre 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, les quals 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 de grumolls de monòcits i limfòcits que comencen a migrar 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 unes molècules per l'adhesió de leucòcits anomenades ATERO-ELAM, en aquesta situació les LDLox actuen com agents quimiotàctics. Una altra font de molècules quimiotàctiques i adhesives són els trombòcits que s'havien dipositat en la lesió arterial agregant-se i formant microtrombes.

3) **Resposta inflamatòria i proliferació cel·lular.** Els monòcits que han entrat a dins de la lesió s'activen a macròfags, aleshores expresen gens que codifiquen per citokines i molècules estimuladores i inhibidores del creixement (PDGF, IL-1, TNF- $\alpha$ , etc.). Aquestes substàncies poden estimular a les cèl·lules de múscul llis a canviar de fenotip passant a ser cèl·lules que migren i proliferen. A més, els macròfags actuen com a cèl·lules depuradores endocitant LDLox a través de receptors de LDLox o receptors *scavenger*, com a conseqüència es transformen en cèl·lules escumoses amb un alt contingut lipídic intracel·lular.

4) **Resposta fibroproliferativa.** Els macròfags, que han estat endocitant LDLox i restes derivades de la mort cel·lular, intenten tornar 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, quan aquesta circumstància es dona en branques i bifurcacions amb fluxe sanguini irregular pot provocar la formació de trombes murals de trombòcits (figura I.4). Aquets trombòcits són una nova font de molècules reguladores del creixement cel·lular. A més, en agregar-se sobre els macròfags o cèl·lules escumoses que han quedat exposats poden arribar a provocar la desgranulació d'aquestes cèl·lules alliberant el seu contingut. En aquest moment s'estableix una xarxa intercel·lular que enllaça macròfags, limfòcits T, cèl·lules de múscul llis i cèl·lules endotelials, ara la lesió inicial de l'artèria ha generat ja una resposta inflamatòria especialitzada i crònica. A partir d'aquest moment, en aquells individus que presentin de manera crònica factors genètics o ambientals de risc, la inflamació persisteix i produeix un efecte tòxic en les cèl·lules de l'artèria. Com a conseqüència es genera una resposta fibroproliferativa per emmurallar la lesió, per aquesta raó la placa creix i progressa cap a una lesió fibrosa. Si aquesta resposta inflamatòria-fibroproliferativa, en principi protectora, és excessiva pot culminar en una lesió oclusiva amb greus conseqüències clíniques. Malgrat tot, la presència de factors protectors o l'eliminació d'agents nocius pot donar lloc a la regressió o fins i tot la desaparició de la placa.



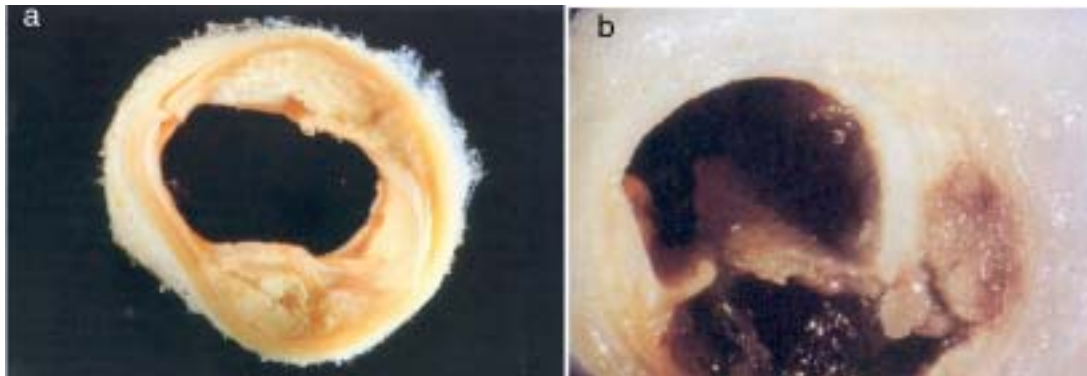
*Figura I.4. Micrografia electrònica de la superfície d'una lesió arterial en la que s'observen macròfags recoberts d'agregats plaquetaris. Imatge extreta de Haber (1998).*



## B. CLASSIFICACIÓ DELS TIPUS DE LESIÓ EN L'ATEROSCLEROSI

El fet de que el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques sigui progressiu ha fet que es puguin realitzar classificacions en les que es distingeixen diferents estadis d'evolució en les mateixes. La nomenclatura establerta per l'*American Heart Association Committee on Vascular Lesions* (Stary, 1992) estableix 8 tipus de lesions:

- **Lesions tipus I.** Presència de monòcits-macròfags adherits a l'íntima arterial. Són el símptoma més primerenc de lesió ateroscleròtica.
- **Lesions tipus II.** Apareixen en la pubertat, es localitzen amb freqüència a les ramificacions i bifurcacions aòrtiques. A nivell macroscòpic tenen color groguenc i una disposició longitudinal. Microscòpicament estan constituïdes per un acúmul subendotelial de cèl·lules escumoses. També se les coneix amb el nom d'estries grasses.
- **Lesions tipus III.** S'observa material lipídic extracel·lular finament dispers que envolta els tipus cel·lulars presents en la lesió, principalment cèl·lules musculars llises.
- **Lesions tipus IV.** L'acumulació lipídica extracel·lular forma un nucli que desplaça a les cèl·lules normals i els components de la matriu extracel·lular.
- **Lesions tipus VA.** En aquest estadi el nucli lipídic, constituït especialment per èsters de colesterol, queda envoltat per una fina coberta fibrosa constituïda per col·làgen i fibres elàstiques. A més s'observa una matriu extracel·lular formada per glucoproteïnes. Aquest tipus de lesió és observable cap als 30 anys d'edat.
- **Lesions tipus VB.** Representen la progressió en el temps de les lesions IV i VA, presenten una major quantitat de col·lagen essent més estenòtiques i fibròtiques.
- **Lesions tipus VC.** En aquesta etapa les plaques adquireixen una duresa màxima ja que es calcifiquen i augmenten encara més la quantitat de col·lagen en la matriu extracel·lular.
- **Lesions tipus VI.** Són les responsables dels síndromes coronaris aguts. També reben el nom de plaques complicades, es caracteritzen per l'alteració de la placa ateroscleròtica a causa d'un esquinçament, hemorràgia, ulceració o trombosi (figura I.5). Aquestes alteracions originen un trombe que pot obstruir directament l'artèria (lesions tipus VI oclusives), o quedar enganxat a la paret sense interrompre completament el fluxe del vas (lesions de tipus VI no oclusives), en aquest cas, aquest trombe mural pot progressar silenciosament i fer que la lesió evolucioni cap a tipus VB i VC, tipus aquests més estenòtics i oclusivo-trombòtics.



*Figura 1.5. Plaques d'ateroma. a.: Secció transversal d'aorta parcialment obstruïda per plaques d'ateroma. Imatge extreta de Tomàs i Domingo (1990). b: Secció transversal d'una artèria coronària en la que una placa complicada s'ha trencat. S'ha format un trombe en el si de la lesió que encara no s'ha extès a la llum del vas. Imatge extreta de Haber (1998).*

Cal tenir en compte que les estries grasses constitueixen un procés defensiu de la paret arterial que podria protegir-la dels efectes citotòxics de les LDLox. No totes les estries grasses evolucionen cap a una forma de lesió més avançada. Aquesta evolució estaria condicionada a l'existència d'un o més factors de risc que determinarien una progressió de les estries grasses cap a lesions amb simptomatologia clínica.

### **2.3. FACTORS DE RISC PER A LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

Un **factor de risc** és qualsevol característica o tret mesurable d'un individu que prediu la probabilitat individual de manifestar clínicament una malaltia. La cardiopatia isquèmica és una malaltia complexa, que presenta clars components genètics i ambientals al seu origen. Per tant, conceptualment podem considerar dos grans grups d'agents participants en l'etiologia de la malaltia: els **factors ambientals** i els **factors genètics**.

Donat el perill que començava a representar cap als anys cinquanta la malaltia cardiovascular, especialment en els països desenvolupats on ja s'havia donat la transició epidemiològica, 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 l'Estudi Framingham (Kannel et al.1988) i el *Seven Countries Study* (Keys et al. 1986).

Els factors ambientals es troben molt més ben definits 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, alguns d'ells encara per descobrir.

A nivell mèdic i preventiu, els factors de risc de la malaltia són valorats des del punt de vista de la capacitat de poder modificar-los i d'aquesta manera poder atenuar les manifestacions clíniques de la CAI. Així doncs, es parla de **factors de risc no modificables** i **factors de risc potencialment modificables**.

## A. FACTORS DE RISC NO MODIFICABLES

1) **Edat**. La incidència de la CAI comença a augmentar en els homes de 35 a 44 anys i en les dones aquest augment es dona deu anys més tard. A partir d'aquest moment segueix incrementant-se de manera continuada (Kannel et al, 1988).

2) **Sexe**. El sexe masculí presenta una major predisposició per la CAI. Aquest fet és atribuït a l'absència en els homes del paper potencialment protector dels estrògens. Aquest fet es demostraria per la desaparició de les diferències en la incidència observada a partir del moment en que les dones entren en la menopausa.

3) **Antecedents familiars**. És una mesura indirecta dels factors genètics d'herència complexa i desconeguda implicats en la malaltia. La història familiar de cardiopatia coronària, especialment per una edat d'inici precoç (< de 55 anys en homes i < de 65 anys per dones) és un important element de predicció del risc per la CAI.

## B. FACTORS DE RISC MODIFICABLES

Una part d'aquest tipus de factors de risc són paràmetres fisiològics mesurables dels individus com per exemple la pressió sanguínea, els nivells de colesterol, etc. Aquests paràmetres actuen com a indicadors dels factors genètics i ambientals ja que són el reflexe de la interacció entre aquests dos tipus de factors. Cal tenir en compte que aquests factors de risc són modificables en funció del percentatge de variació residual no explicat per l'herència familiar.

1) **Tabaquisme.** El consum de tabac incrementa el risc de totes les manifestacions clíniques de la CAI excepte l'angina de pit. El risc relatiu incrementa en funció del número de cigarrets fumats. En el cas particular de les dones fumadores de més de 25 cigarretes al dia que, a més, prenen anticonceptius orals el risc relatiu es veu incrementat fins a 39. Existeixen diversos mecanismes a través dels quals el tabaquisme augmenta el risc de la CAI, entre els quals trobem una davallada dels nivells d' HDL colesterol (HDL-C), augment dels nivells de carboxihemoglobina, increment de l'agregabilitat plaquetària com a conseqüència de la pujada dels nivells plasmàtics de fibrinogen. De forma aguda el tabaquisme també provoca un increment en la concentració de t-PA (activador tisular del plasminogen).

2) **Dieta.** Esdevé un factor de risc per la CAI ja que certs components de la mateixa són capaços de condicionar els nivells plasmàtics de colesterol, encara que no d'una forma total ja que prop del 50% d'aquests nivells respon a components hereditaris. Els components de la dieta que més influència tenen sobre els nivells plasmàtics de lípids i sobre el risc de CAI són els àcids grassos i l'alcohol. El percentatge de calories totals consumides en forma d'àcids grassos saturats és un indicador fonamental de risc per a la CAI (Keys et al, 1986). Aquests són d'origen animal, essent els àcids làuric, mirístic i palmític els principals àcids grassos implicats en l'augment del colesterol. Els àcids grassos poliinsaturats es troben al peix i cal destacar els  $\omega$ -3, ja que se'ls atribueixen efectes que redueixen el risc per la CAI. S'ha observat que la substitució de greix saturat per greix monoinsaturat redueix la concentració plasmàtica de colesterol (Keys et al. 1986). El principal àcid gras monoinsaturat és l'àcid oleic de presència quasi

exclusiva en l'oli d'oliva. Pel que respecta a l'alcohol, un consum moderat d'alcohol sembla disminuir la incidència de la CAI (Hegsted i Ausman, 1988).

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

4) **Sedentarisme.** S'ha observat un paper protector de l'activitat física sobre la cardiopatia coronària, especialment en homes (Paffenbarger i Hale, 1975). L'activitat física moderada incrementa els nivells d'HDL-C i redueix la pressió sanguínea, el pes corporal i la resistència a l'insulina, millorant a més l'eficiència cardíaca. A través de tots aquests mecanismes l'activitat física pot reduir el risc de CAI.

5) **Utilització d'anticonceptius orals.** L'ús d'anticonceptius orals multiplica per 2 ó 3 cops la freqüència d'infart de miocardi entre les dones que els prenen. Aquest risc incrementa molt en dones de més de 40 anys o en dones de més de 30 anys que a més són fumadores, pateixen hipertensió o presenten elevats nivells de colesterol plasmàtic.

6) **Hipertensió.** La hipertensió entesa com una elevació crònica de la pressió sistòlica (igual o superior a 160 mm Hg), la diastòlica (igual o superior a 95 mm Hg) o ambdues, és una malaltia crònica molt comuna a tots els països desenvolupats, amb una prevalença propera al 20%. El risc relatiu per als hipertensos en relació amb els normotensos és de 2.56. La hiperplàsia de la musculatura llisa vascular estimulada per l'increment de la tensió de la paret, i les lesions induïdes en les cèl·lules endotelials són els dos possibles mecanismes mitjançant els quals la hipertensió seria capaç d'induir aterogènesi.

7) **Diabetes.** La malaltia cardiovascular és la major causa de mort en diabètics. Encara que no s'ha probat que una reducció del nivell de glucèmia per si sola disminueixi el risc, cal controlar aquest paràmetre en els individus afectats per aquest trastorn 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.

8) **Colesterol en sèrum.** El 50% de la variació interindividual pels nivells sèrics de colesterol correspon a factors genètics (Sing i Orr, 1978), la resta ve determinada per factors ambientals com la dieta, el tabaquisme o l'estrès. Cal tenir en compte que el colesterol sèric total pot ser dividit en dues fraccions en funció de la lipoproteïna que el transporta. Així es distingeix entre el colesterol transportat per LDLs o LDL-C (LDL colesterol) i el que és transportat per les HDLs o HDL-C (HDL colesterol). Mentre que el LDL-C es correlaciona positivament amb la CAI, el HDL-C ho fa negativament. Aquesta associació es fonamenta en la capacitat que presenten les LDLs de lesionar l'endoteli vascular quan són oxidades.

9) **Triglicèrids.** El paper dels triglicèrids com a factor de risc per la CAI és incert donada la gran variabilitat horària i diària de la seva concentració en el sèrum. Cal destacar també, les correlacions que han estat observades entre els nivells sèrics de triglicèrids i les concentracions plasmàtiques de factor VII de la coagulació i de l'inhibidor tipus 1 de l'activador del plasminogen (PAI-1).

10) **Lipoproteïna (a).** Uns nivells elevats de lipoproteïna (a) impliquen un risc relatiu de 2 ó 3 per a la CAI i la malaltia cerebrovascular. Aquesta associació amb la CAI és independent dels nivells plasmàtics de LDL-C. S'ha suggerit que el mecanisme a través del qual la lipoproteïna (a) afavoriria el desenvolupament d'ateromes en trobar-se a concentracions elevades és la interferència en el procés de fibrinolisi que causaria donada la seva homologia estructural amb el plasminogen. Aquest mecanisme serà comentat més endavant.

11) **Fibrinogen.** Els nivells plasmàtics elevats de fibrinogen han estat associats, amb independència d'altres factors, amb el risc per al desenvolupament de la CAI. Existeixen molts mecanismes fisiopatològics a través dels quals es pot explicar aquesta associació. Aquests mecanismes s'exposen de forma extensa més endavant en aquesta introducció.

12) **Homocisteïna.** La variació normal en els nivells plasmàtics d'aquest aminoàcid derivat de la desmetilació de la metionina 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.

13) **Obesitat.** L'obesitat, entesa com un sobrepès de més del 20% sobre l'estimació del pes adequat, confereix un risc relatiu de 1.97 de patir CAI. Si bé l'obesitat representa una sobrecàrrega hemodinàmica pel cor, aquesta es presenta amb anomalies metabòliques associades com hiperinsulinisme, dislipèmies i hipertensió que podrien ser les autèntiques responsables del risc cardiovascular que representa. D'altra banda sembla que la distribució del teixit adipós en el cos, mesurada com la relació entre el perímetre abdominal i el perímetre a l'alçada de la cintura pèlvica, és més indicativa que la pròpia obesitat.

## **2.4. EPIDEMIOLOGIA DE LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

Actualment, en els països desenvolupats 1 de cada 3 homes i 1 de cada 10 dones desenvolupa una malaltia cardiovascular important abans d'arribar als 60 anys. Aquestes malalties comencen a ser una important causa de mort a partir de l'edat de 40 anys en homes i de 64 anys en dones, representant el 70% de totes les morts a partir dels 75 anys en ambdós sexes.

Els grans estudis epidemiològics, realitzats majoritàriament als Estats Units, han permès conèixer en detall la morbiditat, la incidència i la prevalència de la malaltia. Per exemple, en l'Estudi Framingham (Kannel et al. 1988) es va constatar respecte a la **morbiditat**, que en els homes la taxa mitja anual comença a incrementar-se a partir dels 35-44 anys, fent-ho 10 anys més tard en les dones. Aquesta diferència entre els sexes disminueix amb l'edat. També es va observar que en persones menors de 75 anys la cardiopatia coronària representa quasi els dos terços del total de les malalties cardiovasculars i que, dins d'aquestes, la proporció de CAI disminueix amb l'edat en favor d'un augment de la malaltia cerebrovascular i la insuficiència coronària.

Pel que fa a la **prevalença**, l'any 1989 va ser del 3% en la població dels Estats Units. Si considerem només els homes, aquest porcentage s'incrementa fins el 8.6% entre els 45 i 64 anys i fins el 16.9% a partir dels 65 anys. Els valors per a dones dins dels mateixos

Polimorfismes en gens de l'hemostasi

intervals d'edat són de 2.6% i 11.3% respectivament (National Center for Health Statistics, 1990).



La **incidència** de la CAI, presenta un enderriment de 10 anys en les dones respecte als homes (i fins a 20 anys en el cas concret de l'infart de miocardi). La forma d'inici més comuna de les manifestacions clíniques de la CAI entre les dones és l'angina de pit, mentre que en els homes és més freqüent un inici en forma d'infart de miocardi (Kannel et al. 1988). Un terç dels infarts de miocardi no són reconeguts com a tals. D'aquests la meitat són silencis.

Les malalties cardiovasculars són la primera causa de **mortalitat** en els països desenvolupats. Malgrat tot, aixó no ha estat sempre així, a principis del segle XX les malalties infeccioses encara eren la principal causa de mortalitat en països com els Estats Units. La transició epidemiològica, produïda fonamentalment per l'utilització d'antibiòtics, va fer que, en el mateix país l'any 1940, les malalties cardiovasculars i el càncer passessin a ser la primera causa de mort. Des d'aquell moment fins a l'actualitat la taxa de mortalitat per malalties cardiovasculars ha evolucionat. Durant la primera meitat del segle XX aquesta taxa va anar creixent fins a arribar a un màxim que als Estats Units es va produir l'any 1963 amb 400 morts/100.000 habitants-any. A partir d'aquell moment ha disminuït de manera progressiva i constant. En el cas d'Espanya el pic màxim de mortalitat per malalties cardiovasculars va tenir lloc durant la dècada dels setanta, iniciant-se l'any 1980 la davallada en la incidència de la CAI.

En la distribució de les taxes de mortalitat per CAI a nivell mundial, països de 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 i Japó). Les taxes de mortalitat estandaritzades per CAI expressades en número de defuncions/100.000 habitants per l'any 1992 van assolir valors per sota de 100 en el cas d'Espanya, França, Japó i Xina essent lleugerament superiors a aquest valor les taxes presentades per Itàlia i Grècia (WHO, 1994). Aquests valors són baixos si tenim en compte que països del Nord i Est d'Europa així com els Estats Units i Canadà presenten valors per aquestes taxes estandaritzades que s'apropen o superen amb escreix les 200 defuncions/100.000 habitants l'any 1992. Malauradament, en l'actualitat es coneixen poques dades d'incidència de cardiopatia isquèmica en grans zones mundials com són tot el continent africà i gran part del continent asiàtic. La poca informació disponible sobre el continent africà, però, sembla indicar que la mortalitat per aquesta malaltia és molt baixa (Muna, 1993). Concretament, l'any 1990 van morir a l'Àfrica Sud-sahariana 815.000 persones per alteracions cardiovasculars, mentre que en el mateix any van morir 3.175.000

persones, per la mateixa raó, al conjunt de països coneguts com d'economia de mercat establerta (Murray i López, 1997).

Múltiples investigacions han intentat esbrinar quins factors protectors, ja siguin ambientals o genètics, presenten les poblacions de la zona mediterrània i del centre-Est asiàtic. Sembla ser que la dieta juga un paper important. En aquest aspecte cal destacar el *Seven Countries Study* (Keys et al. 1986). En aquest estudi es van descobrir per primera vegada els efectes beneficiosos de l'anomenada dieta mediterrània i dels àcids grassos monoinsaturats de l'oli d'oliva. En el cas de França, però, es dona l'anomenada "paradoxa francesa" ja que és un país amb una baixa taxa de mortalitat per CAI que no presenta la dieta mediterrània protectora. Pel que fa als països de la zona centre-Est d'Àsia, el Japó és un gran consumidor de peix, aliment que conté àcids grassos  $\omega$ -3, i a la Xina el consum d'àcids grassos saturats és dels més baixos del món. Ambdós fets han demostrat tenir un efecte protector davant l'aterosclerosi.

Per altra banda, cal pensar també en l'existència d'un rerafons genètic protector en els grups poblacionals esmentats que es suma a les diferències ambientals o dietètiques i que contribuiria a explicar les diferents incidències de la malaltia. Aquest fet es posa especialment de manifest quan s'estudien taxes de mortalitat d'emigrants d'una població de baix risc cap a una població considerada d'alt risc. Normalment s'observa un augment de la mortalitat a la població immigrant al estar exposada a canvis ambientals i dietètics. Aquesta mortalitat però, no arriba a ser tan elevada com la de la població receptora.

## **2.5. ASPECTES GENÈTICS DE LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

### **A. HERETABILITAT DE LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

La cardiopatia isquèmica presenta grans dificultats per a l'anàlisi genètica ja que és una malaltia complexa, amb múltiples components genètics i ambientals. 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 els estudis de bessons, els estudis de segregació en famílies i els estudis de risc relatiu en immigrants. Els principals

estudis de bessons realitzats en relació a la CAI són el *Danish Twin Registry* (Harvald i Hauge, 1970) i el *Swedish Twin Registry* (Marenberg, 1992). En aquests dos estudis es pot apreciar una major concordança per cardiopatia isquèmica entre bessons monozigòtics que entre bessons dizigòtics, s'observa que les diferències entre bessons d'ambdós tipus és significativa. Aquestes diferències es mostren superiors en dones (suggerint que en aquestes els factors genètics són més importants), i a més són d'una major magnitud com abans es manifesti la malaltia. Malgrat tot, no tots els estudis d'aquest tipus han enregistrat diferències significatives entre bessons monozigòtics i dizigòtics, és el cas del *NHLBI Twin Study* (Reed et al, 1991), en el que la diferència entre ambdós tipus de bessons només apareixia en considerar individus amb risc extremadament alt o baix, limitant a aquests extrems de l'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 s'utilitzaven bessons criats apart o conjuntament. Un estudi d'aquest tipus, el *Swedish Adoption/Twin Study of Aging (SATSA)*, 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 si l'aparició de la malaltia ha estat prematura. En base a aquest tipus d'estudis, l'heretabilitat per a la CAI s'ha pogut estimar del 60 al 70% (Goldbourt et al, 1994).

Els estudis de risc relatiu en immigrants han demostrat una participació genètica en l'etiologia de la malaltia, en observar que en els col·lectius d'immigrants s'observen distribucions de factors de risc i taxes d'incidència de CAI similars a les del país d'origen de l'individu malgrat haver estat vivint sota les condicions de vida (nutricionals, econòmiques i socials) del país receptor durant molts anys (Groen et al. 1968).

## **B. RECERCA DE FACTORS DE RISC GENÈTIC PER A LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA: AVANTATGES DELS ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ EN FAMILIES**

Donat que existeixen evidències sobre l'heretabilitat de la CAI, el següent pas és la cerca de gens de susceptibilitat per a la malaltia que aportin un cert risc per al desenvolupament de la mateixa com a factors genètics que interaccionen amb factors ambientals.

Des del punt de vista metodològic existeixen dues aproximacions generals per a la recerca de factors de risc genètic que es coneixen amb el nom de *candidate genes* y *wide genome screening*. Els estudis basats en *candidate genes* (**gens candidats**) utilitzen gens que ja han estat localitzats en el genoma i que codifiquen per a productes que estan implicats en vies metabòliques que, en cas d'estar alterades, poden participar en l'aparició de la malaltia. Un cop escollits aquests gens candidats, cal esbrinar si la variació genètica en algun d'ells explica part del component hereditari de la malaltia. Segons les mostres utilitzades i el tractament estadístic de les dades es poden realitzar diferents aproximacions com ara els estudis de lligament i els estudis d'associació.

L'anàlisi d'**associació** detecta si es dona una freqüència més elevada d'un al·lel d'un *locus* marcador en pacients de la malaltia que en un grup de població control no afectat per la mateixa. En cas de ser així, l'explicació genètica acceptada per aquest fenomen és que existeix un locus de la malaltia estretament lligat al marcador i que, a més, presenta desequilibri de lligament amb el mateix (una freqüència diferent a l'esperada per atzar de determinades combinacions al·lèliques). Malgrat tot, altres explicacions són possibles en el cas de que es doni associació, per exemple, pot donar-se que el marcador per si mateix proporcioni un risc incrementat per la malaltia, que el marcador interaccioni epistàticament amb un segon locus, o bé es tracti d'una falsa associació deguda a l'estratificació de la població, un error de definició de la malaltia o la presència de variables d'interferència. L'associació es centra en la freqüència d'un al·lel concret de tots els que pot presentar el locus marcador.

Els estudis d'associació presenten una sensibilitat de detecció molt superior a la dels estudis de lligament quan es tracta de 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). A més tenen l'avantatge metodològic de que el tamany

mostral necessari és molt inferior al que es necessita en un estudi de lligament (Risch i Merikangas, 1996) (Risch, 2000).

Tradicionalment, el tipus d'estudis d'associació que s'han realitzat són els anomenats **estudis d'associació basats en població o estudis "cas/control"**, és a dir, estudis d'associació en els que es compara una mostra de pacients i una mostra de controls extrets de la població general. Aquest tipus d'estudi presenten el problema de la selecció d'una mostra control escaient. L'heterogeneïtat genètica i l'estratificació de la població són les principals dificultats en molts casos. A més, existeix el problema de la definició de la malaltia, ja que és gairebé impossible saber si una persona aparentment sana, per tant susceptible de ser inclosa en el grup control, té una placa ateroscleròtica en formació que li farà desenvolupar la malaltia en el futur.

Recentment però, han aparegut els anomenats **estudis d'associació basats en famílies**. Entre aquests cal destacar els **tests de desequilibri de transmissió (TDT)**, en el que es comparen les freqüències al·lèliques en els pacients amb les freqüències dels al·lèls no transmesos pels seus pares. La utilització de controls genèticament relacionats amb els casos elimina el problema que representa la probabilitat de trobar associacions espúries si casos i controls procedeixen de dos subgrups poblacionals en els quals les freqüències al·lèliques i/o la incidència de la malaltia és diferent. Aquest tipus de test presenta l'avantatge de requerir un tamany mostral menor. A més, no és necessari conèixer l'estatus dels pares respecte a la malaltia, pel que s'ha mencionat al paràgraf anterior. Aquest fet representa un avantatge quan es vol realitzar un estudi d'associació sobre la CAI. L'aparició tardana de la malaltia pot representar un inconvenient a l'hora de recollir mostres dels progenitors dels afectats, malgrat aquest fet, la informació genètica dels pares absents pot ser reconstruïda a través dels germans dels pacients.

### **C. EL TEST DE DESEQUILIBRI DE TRANSMISSIÓ (TDT)**

La primera aproximació a aquesta estratègia va consistir en usar els germans dels casos com a controls. Més tard, es van utilitzar famílies nuclears (fill malalt amb els dos pares) on es comparaven els al·lèls dels fills malalts (els transmesos pels pares) amb els no transmesos pels pares. S'ha demostrat que les freqüències al·lèliques esperades en els genotips no transmesos (en absència de recombinació entre la malaltia i el locus marcador) són iguals a les freqüències al·lèliques poblacionals. Per aquesta raó la

comparació dels al·lels transmesos i els no transmesos és un estimador no esbiaixat del risc relatiu real en la població (Rubinstein et al. 1981).

Posteriorment, Spielman i col·laboradors (1993) van presentar un test estadístic en el que només els pares heterozigots són els únics realment informatius d'entre tots els progenitors. En aquest test s'analitza les vegades ( $t_{M1}$ ) que un pare heterozigot per un al·lel determinat  $M_1$  transmet aquest al·lel a un descendent afectat en comparació amb les vegades ( $t_{MX}$ ) que no es transmet aquest al·lel, sinó 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:

$$\mathbf{TDT} = \frac{(t_{M1} - t_{MX})^2}{t_{M1} + t_{MX}}$$

la distribució d'aquest test TDT s'aproxima a una distribució  $\chi^2$  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.

A partir de les distribucions teòriques de transmissió per un model de malaltia recessiva sense fenocòpies, i per a mostres seleccionades a l'atzar a partir d'individus afectats, Ott (1989) va demostrar que l'estadístic TDT es desviava de la distribució nul·la només quan la fracció de recombinació  $\theta < 1/2$ . Per aquesta raó inicialment el TDT va ser considerat com un test de lligament en presència de desequilibri de lligament.

De tota manera, el TDT és alhora un test de lligament i de desequilibri de lligament. aquesta propietat es deu a que el TDT es desvia de la seva distribució nul·la només si els dos *loci* (marcador i malaltia) estan alhora lligats i en desequilibri de lligament. En una població estable la presència de desequilibri de lligament implica alhora un fort lligament, ja que, en absència de lligament estret, el desequilibri de lligament desapareix ràpidament després d'un petit nombre de generacions.

La primera forma descrita per al TDT només permetia marcadors bial·lèlics, però més endavant s'han fet adaptacions que permeten l'ús de marcadors altament polimòrfics. És el cas d'una nova aproximació al test TDT presentada per Clayton (1999a i b) que, a més, permet l'ús de múltiples marcadors lligats, considerant els haplotips com al·lels d'un marcador, i reconstrueix els genotips dels progenitors absents, per probabilitats, amb la

informació dels altres membres de la família. Aquestes modificacions del test TDT es troben incloses al programa TRANSMIT (Clayton, 1999a).

#### **D. APLICACIONS DE LA RECERCA DE FACTORS DE RISC GENÈTIC PER A LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

La comprensió molecular i bioquímica dels mecanismes associats a les mutacions causants de la malaltia es podrà aplicar a la lluita contra aquesta, especialment a través de la medicina preventiva donat que el coneixement del risc genètic d'un individu permet l'aplicació d'un tractament abans de que es manifesti la malaltia. En un futur, el coneixement d'aquest component genètic de la malaltia permetrà la relització d'una teràpia gènica, quan existeixi la tecnologia necessària per realitzar-la, dirigida a evitar l'aparició de la CAI.

En el cas de la CAI, poques mutacions han estat clarament relacionades amb la malaltia, encara que es considera ben demostrada l'existència d'un component genètic. Actualment, la recerca de gens candidats per a aquesta malaltia i la seva confirmació són el gran repte dels grups investigadors dedicats a l'estudi de la genètica de la CAI. El present treball intenta fer una petita contribució en aquest camp.

### **3. ELS SISTEMES DE COAGULACIÓ I FIBRINOLISI**

#### **3.1. DESCRIPCIÓ GENERAL**

Des del punt de vista epidemiològic, en la present tesi es realitza un estudi d'associació en famílies de gens candidats per a la CAI. Els gens que han estat triats en aquest treball com a candidats a marcadors de risc genètic per la CAI estan implicats en el mecanisme de l'hemostasi. Aquest mecanisme evita una pèrdua excessiva de sang en situacions de lesió vascular i inicia els mecanismes de reparació de la zona lesionada, essent el resultat d'un fi balanç entre coagulació, anticoagulació i fibrinolisi. L'equilibri i la modulació recíproca entre aquests tres processos és fonamental pel bon funcionament de l'hemostasi implicant:

- La formació ràpida d'un trombe en la zona lesionada.
- La limitació de l'extensió del trombe només a la zona afectada per la lesió.
- La dissolució del coàgul un cop el vas ha estat reparat.
- El manteniment de les propietats de la sang com a fluid evitant fenòmens de coagulació espontània (no originada per una lesió).

Per tal de situar la funció dels productes dels gens candidats triats en aquesta tesi es passa a continuació a fer una descripció general dels processos de coagulació (trombogènesi), anticoagulació i fibrinolisi (trombolisi).

#### **A. LA COAGULACIÓ**

Quan s'han produït ferides que han provocat l'obertura de vasos sanguinis petits, l'hemorràgia resultant queda aturada al cap de 1 a 3 minuts (temps d'hemorràgia). Aquest fenomen és el producte de l'activació dels sistemes de coagulació que inclouen tant mecanismes cel·lulars com cascades d'activació enzimàtica.

En una primera fase es dona l'anomenada **hemostasi primària**, que consisteix en la vasoconstricció i tancament mecànic dels vasos petits mitjançant un tap de trombòcits anomenat **trombe blanc de disgregació**. Aquest tap es forma degut a que els trombòcits queden adherits a les fibres de teixit conjuntiu exposat al voltant de la ferida. El Factor von



Willebrand (vWF) és l'intermediari d'aquest procés donat que estableix ponts entre les estructures subendotelials, exposades al torrent sanguini per la lesió, i el seu receptor específic a la membrana dels trombòcits (glucoproteïna Ib).

El procés d'activació dels trombòcits, que dona com a resultat l'adhesió plaquetària, implica un canvi de la seva forma. Els trombòcits esdevenen esfèrics i projecten apèndix espinosos. Aquest procés, sota l'estímul de substàncies com l'ADP (alliberat en part per les cèl·lules lesionades) i l'adrenalina, implica la descàrrega del contingut dels grànuls densos i dels grànuls  $\alpha$  dels trombòcits. Els continguts alliberats (ADP, catecolamines i serotonina, entre d'altres) són vasoconstrictors i activadors plaquetaris, això provoca una realimentació positiva que implica que cada cop més trombòcits s'incorporin a la reacció.

A partir d'aquest estadi primerenc d'adhesió plaquetària la **trombina** (generada a partir de la **protrombina** en la cascada enzimàtica de la coagulació) provoca l'agregació irreversible dels trombòcits en interaccionar amb receptors específics de la seva membrana. Aquest fet provoca l'alliberament d'endoperòxids i tromboxà  $A_2$ , que, juntament amb la presència de fibrinogen, són els veritables inductors de l'agregació irreversible dels trombòcits.

Un cop format el trombe blanc de disgregació la vasoconstricció disminueix. Simultàniament, el procés anomenat **hemostasi secundària** ha donat lloc a la coagulació de la **fibrina** que ha format una xarxa a la qual s'han integrat els trombòcits a través dels seus receptors específics per la fibrina (**glucoproteïna IIb/IIIa**). Això dona com a resultat l'anomenat **trombe gris de disgregació** que tanca definitivament els vasos lesionats i que a més de fibrina i trombòcits inclou d'altres cèl·lules sanguínies com els eritròcits.

Finalment, el coàgul resultant s'acaba de solidificar per retracció dels filaments de fibrina. Això provoca la separació del coàgul sanguini (xarxa de fibrina amb cèl·lules sanguínies en els espais del seu entramat) per una banda i del sèrum (plasma lliure de **fibrinogen**) per l'altre.

A la zona on s'ha produït la lesió, paral·lelament a aquestes reaccions mitjançades pels trombòcits, es produeixen una sèrie de reaccions dutes a terme per enzims proteolítics que es troben al plasma en forma de proenzims inactius amb la capacitat d'activar-se recíprocament en una cadena de reaccions en cascada.

Durant l'evolució han sorgit grups homòlegs de **zimogens**, **enzims conversors**, **cofactors** i **inhibidors** com a resultat de la duplicació i la mutació de gens. Aquesta situació també ha portat al desenvolupament d'una sèrie de reaccions enllaçades, en les que

un zimogen es converteix en una **proteasa de serina**, que acte seguit catalitza al precursor següent en la seva transició a proteasa. Aquest sistema de múltiples fases permet la modulació i amplificació de l'estímul inicial que posa en acció el mecanisme de la coagulació.

L'activació d'aquesta cascada de reaccions enzimàtiques pot donar-se a través de dues vies anomenades extrínseca i intrínseca. Aquestes vies convergeixen en una via comú al final de la qual es produeixen monòmers de fibrina que, en polimeritzar, donaran lloc a l'esquelet del coàgul sanguini.

L'activació de la **via intrínseca** (figura I.6) s'inicia per exposició a la sang del col·lagen de la membrana basal o de la substància microfibril·lar. A aquestes estructures subendotelials se'ls uneix el **factor XII**, un zimogen de 80 kDa de pes molecular, convertint-se en la proteasa de serina activa **factor XIIa** mitjançant fenòmens conformationals i de proteolisi. La formació d'aquest enzim s'estimula a través d'un circuit d'autocatàlisi que inclou els zimogens **calicreïna** i **plasminogen** i el cofactor cininogen d'alt pes molecular (**HMK**).

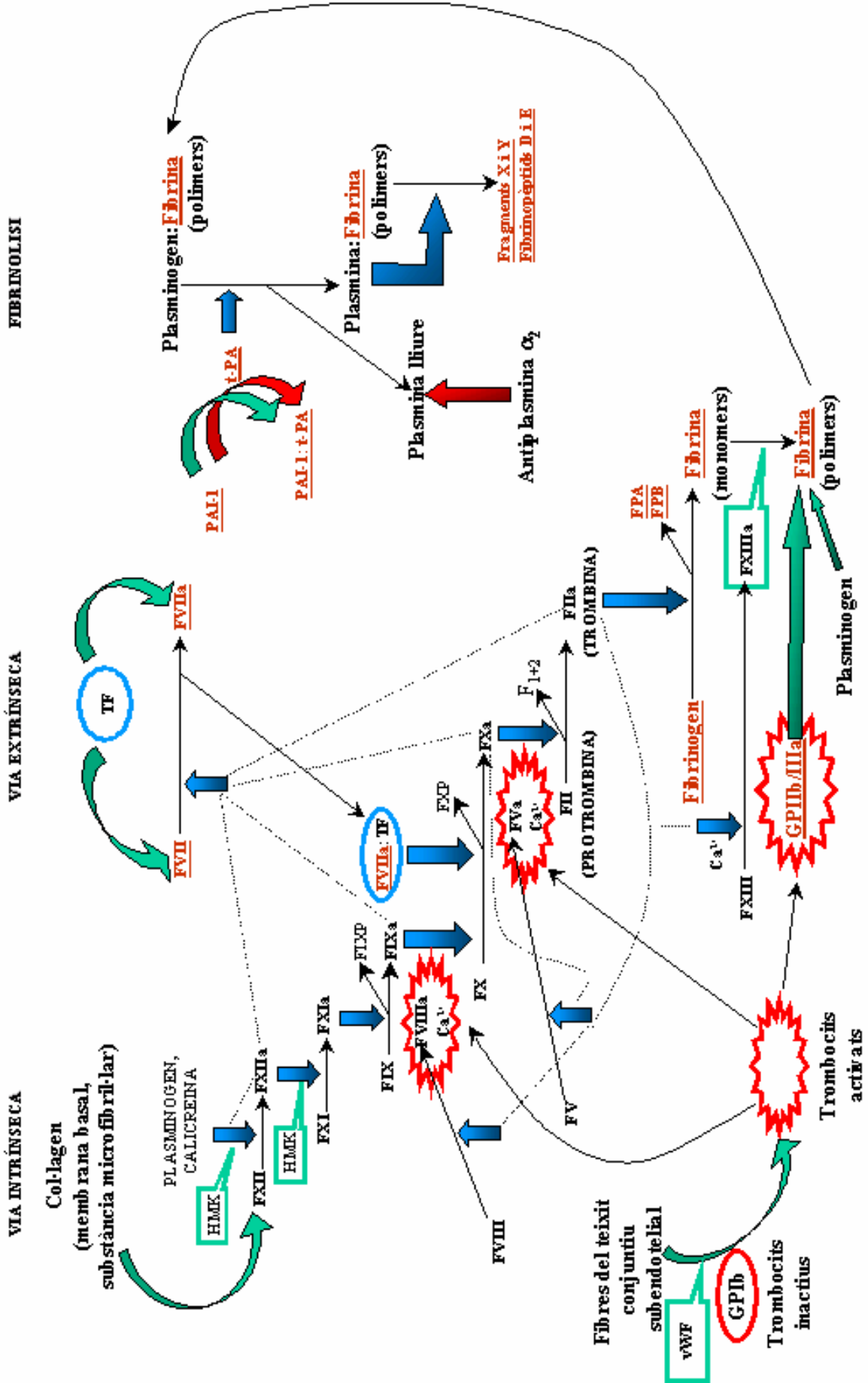
El Factor XIIa, amb l'ajut del cininogen d'alt pes molecular com a cofactor, és capaç de segmentar amb rapidesa el **factor XI**, un zimogen amb dues cadenes polipeptídiques idèntiques connectades per unions disulfur (PM= 80 kDa X 2). El **factor XIa** generat en aquesta reacció és capaç d'interaccionar amb el **factor IX**, un zimogen de cadena polipeptídica única (PM= 57 kDa). La conversió que dona com a producte el **factor IXa** requereix l'escisió de dos enllaços peptídics que dona com a resultat l'alliberament del pèptid d'activació del factor IX (**FIXP**). Acte seguit, el factor IXa digereix el zimogen **factor X** (PM= 55 kDa), que circula com una proteïna de dues cadenes amb gran homologia estructural amb el factor IX, donant lloc al **factor Xa** i el pèptid d'activació del factor X (**FXP**). Aquesta darrera transformació es veu espectacularment incrementada *in vivo* en presència d'una superfície plaquetària activada, **factor VIIIa** i ions  $Ca^{2+}$ .

La **via extrínseca** (figura I.6) s'inicia en quedar exposada a la sang, a causa d'una lesió, una glucoproteïna de membrana anomenada factor tissular (**TF**). Aquesta glucoproteïna es caracteritza per posseir un curt domini citoplasmàtic, un domini hidrofòbic transmembrana i un domini d'unió extracel·lular. El TF és capaç de formar una unió estable amb una proteïna que es troba en quantitats molt petites a la sang anomenada **factor VII**, aquest fet provoca l'activació d'aquest darrer passant a **factor VIIa**. El complex estable TF-factor VIIa interacciona amb el factor X convertint-lo a factor Xa mitjançant les mateixes modificacions proteolítiques que es donen si aquesta activació es dona per la via intrínseca.

Un cop es genera prou quantitat de factor Xa, la cascada de la coagulació continua per l'anomenada **via comú** (figura I.6). En aquest pas, el factor Xa activa el zimogen protrombina mitjançant múltiples escissions, donant lloc a: l'enzim **factor IIa** (trombina), que procedeix del fragment C-terminal de la protrombina, el fragment N-terminal anomenat fragment protrombina 1+2 (**F<sub>1+2</sub>**) i un petit polipèptid de 13 aminoàcids. La formació de factor IIa es troba catalitzada a través del **factor Va**. Aquest darrer es forma a partir del **factor V** a través de múltiples escissions dutes a terme pel factor Xa, el factor IIa o ambdós alhora. En el factor Va es distingeixen una cadena lleugera N-terminal i una cadena pesada C-terminal. La cadena lleugera interacciona amb membrana plaquetària activada i amb el factor Xa, mentre que la cadena pesada interacciona amb l'extrem N-terminal de la protrombina (fragment protrombina **F<sub>1+2</sub>**). Aquest procés, que *in vivo* requereix la presència d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , té com a conseqüència l'apropament entre la proteasa de serina factor Xa i el seu substracte (el zimogen protrombina) en la superfície dels trombòcits activats. Aquest fet accelera fins a 300000 vegades la producció de factor IIa respecte al que s'observa *in vitro*.

El factor IIa actua sobre la molècula de fibrinogen segmentant 4 unions arginil-glicina donant lloc als **fibrinopèptids A i B (FPA i FPB)** de 16 i 14 aminoàcids respectivament. Aquests fibrinopèptids actuen com a vasoconstrictors. Els monòmers de fibrina que resulten d'aquest procés es col·loquen paral·lelament sota l'acció de forces electrostàtiques unint-se per ponts d'hidrogen donant lloc a una estructura gelatinosa. L'estabilització del polímer de fibrina es dona a través de la formació de ponts disulfur entre els monòmers. Aquest procés es porta a terme pel **factor XIIIa**, forma activada del **factor XIII**, que es genera per acció del factor IIa en presència d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Figura I.6 (pàgina següent). Processos de coagulació i fibrinolisi. Les fletxes blaves, verdes i vermelles indiquen respectivament activació, unió i inhibició. Els quadres verds indiquen cofactor i les el·lipses blaves indiquen membrana cel·lular no endotelial. La lletra "F" indica factor i la "a" forma activa. En vermell i subratllats s'indiquen els noms dels productes proteïcs derivats dels gens estudiats en aquest treball. Basat en Weiss i Jelkman (1993) i en Rosenberg i Aird (1998).*



## B. L'ANTICOAGULACIÓ

El procés de la coagulació es troba controlat en l'organisme per mecanismes anticoagulants. Actualment se'n coneixen tres d'aquests mecanismes: el mecanisme de l'inhibidor de la via del factor tisular (TFPI), el mecanisme de la proteïna C-trombomodulina i el mecanisme de l'antitrombina III-sulfat d'heparà (figura I.7).

El **TFPI** (PM= 35 kDa) és una proteïna plasmàtica associada a lipoproteïna que es caracteritza per posseir tres dominis inhibidors de proteasa de serina repetits en tàndem. La seva acció inhibitoria es realitza sobre la via extrínseca. Mitjançant el seu primer domini inhibidor de proteasa de serina s'uneix al complex factor VIIa-TF (prèviament format), utilitzant el segon domini inhibidor per unir-se al factor Xa. Aquest fet inhibeix l'activitat de les dues proteases impedit d'aquesta manera que es desenvolupi la cascada de coagulació iniciada per via extrínseca, sense impedir, però, la funció basal del factor VII/VIIa-TF ja que no impedeix la seva unió.

El mecanisme de la **proteïna C-trombomodulina** controla la cascada de la coagulació inhibint els cofactors de la mateixa. La trombomodulina (PM= 100 kDa) és un receptor que es troba a la membrana de les cèl·lules endotelials. Aquesta es caracteritza perquè en la regió extracel·lular presenta 6 repeticions homòlogues de factor de creixement epidèrmic. En les tres repeticions més properes a la membrana cel·lular s'hi uneixen la proteïna C i el factor IIa, fet que permet l'apropament entre aquestes dues proteïnes i afavoreix la digestió de la proteïna C per part del factor IIa. Com a conseqüència, s'allibera un pèptid d'activació de 14 aminoàcids i la forma activa **proteïna Ca**. Amb l'ajut de la **proteïna S** com a cofactor, la proteïna Ca és capaç de segmentar les cadenes pesades dels cofactors de la coagulació Va i VIIIa i, en conseqüència, inactivar-los, inhibint en últim terme la formació de fibrina.

El mecanisme de l'antitrombina III-sulfat d'heparà protegeix les parets vasculars contra la formació de coàguls ja que desenvolupa la seva acció inhibidora en l'interfase sang-paret vascular, zona on es generen molts enzims de la cascada de la coagulació. L'antitrombina III (PM= 56 kDa) és una proteïna plasmàtica en la que destaquen un lloc reactiu C-terminal a través del qual interactua amb proteases de serina i un lloc N-terminal format per residus carregats positivament. El seu bon funcionament requereix la presència de proteoglicans de sulfat d'heparà generats per les cèl·lules endotelials. L'antitrombina III s'uneix a aquests proteoglicans d'acció anticoagulant mitjançant el seu lloc N-terminal. Aquest fet li provoca canvis conformacionals que l'activen i a més afavoreixen l'aproximació entre l'antitrombina III i els seus enzims diana (factor IIa, factor Xa, factor IXa, factor XIa i factor XIIa) inhibint-los a través de la interacció d'una arginina del seu lloc reactiu C-terminal amb la serina del lloc actiu d'aquestes proteases de serina.

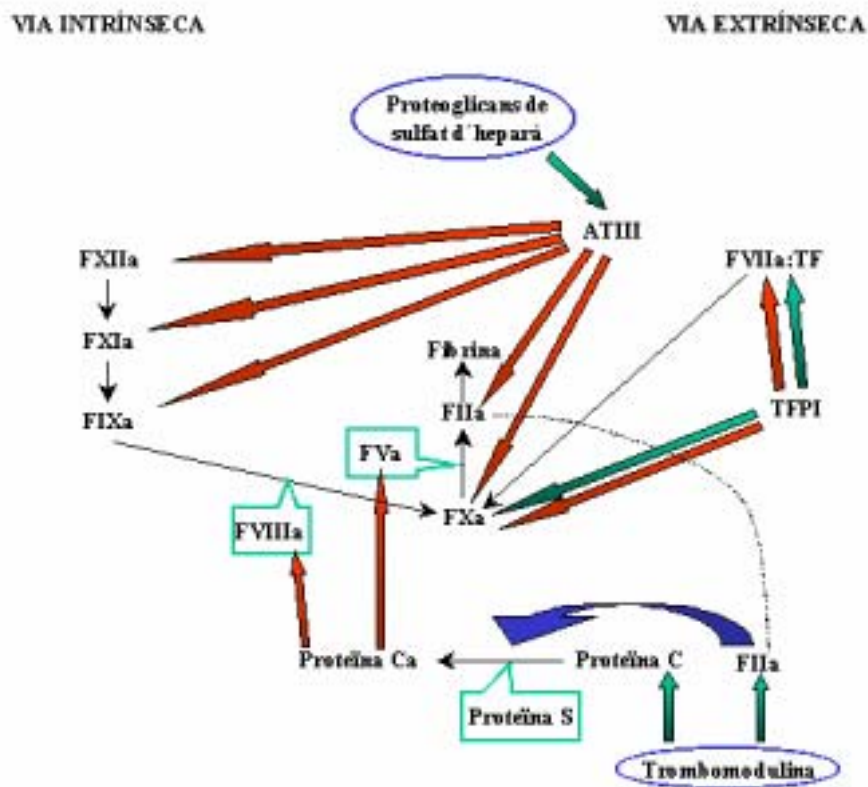


Figura 1.7. Procés d'anticoagulació. Les fletxes vermelles, blaves i verdes indiquen respectivament inhibició, activació i unió. Els quadres verds indiquen cofactor. Les el·lipses blaves representen la membrana de les cèl·lules endotelials. Basat en Rosenberg i Aird (1998)

### C. LA FIBRINOLISI

El procés de la fibrinolisi no és únicament necessari per la dissolució del coàgul de fibrina un cop la lesió vascular ha estat reparada. Cal tenir en compte que en l'organisme intacte es dona de forma contínua un procés basal que genera fibrina a partir de fibrinogen. Aquesta formació de fibrina és contrarrestada per un procés basal de fibrinolisi constant resultant-ne un equilibri funcional. Només després d'una activació addicional del sistema de coagulació a causa de lesions predominarà la formació de fibrina en el lloc de la lesió, produint-se localment una coagulació manifesta.

La proteïna central de la fibrinolisi és el plasminogen (PM= 81 kDa). Aquesta globulina plasmàtica té la capacitat d'unir-se als polímers de fibrina. Només un cop s'ha unit a fibrina el plasminogen pot ser activat, mitjançant proteolisi, a **plasmina** pels seus activadors fisiològics, principalment l'**activador del plasminogen de tipus tissular (t-PA)** (figura I.6). La plasmina és una proteasa de serina que es capaç de dissoldre la fibrina del coàgul, generant a partir d'aquesta uns péptids solubles que són capaços d'inhibir el factor IIa. A més, la plasmina és també capaç de dissociar els factors V, VIII, IX, XI i XII, fet pel qual també té funció anticoagulant a part de fibrinolítica.

És necessari un control de la funció fibrinolítica per tal d'evitar hemorràgies en l'organisme. Aquest control es dona bàsicament a través del **Inhibidor tipus 1 de l'Activador del Plasminogen (PAI-1)** i de l'**antiplasmina  $\alpha_2$**  (figura I.6). El primer és un inhibidor de proteases de serina (**SERPIN**) que inhibeix t-PA (encara que la calicreïna plasmàtica i el factor Xa també poden fer-ho) al formar un complex no reversible amb ell. Per altra banda l'antiplasmina  $\alpha_2$  es troba en el plasma i és capaç d'inhibir qualsevol plasmina circulat, difon molt lentament del plasma a l'interior dels coàguls. Aquest fet limita l'acció de la plasmina només al coàgul impedit que actui fora d'ell, evitant el perill que representaria la plasmina activa circulat lliurement.

### **3.2. GENS CANDIDATS ESTUDIATS**

Els processos com la coagulació i la fibrinolisi, el metabolisme lipídic o lipoproteic, la regulació del fluxe sanguini per vasoconstricció i vasodilatació, la regulació de la pressió sanguínia, el desenvolupament inicial de les artèries coronàries així com la formació i el creixement de lesions ateroscleròtiques es troben en les bases fisiopatològiques de la CAI. Qualsevol gen el producte proteic del qual estigui implicat en algun d'aquests processos és un gen candidat per la malaltia (Goldbourt et al. 1994).

En base a aquest raonament, en la present tesi s'han escollit com a gens candidats aquells que donen productes proteics implicats en els mecanismes de coagulació i fibrinolisi. Aquests gens són:

- **FVII** (Factor VII de la coagulació).
- **FGB** i **FGA** ( $\beta$  fibrinogen i  $\alpha$  fibrinogen).
- **GPIIb** i **GPIIIa** (integrines plaquetaries IIb i IIIa).
- **PLAT** (activador tissular del plasminogen).
- **PAI-1** (inhibidor tipus 1 de l'activador del plasminogen).

Per tal de poder comprendre el paper d'aquests gens en la fisiopatologia de la CAI, en aquesta secció s'analitzen la seva estructura i funció tant a nivell nucleotídic com a nivell del producte proteic pel que codifiquen. Aquest coneixement sobre l'estructura i la funció, així com el coneixement de la via metabòlica en la que intervenen, proporcionarà la base necessària per a la interpretació, des del punt de vista fisiològic i molecular, de les associacions amb la CAI que puguin ser descrites en els gens estudiats en el present treball.

## **A. FACTOR DE COAGULACIÓ VII**

### **A.1. LA PROTEÏNA**

El factor VII de la coagulació conegut també com FVII, és una proteasa de serina dependent de vitamina K sintetitzada al fetge. Aquesta glucoproteïna és segregada a la sang sota la forma de zimogen inactiu d'una sola cadena.



Així com altres proteases de serina dependents de vitamina K, el factor VII és sintetitzat com a precursor amb un segment de 38 aminoàcids anomenat *preproleader* immediatament precedent al extrem N-terminal de la forma proteica madura que circularà en plasma. Els 20 primers aminoàcids d'aquest preproleader formen l'anomenat pre-pèptid o pèptid senyal que dirigeix la proteïna cap al reticle endoplasmàtic rugós i la via de secreció cel·lular. Els darrers 18 aminoàcids d'aquest segment formen l'anomenat pro-pèptid amb una gran similitud amb el d'altres factors de coagulació dependents de vitamina K. Es tracta d'un senyal de reconeixement per una carboxilasa endoplasmàtica que modifica post-traduccionament determinats residus d'àcid glutàmic localitzats a l'extrem N-terminal de la proteïna.

El factor VII com a proteïna madura té 406 aminoàcids amb un pes molecular de 50 kDa, presentant a la seva estructura primària una gran similitud amb altres proteases de la coagulació dependents de vitamina K. La seva activació implica la digestió de l'enllaç peptídic entre Arg<sub>152</sub> i Ile<sub>153</sub> donant lloc al factor VIIa (forma activa), format per una cadena lleugera que conté els primers 152 aminoàcids (pes molecular= 20 kDa) i una cadena pesada amb 254 aminoàcids (pes molecular= 30 kDa). Aquestes dues cadenes estan unides a través d'un únic pont disulfur (figura I.8).

A la cadena lleugera hi trobem el domini  $\gamma$ -carboxiglutàmic, també anomenat domini "Gla", format per 38 aminoàcids. És aquí on es produeix la modificació post-traduccionament ( $\gamma$ -carboxilació) dependent de vitamina K, que és essencial per a la unió de cations Ca<sup>2+</sup>, i que serà responsable de canvis conformacionals necessaris per a l'activitat del factor VIIa i per a la seva interacció amb fosfolípids de membrana. Seguidament (aminoàcids 39-44) hi ha l'anomenat *hydrophobic stack* (apilament hidrofòbic) amb una homologia molt elevada amb altres regions similars en altres factors de coagulació dependents de vitamina K. Aquest segment és el pont entre el domini "Gla" i el següent segment, en el que es troben dues repeticions de 36 aminoàcids cada una amb una elevada similitud de seqüència amb el EGF (factor de creixement epidèrmic) motiu pel que han estat anomenades dominis EGF (figura I.8).

Immediatament després dels dominis EGF es troba la seqüència que conté el lloc d'activació (Arg<sub>152</sub>-Ile<sub>153</sub>). És aquí on el factor VII com a zimogen ha d'ésser digerit per donar lloc a l'enzim factor VIIa. Aquesta activació es portada a terme majoritàriament pel factor Xa, encara que també es pot realitzar mitjançant els factors XIIa, IXa o la trombina.

Els darrers 254 aminoàcids constituents de la cadena pesada contenen l'anomenat domini catalític o proteasa de serina (figura I.8). Aquest segment presenta una elevada homologia de seqüència amb el grup de proteases de serina de la família de la tripsina, conté la tríada catalítica (Ser<sub>344</sub>, Asp<sub>242</sub> i His<sub>193</sub>) implicada en la digestió que realitza el factor VIIa sobre els seus substractes: factors IX i X. Per tal de poder realitzar aquesta digestió es necessari que el factor VII com a zimogen interactui amb el seu cofactor, el factor tissular (TF), per tal de poder ser activat. En aquesta interacció intervenen els dominis "Gla" i EGF, així com residus localitzats en el domini proteasa de serina. És essencial la unió de cations Ca<sup>2+</sup> tant al domini "Gla" com al domini proteasa de serina (aminoàcids 210-220) per tal de que el factor VII experimenti canvis conformationals que li permetin unir-se a TF.

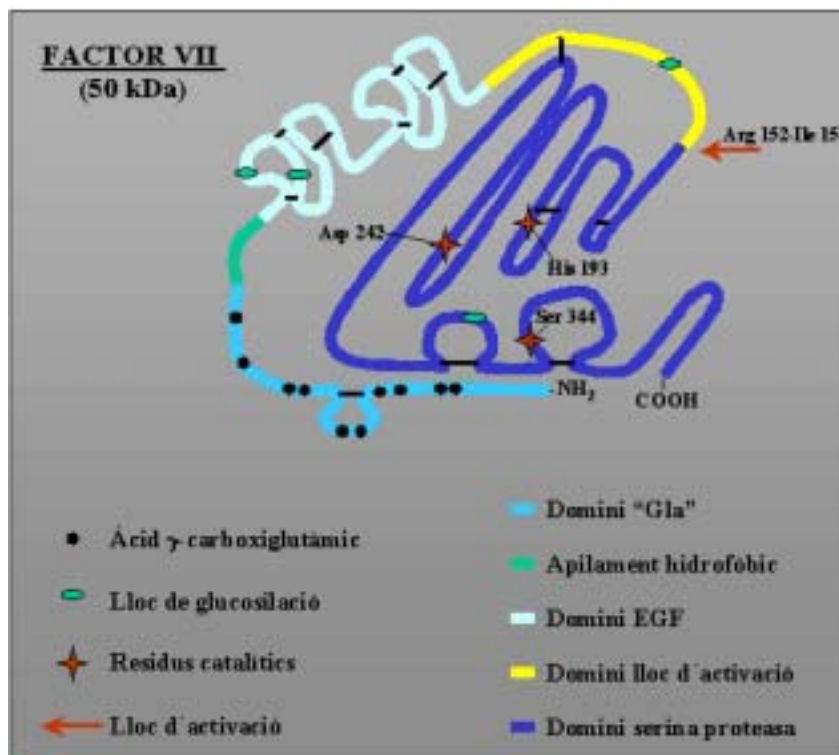


Figura I.8. Estructura del factor de coagulació VII humà. Les barres negres indiquen la posició d'enllaços disulfur. Basat en Petersen et al. (1995).

## A.2. EL GEN FVII, POLIMORFISMES ESTUDIATS I LLUR NOMENCLATURA

El gen que codifica per el factor de coagulació VII es troba localitzat al braç llarg del cromosoma 13, concretament a la posició 13q34, a prop del gen que codifica pel factor de coagulació X.

Aquest gen s'extén al llarg de 12.8 kilobases. L'ARNm presenta un splicing alternatiu que pot donar un transcrit que conté 8 exons o un altre que, a més, conté un exó addicional (exó 1b) donant lloc a una seqüència *preproleader* més llarga. Els 8 primers exons (incloent l'exó opcional 1b) presenten unes longituds compreses entre 25 i 161 pb, el darrer exó (exó número 8) destaca per tenir una longitud de 1.6 kilobases (figura I.9). En la seva regió promotora s'han descrit un lloc d'unió per al Factor Nuclear 4 de l'Hepatocit (HNF-4) entre les posicions -63 i -58, un lloc d'unió per al factor de transcripció ubicu Sp1 entre les posicions -101 i -94, i una seqüència homòloga a element de resposta a hormona localitzada entre les posicions -227 i -213. L'inici de transcripció s'ha localitzat al voltant de la posició -51 (Pollak et al. 1996).

La posició dels introns respecte de la seqüència aminoacídica codificada pels 8 exons essencials en el gen del factor VII és la mateixa que podem observar als gens del factor IX, factor X, proteïna C i els tres primers exons del gen de la protrombina. Tots aquests gens pertanyen a la família de les proteases de serina dependents de vitamina K. Els exons dels membres d'aquesta família codifiquen per dominis generalment conservats en ella (preproleader, regió  $\gamma$ -carboxilasa, domini factor de creixement, regió d'activació i regió proteasa de serina), aquest fet suggereix un origen comú a partir d'un procés de duplicació gènica i *exon shuffling* (O'Hara et al. 1987), procés en el qual aquests dominis durant l'evolució es comportarien com a unitats modulars independents que poden combinar-se donant lloc a proteïnes noves.

Al gen del factor VII més d'una tercera part de la regió 3' no traduïda i més d'una quarta part de les seqüències intròniques són constituïdes per minisatèl·lits organitzats en regions de repetició numerades des de R1 fins a R5 (figura I.9).

Dins d'aquest gen van ésser estudiats dos polimorfismes en la present tesi: l'inserció d'un decanucleòtid i un VNTR (*variable number of tandem repeats*).

En el cas de l'inserció, el polimorfisme ve donat per la presència (al·lel **I**) o l'absència (al·lel **D**) de la seqüència CCTATATCCT a la posició -323 (Marchetti et al. 1993), anomenant-se **-323 10 pb INS/DEL** (figura I.9).

El VNTR, anomenat **HVR4** (Regió Hipervariable 4), consisteix en una repetició en tàndem d'una unitat de 37 pb de longitud. Aquest minisatèl·lit es localitza a la regió de seqüències repetides R4 a l'inici de l'intró G (figura I.9). En un principi van ser descrits nomès 2 al·lells per a aquest polimorfisme, anomenats **a** i **b**, amb 7 i 6 repeticions en tàndem respectivament (Marchetti et al. 1992). Posteriorment, s'han descrit dos al·lells més, considerats rars donada la seva baixa freqüència en les poblacions humanes, amb 5 i 8 repeticions en tàndem cada un (de Knijff et al. 1994). A més, s'ha actualitzat la nomenclatura dels al·lells anomenant-se **H5**, **H6**, **H7** i **H8**. Aquesta numeració indica el número de repeticions en tàndem que conté cada al·lel.

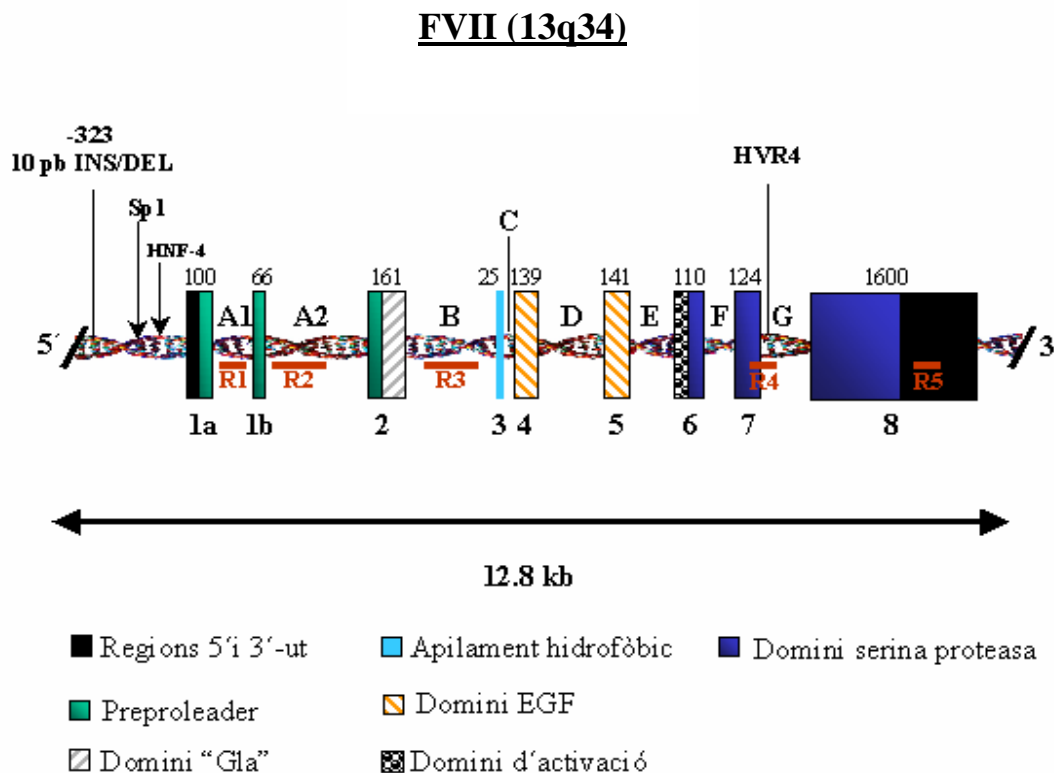


Figura I.9. Estructura del gen del factor VII humà. Els exons són representats per rectangles. Sobre els exons s'indica la seva longitud en pb, per sota s'indica la numeració dels mateixos. Els introns són indicats amb lletres majúscules. En vermell es senyalen les regions de repetició constituïdes per minisatèl·lits R1-R5. Per sobre del gen es mostra la posició dels polimorfismes -323 10 pb INS/DEL i HVR4.

## B. FIBRINOGEN

### B.1. LA PROTEÏNA

El fibrinogen pot ser considerat com la proteïna central del sistema de coagulació. Es tracta d'una macromolècula formada per tres parelles de pèptids diferents anomenats  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$  que formen una estructura dimèrica  $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$  amb un pes molecular de 340 kDa i de síntesi principalment hepàtica.

Les cadenes  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$  contenen 610, 461 i 411 aminoàcids, respectivament. Un total de 29 ponts disulfur uneixen les sis cadenes donant lloc a una estructura dimèrica amb les regions N-terminals de la totalitat de les cadenes polipeptídiques conservades en una configuració simètrica rígida dins d'un nòdul E central. Aquestes cadenes sorgeixen d'aquesta regió central per tal de formar dos feixos laterals, contenint cada feix un grup de tres cadenes que s'entrellacen per donar lloc a dues estructures nodulars, anomenades dominis D, que contenen els extrems C-terminals de dues d'aquestes cadenes ( $\beta$  i  $\gamma$ ). Com a conseqüència, el fibrinogen és una molècula en forma de plaqueta amb dos dominis D laterals més petits i un domini E central més gran (figura I.10).

El fibrinogen humà pot presentar-se sota formes moleculars diferents degut a fenòmens d'*splicing* alternatiu (a la cadena  $\gamma$ ), modificacions post-traduccionals de certs aminoàcids (fosforilació, hidroxilació i glucosilació) o degradació proteolítica a les cadenes  $A\alpha$  i  $\gamma$ . Tots aquests fenòmens es combinen donant lloc a una gran varietat de molècules de fibrinogen que es diferencien principalment per la seva capacitat i velocitat de polimerització (Henschen, 1993).

L'activació del fibrinogen per part de la trombina (factor IIa) implica l'escisió de 4 unions arginil-glicina en el seu nòdul E central donant lloc a dos grups de polipèptids: 2 fibrinopèptids A (FPA) de 16 aminoàcids i 2 fibrinopèptids B (FPB) de 14 aminoàcids (figura I.10), donant lloc a l'aparició del monòmer de fibrina amb estructura  $(\alpha, \beta, \gamma)_2$ . L'alliberament d'aquests dos polipèptids descobreix un grup específic de zones a dins del nòdul E que permet la interacció d'aquesta regió amb zones dels nòduls D d'altres molècules de fibrina. La disposició esglaonada d'interaccions nòdul E-nòdul D permet la generació de grans polímers que creen una xarxa de fibrina.

La fibrina és la principal proteïna sanguínia recolzadora de l'agregació plaquetària. És capaç d'interaccionar amb els receptors glucoproteics de la superfície plaquetària IIb/IIIa a través de la seqüència aminoacídica RGD (Arg-Gly-Asp) que es dona 2 cops a la cadena  $\alpha$ :

RGDS (posició 572-575) i RGDF (posició 95-98) i a través de la seqüència C-terminal de la cadena  $\gamma$  HHLGGAKQAGDV (His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val), que abarca els residus 400-411 (figura I.10).

La digestió de fibrina o fibrinogen per part de la plasmina dona lloc a 4 tipus de fragments: fragment X, fragment Y, fibrinopèptid D (2 de cada a partir d'una molècula de fibrina o fibrinogen) i fibrinopèptid E (figura I.10).

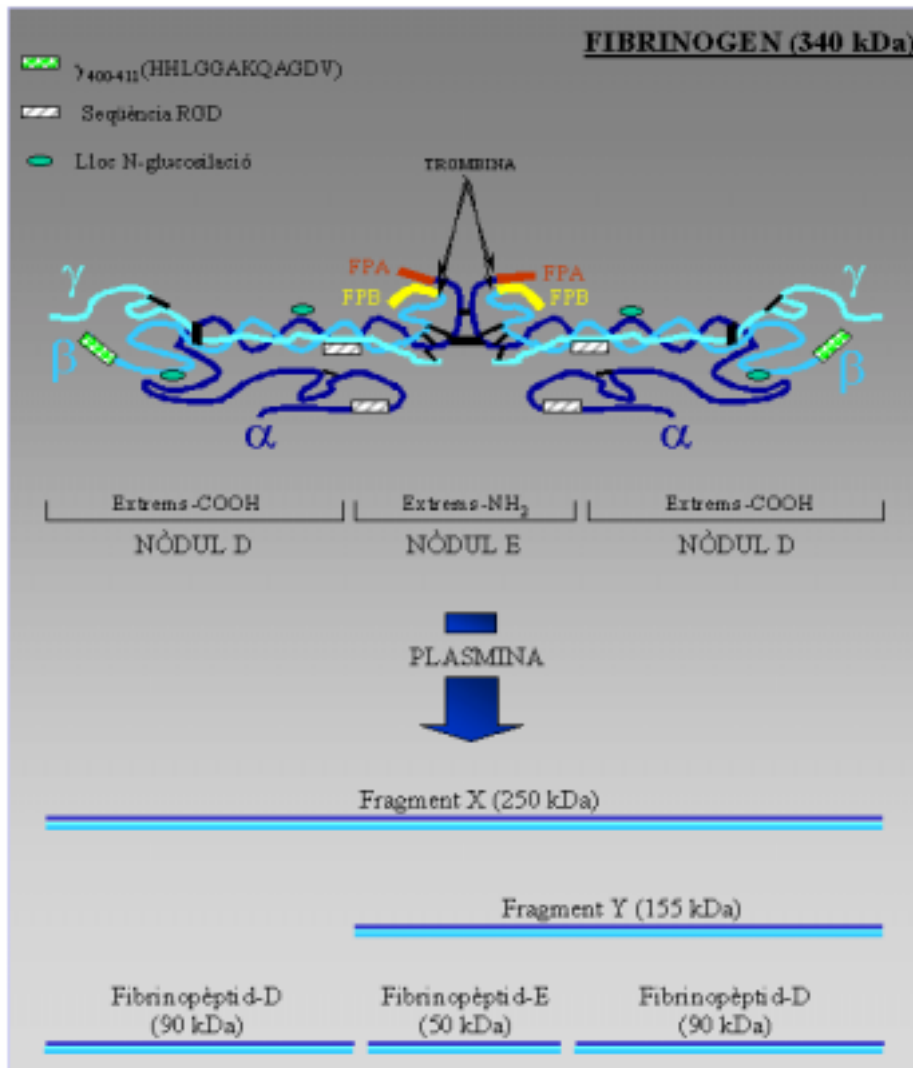


Figura I.10. Estructura del fibrinogen humà. Les cadenes  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$  s'indiquen en diferents tons de blau. En vermell s'indica el fibrinopèptid A (FPA) i en groc s'indica el fibrinopèptid B (FPB). A sobre d'ells, amb fletxes, s'indiquen els llocs de digestió/activació per trombina. Les barres negres indiquen enllaços disulfur. En la part inferior de la figura es mostren els pèptids resultants de la digestió del fibrinogen/fibrina per plasmina. Basat en Cook i Ubben (1990) i en Kirschbaum i Budzynski (1990).

## B.2. ELS GENS CODIFICANTS PEL FIBRINOGEN, POLIMORFISMES ESTUDIATS I LLUR NOMENCLATURA

Les tres cadenes polipeptídiques que formen el fibrinogen estan codificades per tres gens que formen un cluster que s'extén al llarg de 46 kilobases a la regió q28 del cromosoma 4. Els gens que codifiquen per les cadenes  $\alpha$  i  $\gamma$  són transcrits cap a la cadena  $\beta$  mentre que aquesta última es transcriu a partir de la cadena d'ADN oposada en direcció als gens que codifiquen per les cadenes  $\alpha$  i  $\gamma$ .

Les regions promotores dels 3 gens, a part de les seqüències TATA i CAAT, presenten els anomenats *IL-6-responsive elements*, seqüències a través de les quals l'expressió basal resulta incrementada sota estimul de IL-6 en situacions d'inflamació ja que el fibrinogen és una proteïna de fase aguda. A més, els gens  $\alpha$  i  $\beta$  presenten una seqüència per a l'unió d'HNF-1 (factor nuclear 1 de l'hepatòcit) que els confereix una expressió fetge-específica.

L'organització en cluster i l'orientació d'aquests 3 gens juntament amb un elevat grau d'homologia a nivell aminoacídic i nucleotídic, així com la similaritat en la distribució dels dominis exó-intró a la regió 5', suggereixen que aquests gens s'han originat per duplicació, inversió i posterior divergència evolutiva a partir d'un gen ancestral (Kant et al. 1985).

En aquest treball han estat estudiats 3 polimorfismes dins el cluster gènic del fibrinogen, 2 d'ells al gen del  $\beta$  fibrinogen i 1 al gen del  $\alpha$  fibrinogen.

### **B.2.1. $\beta$ FIBRINOGEN (FGB)**

Aquest gen té una longitud de 8.8 kilobases i es troba dividit en 8 exons la longitud dels quals oscil·la entre 113 i 285 pb. En la regió promotora, concretament entre les posicions -150 i -67, trobem tres seqüències reguladores: la seqüència CTGG(G/A)AA que és reconeguda pel IL-6 RE-BP (proteïna d'unió a l'element de resposta a IL-6), la seqüència de reconeixement per membres de la família de proteïnes nuclears C/EBP i la seqüència de reconeixement per HNF-1 (figura I.11), aquestes seqüències regulen tant l'expressió a nivells basals com una sobreexpressió estimulada en presència de IL-6 en la fase aguda (Dalmon et al. 1993, Anderson et al. 1993).

En el present treball han estat estudiats dos RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) d'aquest gen: *HindIII* i *BclI*.

L'**RFLP *HindIII*** està localitzat a la regió 5' promotora del gen (figura I.11). Consisteix en un canvi C/T en la posició -148, donant-se dos al·lels: **Hd1** que es correspon a C<sup>-148</sup> donant lloc a una diana de restricció per a l'enzim *HindIII* i **Hd2** que es correspon a T<sup>-148</sup> que provoca la desaparició d'aquesta diana (Thomas et al. 1994).

L'**RFLP *BclII*** es troba localitzat a la regió 3' del gen (figura I.11). Els dos al·lels possibles són **B1** i **B2** (Thomas et al. 1994). En el present treball s'ha decidit anomenar **B1** a l'al·lel per la presència de la diana de restricció per a l'enzim *BclII* i **B2** l'al·lel que es correspon amb l'absència d'aquesta diana de restricció. Aquesta nomenclatura no es respecta a tots els estudis que han utilitzat aquest polimorfisme, existint a la bibliografia treballs en els que la definició dels al·lels és l'oposada a l'utilitzada en aquesta tesi i en altres treballs.

### **B.2.2. $\alpha$ FIBRINOGEN (FGA)**

El gen que codifica per  $\alpha$  fibrinogen té una longitud de 7.5 kilobases. Es troba dividit en 5 exons. La mida dels 4 primers oscil·la entre 84 i 183 pb, mentre que l'exó número 5 destaca pel seu tamany (1424 pb). La seva regió promotora també conté la seqüència CTGG(G/A)AA per a la resposta a estímul per IL-6, així com l'element necessari per a l'expressió fetge-específica a través de HNF-1 (Courtois et al. 1987) (figura I.11).

En la present tesi s'ha estudiat un **RFLP *TaqI*** d'aquest gen. El polimorfisme es troba localitzat a la regió 3' del gen (figura I.11) i pot presentar-se sota la forma de dos al·lels: l'al·lel **T1** que designa la presència de la diana de restricció per a l'enzim *TaqI* i l'al·lel **T2** que en designa l'absència (Thomas et al. 1994).



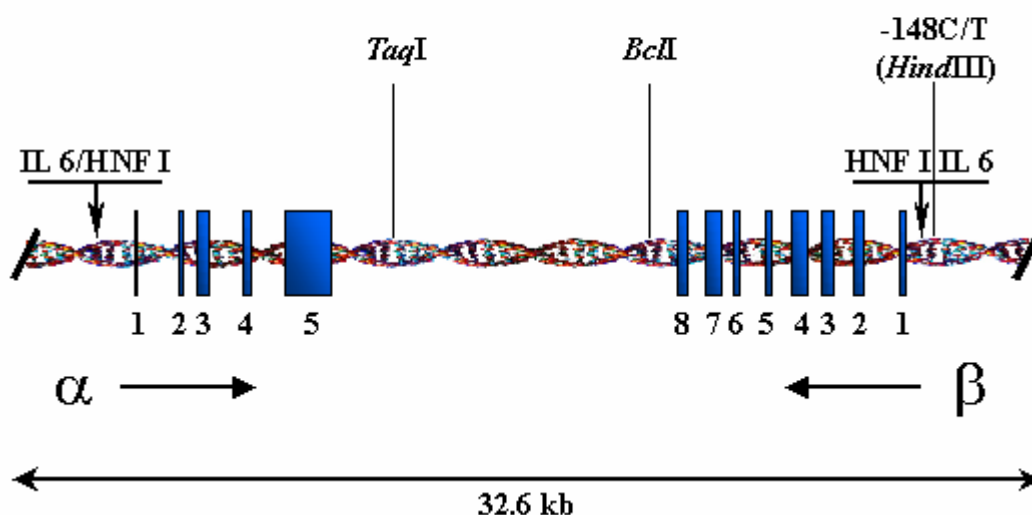
**FGA i FGB (4q28)**

Figura I.11. Estructura dels gens FGA i FGB ( $\alpha$  i  $\beta$  fibrinogen) humans. Per sota dels gens s'indica, mitjançant fletxes horitzontals, la direcció en que són transcrits. Els exons són representats per rectangles, les longituds dels mateixos en pb són 84, 125, 183, 145 i 1424 per FGA (exons del 1 al 5 respectivament) i 113, 191, 183, 227, 113, 125, 285 i 231 per FGB (exons del 1 al 8 respectivament). Sota els exons s'indica la numeració dels mateixos. Per sobre dels gens s'indica la posició dels RFLPs TaqI, BclI i HindIII. A més, s'indiquen els elements per resposta a estímul per IL-6 i per expressió fetge-específica a través d'HNF-1.

## **C. RECEPTOR PLAQUETARI DEL FIBRINOGEN, GLUCOPROTEÏNA IIB/IIIA**

### **C.1. LA PROTEÏNA**

La glucoproteïna Iib/IIIA és sintetitzada a nivell dels megacariòcits exposant-se de l'ordre de 50000 receptors per plaqueta. Pertany al grup de molècules CAM (molècules d'adherència cel·lular). Concretament, és un membre de la superfamília de les integrines.

Les integrines són heterodímers dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  constituïts per dues subunitats anomenades  $\alpha$  i  $\beta$ . La superfamília es troba dividida en famílies en les que els seus

membres presenten una subunitat  $\beta$  comú però subunitats  $\alpha$  diferents que els dóna una especificitat diferent vers lligands de la matriu extracel·lular o plasma.

La glucoproteïna IIb/IIIa presenta una subunitat  $\alpha$  anomenada IIb o  $\alpha_{IIb}$  (exclusiva de plaquetes, megacariòcits i línies cel·lulars relacionades) formada per dues cadenes: IIb $\alpha$  i IIb $\beta$ , de 123 kDa i 140 kDa respectivament, i una subunitat  $\beta$  anomenada IIIa o  $\beta_3$  (fet pel qual la glucoproteïna IIb/IIIa pertany a la família d'integrines  $\beta_3$  juntament amb el receptor endotelial de vitronectina  $\alpha_v\beta_3$ ) de cadena simple amb un pes de 100 kDa, podent rebre tota l'estructura el nom d'integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Tant GPIIb (glucoproteïna IIb) com GPIIIa (glucoproteïna IIIa) presenten un llarg domini extracel·lular, un únic domini transmembrana i una petita cua citoplasmàtica que conté l'extrem C-terminal (figura I.12).

GPIIIa és formada per un total de 788 aminoàcids. Els residus del 1-26 constitueixen el pèptid senyal N-terminal, els 689 residus que formen el domini extracel·lular contenen quatre repeticions en tàndem riques en cisteïna, a continuació, 29 residus hidrofòbics constitueixen el domini transmembrana i els 41 residus restants (extrem C-terminal) constitueixen la cua citoplasmàtica.

GPIIb $\alpha$  està constituïda per 871 aminoàcids. Els primers 30 residus formen el pèptid senyal N-terminal, a continuació presenta quatre repeticions de 12 residus cada una molt similars als llocs d'unió de  $Ca^{2+}$  presents a la troponina C i la calmodulina, la unió de  $Ca^{2+}$  en aquestes posicions estabilitza la formació de l'heterodímer entre les glucoproteïnes IIb i IIIa.

GPIIb $\beta$  és formada per 137 aminoàcids. Aquesta s'uneix mitjançant un pont disulfur amb GPIIb $\alpha$ . Conté el domini transmembrana format per 26 residus hidrofòbics i seguidament 20 residus (extrem C-terminal) que constitueixen la cua citoplasmàtica.

Immediatament després de l'activació plaquetària, duta a terme per agonistes que es generen potencialment en el lloc d'una lesió vascular com ara ADP, trombina, tromboxà  $A_2$ , PAF (factor activador de plaquetes) i adrenalina, la glucoproteïna IIb/IIIa experimenta canvis conformacionals a conseqüència dels quals s'exposa el seu lloc d'unió a lligands, fins aquest moment inactiu, essent ara capaç d'unir-se a fibrinogen, fibronectina, vitronectina i vWF.

La principal funció de l'integrina plaquetària  $\alpha_{IIb}\beta_3$  és permetre l'agregació de les plaquetes quan aquestes han estat activades com a conseqüència d'una lesió vascular. Això és possible gràcies a que la molècula dimèrica del fibrinogen és capaç d'unir-se a dos d'aquests receptors situats en la mateixa plaqueta o en plaquetes diferents. En aquest últim

cas les dues plaquetes queden unides, unint-se després a d'altres formant agregats de 10 o més plaquetes. És entre els residus 294 i 314 de la GPIIb on es dona la interacció amb la seqüència HHLGGAKQAGDV de la cadena  $\gamma$  del fibrinogen. La interacció amb les seqüències RGD de la cadena  $\alpha$  del fibrinogen es dona entre els residus 109 i 171 de GPIIIa. Aquesta zona, a més, influiria a la funció del lloc d'interacció amb els pèptids de la cadena  $\gamma$  en GPIIb (Hawiger, 1998; Calvete, 1999).

### GLUCOPROTEÏNA PLAQUETÀRIA IIb/IIIa

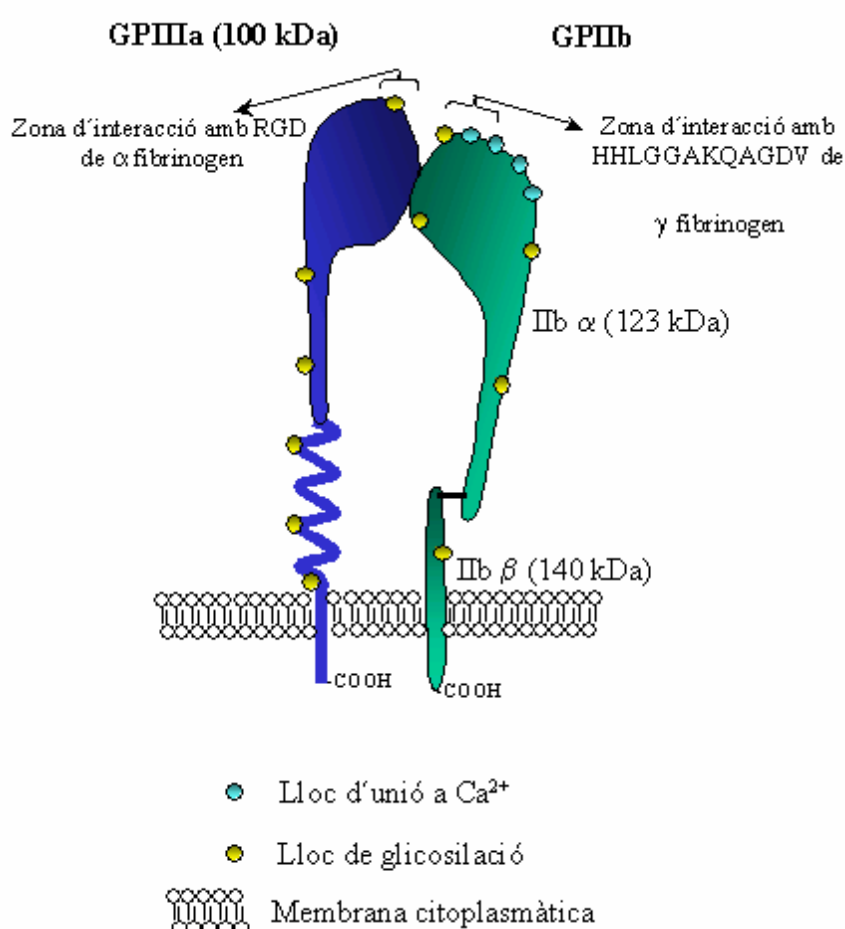


Figura I.12. Glucoproteïna plaquetària IIb/IIIa humana. La barra negra que uneix IIb $\alpha$  i IIb $\beta$  representa un enllaç disulfur. Basat en Cook i Ubben (1990).

### **C.2. GENS CODIFICANTS PER LES GLUCOPROTEÏNES DE MEMBRANA PLAQUETÀRIA IIB I IIIA, POLIMORFISMES ESTUDIATS I LLUR NOMENCLATURA**

Les dues subunitats que formen la glucoproteïna IIb/IIIa són codificades per dos gens diferents que es troben localitzats al cromosoma 17, concretament en la posició 17q21.32, extenent-se al llarg de 250 kilobases. El gen GPIIb es situa a 3' del gen GPIIIa (figura I.13).

En les plaquetes les glucoproteïnes IIb i IIIa es troben en proporció 1:1. A més, s'observa una similar reducció en la concentració de les dues subunitats en el trastorn hemorràgic hereditari anomenat trombàstènia de Glanzmann, això juntament amb el lligament físic dels gens GPIIb i GPIIIa en 17q21.32, ha fet pensar que en els megacariòcits es dona una modulació coordinada d'aquests dos gens a través d'elements reguladors comuns en *cis*.

### C.2.1. GPIIIa

El gen GPIIIa també anomenat ITGB3, integrina  $\beta_3$  o CD61 s'extén al llarg de 46 kilobases. En estudis inicials s'havien descrit 14 exons en aquest gen (Zimrin et al. 1990; Lanza et al. 1990), però una anàlisi més detallada de la part 5' del gen va mostrar que realment està dividit en 15 exons que presenten longituds compreses entre 90 i 3618 pb (Villa-Garcia et al. 1994) (figura I.13).

La regió promotora d'aquest gen no presenta les caixes TATA i CAAT típiques dels gens transcrits mitjançant ARN polimerasa II. Malgrat tot, altres elements reguladors de la transcripció en posició *cis* han estat descrits: repeticions de 20 pb que contenen la seqüència CTAGA trobada també a l'*enhancer* de GPIIb (posicions -146 i -126), quatre llocs d'unió pel factor de transcripció ubicu Sp1 en les posicions +8, -2, -22 i -87, i finalment illes CpG distribuïdes al llarg dels 145 pb anteriors al codó ATG.

La seva seqüència no mostra homologia amb GPIIb, mostrant-la, en canvi, amb gens codificants per altres subunitats  $\beta$  d'altres integrines.

En el present treball va ser analitzada la variació mostrada per un VNTR (CT)<sub>n</sub> i un RFLP *TaqI* d'aquest gen.

El VNTR (CT)<sub>n</sub> és un microsatèl·lit format per la repetició d'un dinucleòtid. Es localitza a l'intró 6 del gen (figura I.13), concretament entre les posicions 3873 i 3902. L'amplificació per PCR (reacció en cadena de la polimerasa) d'aquesta zona permet observar diferents al·lels. En la bibliografia se'n descriuen 8 compresos entre 184 i 166 pb, anomenats desde **B1 (184 pb)** fins a **B8 (166 pb)** (Stoffel i Bell, 1992). La numeració d'aquesta nomenclatura no indica el número de repeticions.

L'**RFLP TaqI** s'origina a causa d'una substitució A→C dins de l'exó 9 (en la posició 20500 del gen, a l'antic exó viii segons Zimrin et al. 1990) (figura I.13). Malgrat trobar-se dins d'una zona codificant, aquesta substitució és silent. Els dos al·lells sota els quals es pot presentar aquest polimorfisme són **T1** i **T2**. L'al·lel **T1** es correspon amb 20500C generant la diana de restricció *TaqI*, mentre que l'al·lel **T2** es correspon a 20500A que elimina la diana de restricció (Zimrin et al. 1990).

### C.2.2. GPIIb

El gen GPIIb també anomenat ITGA2B, integrina  $\alpha_{IIb}$  o CD41B s'extén al llarg de 17.2 kilobases, es troba dividit en 30 exons amb tamanys compresos entre 45 i 249 pb (figura I.13).

De la mateixa manera que GPIIIa, aquest gen es caracteritza perque la seva part 5' no posseeix les caixes TATA i CAAT característiques dels gens transcrits per ARN polimerasa II. Experiments *in vitro* han demostrat que la transcripció d'aquest gen ve controlada a través de la seqüència GATA localitzada a la posició -463. Aquesta seqüència és reconeguda pel factor de transcripció GATA-1 que està implicat en la formació dels llinatges megacariocític i eritrocític durant l'hematopoiesi (Martin et al. 1993).

La seva seqüència mostra un 41% d'homologia amb els gens que codifiquen per les subunitats  $\alpha$  del receptor de la fibronectina i de la vitronectina.

En la present tesi els polimorfismes estudiats dins d'aquest gen van ser una inserció/deleció de 9 pb i una substitució C→T a la posició 3063.

El polimorfisme **9 pb INS/DEL** consisteix en la presència (al·lel **I**) o l'absència (al·lel **D**) de la seqüència de 9 pb CAGGGGCTC (Peyruchaud et al. 1995). Aquest polimorfisme es troba localitzat a l'inici de l'intró 21 del gen (figura I.13).

El polimorfisme **3063C→T**, consisteix en una substitució C→T en la posició 3063 que correspon al tercer nucleòtid de l'exó 30 del gen (Ruan et al. 1998) (figura I.13). Aquest canvi no produeix cap substitució d'aminoàcid. Els dos al·lells possibles són anomenats **3063C** i **3063T**.

### GPIIIa i GPIIb (17q21.32)

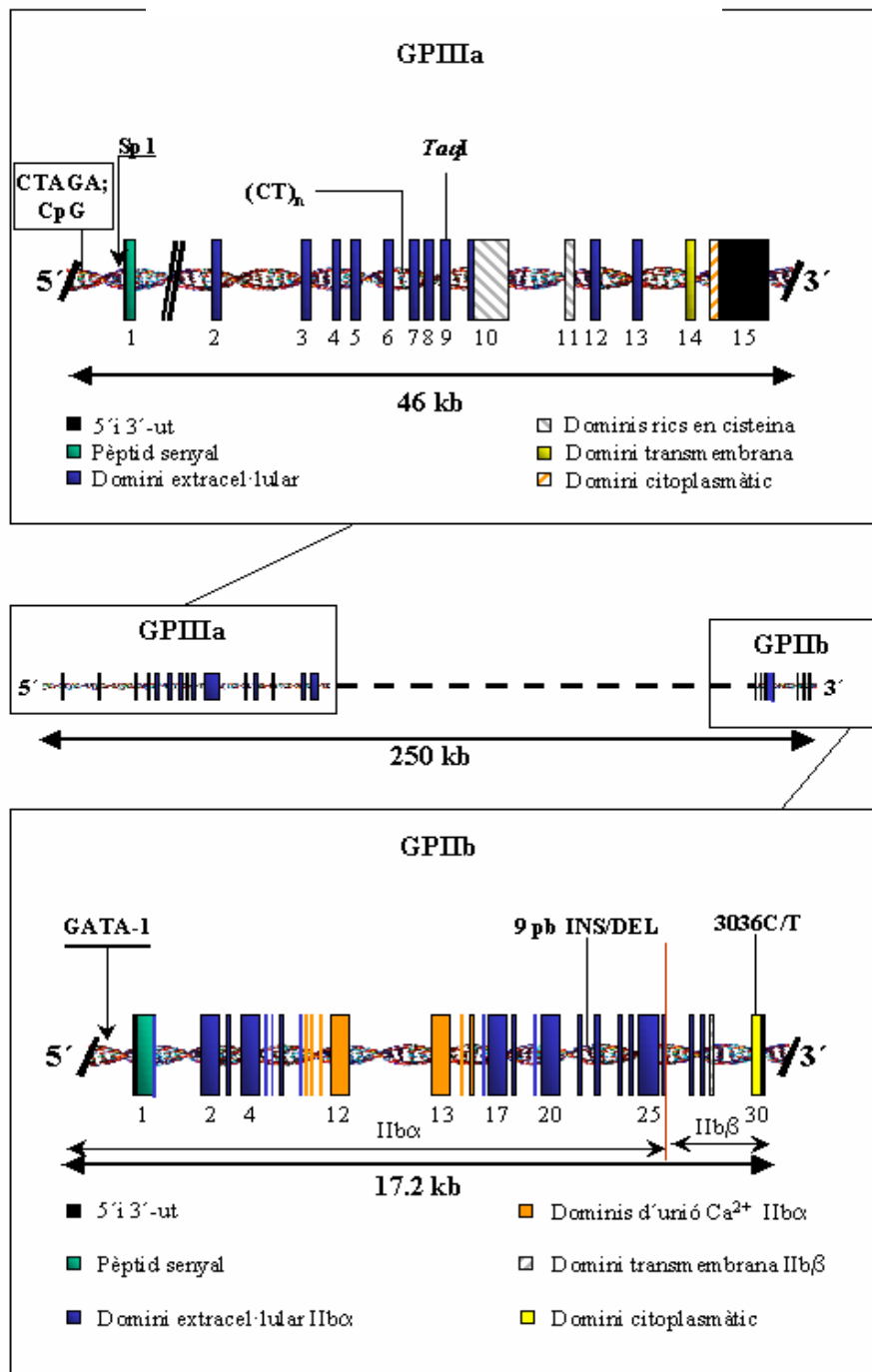


Figura I.13. Estructura dels gens GPIIIa i GPIIb humans. Els exons són representats mitjançant rectangles, sota dels mateixos s'indica la seva numeració (en el cas de GPIIb només alguns exons són numerats). Per sobre d'ambdós gens s'indica la presència d'elements reguladors de la transcripció i en negreta la posició dels seus polimorfismes (VNTR (CT)<sub>n</sub> i RFLP TaqI per GPIIIa i 9 pb INS/DEL i 3036C/T per GPIIb).

## D. ACTIVADOR TISSULAR DEL PLASMINOGEN

### D.1. LA PROTEÏNA

L'activador tissular del plasminogen, també conegut com PLAT o t-PA, juga un paper clau en el procés de la fibrinolisi donat que provoca l'activació del plasminogen convertint-lo en plasmina, una proteasa de serina que destrueix la xarxa de fibrina que constitueix l'esquelet dels coàguls. A través de la plasmina, t-PA es troba implicat, a més, en processos d'ovulació, migració cel·lular, angiogènesi i metàstasi tumoral.

t-PA és una proteasa de serina sintetitzada principalment en les cèl·lules endotelials. Com a proteïna madura és una glucoproteïna de cadena simple de 530 aminoàcids amb una seqüència *leader* de 32 residus que s'elimina prèviament a la seva secreció. La seva activació es dona principalment a través de la plasmina, encara que la calicreïna plasmàtica i el factor Xa poden també activar t-PA, per digestió de l'enllaç peptídic Arg<sub>276</sub>-Ile<sub>275</sub>, donant lloc a l'enzim actiu format per dues cadenes (A i B) unides per ponts disulfur (figura I.14).

La cadena N-terminal A, té un pes molecular de 37 kDa i inclou un domini digital (residus 4-50) molt similar al mateix tipus de domini en la fibronectina, un domini del tipus factor de creixement (residus 50-87) i finalment un tercer domini que inclou dos estructures tipus *kringle* (residus 87-176 i 176-262) clarament relacionades amb les estructures *kringle* presents a protrombina, plasminogen, activador del plasminogen tipus uroquinasa (u-PA) i factor XII (figura I.14).

La cadena C-terminal B, té un pes molecular de 33 kDa, conté el domini catalític comprès entre el residus 276-527 amb un 40% d'homologia amb dominis catalítics d'altres proteases de serina. La zona catalítica està composta pels residus His<sub>322</sub>, Asp<sub>371</sub> i Ser<sub>478</sub> (figura I.14).

L'eficiència catalítica del t-PA a l'hora d'activar plasminogen es veu altament incrementada en presència de fibrina. Això es deu a que t-PA activa el plasminogen que es troba en contacte amb la superfície del polímer de fibrina. La unió del t-PA a la fibrina es dona a través dels dominis digital i segon *kringle*. S'ha proposat que aquest darrer és el principal responsable de l'efecte estimulador de la fibrina sobre l'activació del plasminogen, encara que altres estudis afirmen que ambdós *kringles* presenten una capacitat equivalent per intervenir en l'estimulació de l'eficiència catalítica del t-PA per part de la fibrina (Collen i Lijnen, 1998).

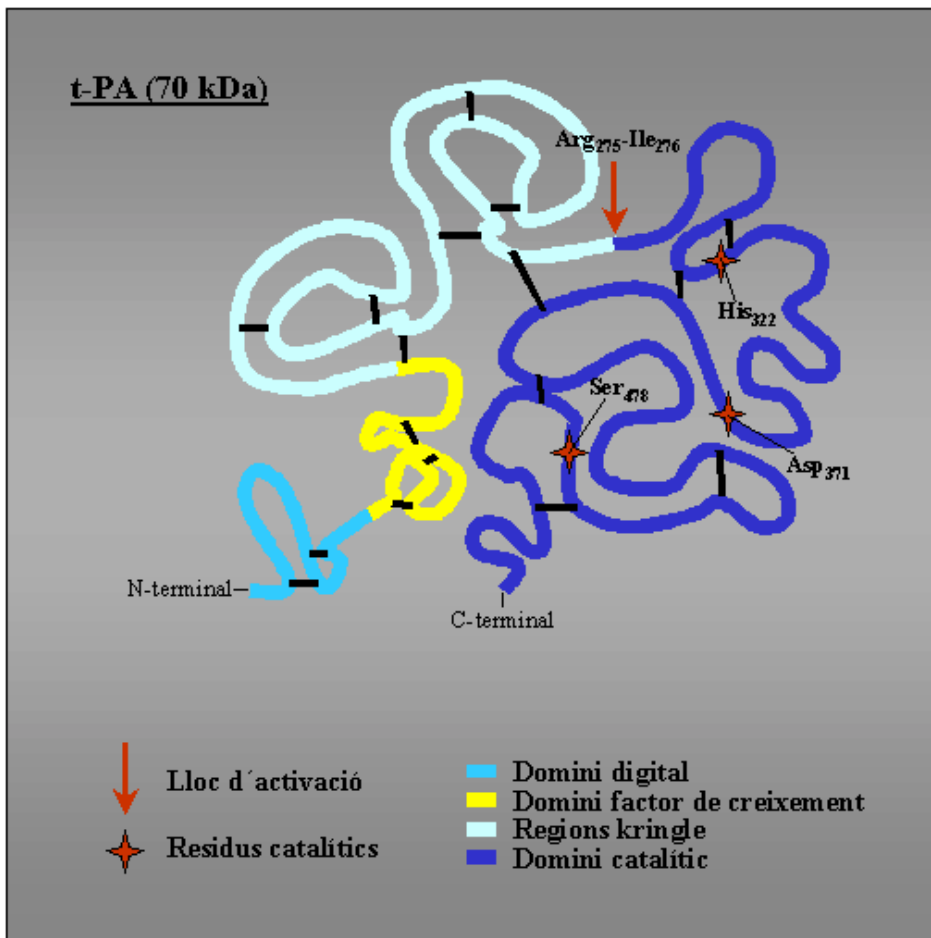


Figura I.14. Estructura de l'activador tissular del plasminogen humà. Les barres negres indiquen enllaços disulfur. Basat en Collen i Lijnen (1998).

## D.2. EL GEN PLAT, POLIMORFISMES ESTUDIATS I LLUR NOMENCLATURA

El gen PLAT es troba localitzat al cromosoma 8, en la posició 8p12. Té una longitud de 32720 pb desde l'inici de transcripció fins el lloc de poliadenilació. Tenint en compte les seqüències d'ADN localitzades a 5' i 3' presenta una longitud total de 36594 pb.

El gen es troba dividit en 14 exons que presenten longituds compreses entre 43 i 914 pb (figura I.15). La caixa TATA es presenta entre les posicions -22 i -29 sota la forma TATAAAAA i la caixa CAAT es troba entre les posicions -112 i -116 sota la forma CAATG. Dins dels introns i regió 5' flanquejant hi trobem un total de 28 còpies de la



seqüència repetitiva *Alu* i una sola repetició del tipus *KpnI*. El senyal de poliadenilació (AATAAA) es troba entre les posicions 32688 i 32693.

El gen PLAT presenta grans similituds a nivell de dominis codificats i localització de seqüències intròniques dins dels codis d'aquests dominis amb el gen de l'activador del plasminogen tipus uroquinasa (u-PA). Això indica que aquests dos gens es troben estretament relacionats en la seva evolució. PLAT, a més, presenta segments no catalítics comuns a moltes de les proteases que formen els sistemes de coagulació i fibrinolisi, suggerint que aquest gen es va originar a través d'un procés d'*exon shuffling* (Freizner Degen et al. 1986).

En la present tesi va ser estudiada la variabilitat generada dins d'aquest gen per una inserció *Alu* polimòrfica i dos microsatèl·lits.

La inserció *Alu* polimòrfica estudiada rep el nom de **TPA25** i es localitza a l'intró 8 (figura I.15). Són possibles dos al·lels: l'al·lel **I** que indica la presència de la inserció *Alu* i l'al·lel **D** que indica la deleció de la inserció *Alu*. Tishkoff i col·laboradors (1996b) van descobrir que els RFLPs *EcoRI*, *HincII*, *PstI*, *TaqI* i *XmnI* previament descrits al gen PLAT eren, en realitat, producte de la inserció d'aquesta seqüència *Alu*.

Un dels microsatèl·lits estudiats correspon a la repetició d'un dinucleòtid que va ésser descrit sota la forma **(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub>** i que es troba localitzat a dins de l'intró 1 a la posició 7174 (figura I.15). L'amplificació per PCR del fragment que conté aquest VNTR permet observar al·lels de mides diferents. A la bibliografia se'n descriuen 12 amb mides compreses entre 106 i 138 pb. Aquests al·lels es numeren del **1 (106 pb)** al **12 (138 pb)** (Thomas i Drayna, 1992). Aquesta numeració no indica el número de repeticions.

L'altre microsatèl·lit també consisteix en la repetició d'un dinucleòtid, que va ser descrit sota la forma **(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>**. Es troba localitzat a la posició 16911 també a l'intró 1 (figura I.15). L'amplificació per PCR del fragment que conté aquest VNTR permet observar al·lels de mides diferents. A la bibliografia se'n descriuen 18 amb mides compreses entre 149 i 105 pb. Aquests al·lels s'anomenen de **D1 (149 pb)** a **D18 (105 pb)** (Sadler et al. 1991). Aquesta numeració no indica el número de repeticions.

## PLAT (8p12)

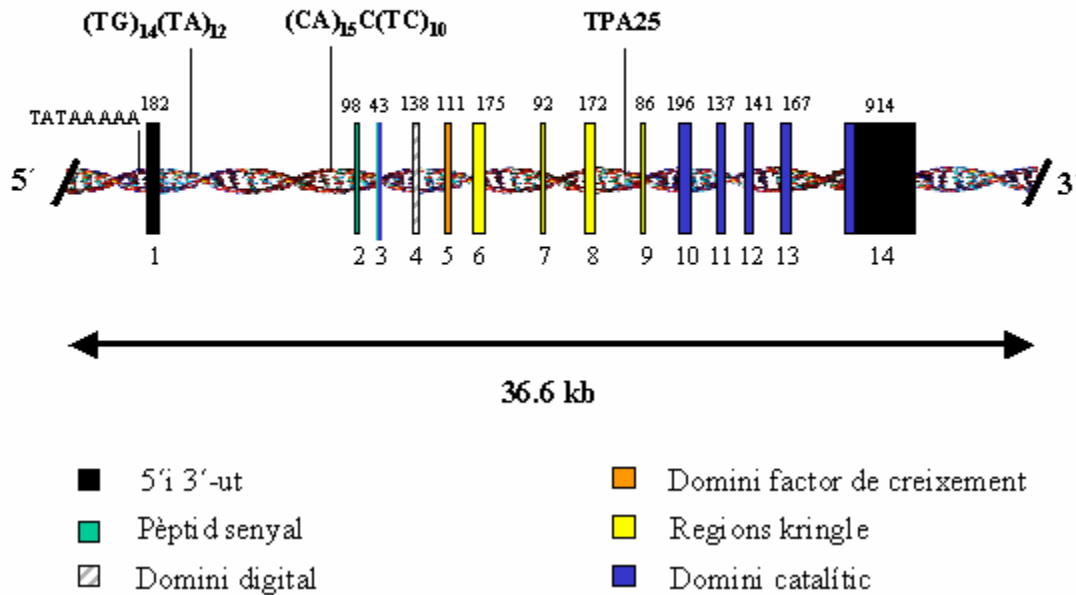


Figura I.15. Estructura del gen *PLAT* humà. Els exons es representen mitjançant rectangles. Per sota dels mateixos s'indica la seva numeració i en la part superior s'indica la grandària en pb. En negreta per sobre del gen s'indica la posició dels VNTRs  $(TG)_{14}(TA)_{12}$  i  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  així com de la inserció *Alu* polimòrfica *TPA25*.

## E. INHIBIDOR TIPUS 1 DE L'ACTIVADOR DEL PLASMINOGEN

### E.1. LA PROTEÏNA

L'inhibidor tipus 1 de l'activador del plasminogen, també conegut com PAI-1, és una proteïna molt important en el control de la fibrinolisi ja que és el principal inhibidor fisiològic del t-PA. En el plasma PAI-1 es comporta com una proteïna de fase aguda observant-se increments de la seva activitat després d'un infart de miocardi, cirurgia o lesions greus. A més, la seva activitat en plasma es pot induir sota estímuls com ara la presència d'endotoxina, interleucina-1 (IL-1) i factor de necrosi tumoral (TNF). La seva síntesi també pot ser induïda a través d'estímuls cel·lulars com la trombina, mediadors inflamatoris i glucocorticoids.

PAI-1 pertany a la superfamília dels inhibidors de proteases de serina (SERPIN) d'entre els quals destaca per la seva gran flexibilitat conformacional, ja que es sintetitza com una molècula activa que espontàniament pot convertir-se en una forma inactiva o latent.

La síntesi de PAI-1 es dona principalment en les cèl·lules endotelials, encara que com a glucoproteïna és també present en els grànuls- $\alpha$  de les plaquetes, als hepatòcits i a les cèl·lules musculars llises. PAI-1 presenta un pèptid senyal format per 23 residus. Com a proteïna madura està format per un total de 379 aminoàcids que estructuralment s'organitzen en làmines  $\beta$  i hèlix  $\alpha$  amb tres llocs potencials de N-glicosilació i un pes molecular de 50 kDa. El lloc actiu de la proteïna es troba localitzat en una estructura anomenada "llaç estret" que inclou 19 residus ( $P_1$ - $P_{19}$ ) localitzats a la part C-terminal de la molècula (figura I.16). El primer residu d'aquest llaç ( $P_1$ , una arginina) mimetitza el substrate real de t-PA, encara que l'especificitat de PAI-1 envers t-PA també inclou residus no localitzats en aquest llaç.

Quan PAI-1 es troba sota la forma activa inhibeix t-PA a través de la formació d'un complex estable inactiu, encara que actualment no es coneixen amb gran detall els mecanismes a través dels quals els membres de la superfamília SERPIN inhibeixen les seves proteases diana. Malgrat que inicialment la formació del complex amb t-PA és reversible, en un segon pas la proteasa de serina proteolitza el lloc actiu de PAI-1 en un punt anomenat  $P_1$ - $P_1'$  (figura I.16). Aquest fet desencadena la formació d'un complex estable entre PAI-1 i t-PA mitjançant enllaços covalents i provoca la distorsió de la tríada catalítica de t-PA induint la seva inactivació. La forma latent de PAI-1 es caracteritza perquè l'extrem N-terminal del "llaç estret", incloent els residus de  $P_{16}$  fins a  $P_4$ , s'inserta dins la làmina  $\beta A$ , la més gran de l'estructura, fet que enmascara el lloc de proteolisi  $P_1$ - $P_1'$  i anul·la l'activitat de PAI-1.

L'activitat de PAI-1 depèn també dels residus Glu<sub>128</sub>-Val<sub>129</sub>-Glu<sub>130</sub>-Arg<sub>131</sub> i Lys<sub>154</sub> que formen part de la regió bisagra entre la  $\alpha$ -hèlix F i la major part de la molècula (figura I.16). Aquests residus serien importants de cara al manteniment de la estructura tridimensional necessària per a la interacció irreversible entre PAI-1 i t-PA i la inhibició d'aquest darrer (Bijmens et al. 2000).

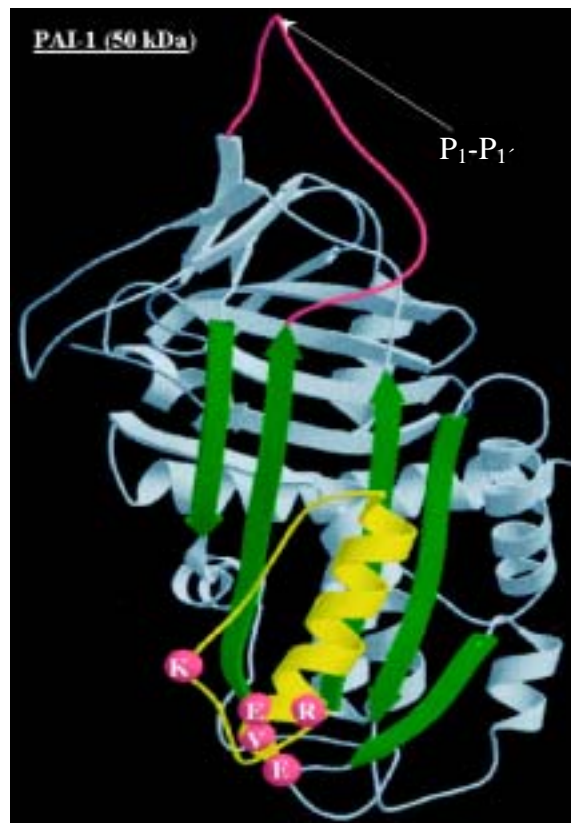


Figura I.16. Estructura de l'inhibidor tipus 1 de l'activador del plasminogen humà. En color rosa es representa l'anomenat "llaç estret" que conté el lloc actiu P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'. En color verd es representa la làmina β A. En color groc es representa l'α hèlix F. A la part inferior de la figura s'indica la posició dels residus Glu<sub>128</sub>-Val<sub>129</sub>-Glu<sub>130</sub>-Arg<sub>131</sub> i Lys<sub>154</sub> (en codi d'una sola lletra) de la regió frontissa entre l'α hèlix F i la resta de la molècula. (Modificació a partir de Bijmens et al. 2000).

## E.2. EL GEN PAI-1, POLIMORFISMES ESTUDIATS I LLUR NOMENCLATURA

El gen PAI-1, també conegut sota el nom de PLANH1, es troba en el cromosoma 7 a la posició 7q21.3-q22 i s'extén al llarg de 12165 pb. La regió codificant es troba dividida en 9 exons amb longituds compreses entre 84 i 1871 pb (figura I.17).

A part de la caixa TATA sota la forma TATAA (posició -28 fins -24), i dues possibles caixes CAAT, sota les formes CCAAGT (posició -84 fins -81) i CCAAT (posició -218 fins -214), en el gen PAI-1 hi ha altres elements putatius per a la regulació de la seva transcripció. És el cas de l'element Z-ADN format per repeticions (CA)<sub>n</sub> (localitzat entre les posicions -196 i -153 i dins de l'intró 4 entre les posicions 6321 i 6358) i dues còpies

invertides de la seqüència reguladora de gens codificants per proteïnes de fase aguda CTGGGA (posició 439 fins 444, intró 1) i TCCCAG (posició -141 fins -136) (figura I.17). Aquests dos tipus d'elements estarien implicats en el comportament de PAI-1 com una proteïna de fase aguda (Bosma et al. 1988). Cal destacar també que la regió 5' de gen compresa entre -1520 i -1008 presenta un 81% d'identitat de seqüència amb la regió compresa entre -3491 i -2977 del gen PLAT. Aquest fet podria respondre a una expressió coordinada d'aquests dos gens, ja que canvis en els nivells plasmàtics de t-PA en molts casos són acompanyats pels corresponents canvis en l'activitat de PAI-1 (Bosma et al. 1988).

Aquest gen presenta un total de 12 repeticions del tipus *Alu*, distribuïdes entre els introns i a la regió 3' no codificant.

Strandberg i col·laboradors (1988) van alinear l'estructura gènica de PAI-1 amb la d'altres 4 membres de la superfamília SERPIN. Van observar que molts introns es localitzaven entre els subdominis de les proteïnes analitzades sense interrompre'ls. Aquest fet va suggerir que aquesta família de proteïnes es va originar a partir de la duplicació d'un gen ancestral, contenint introns alguns dels quals s'han anat perdent durant l'evolució. La divergència de la superfamília SERPIN a partir d'aquest gen ancestral s'hauria produït fa 500 milions d'anys.

En la present tesi va ésser analitzada la variació presentada per un VNTR (CA)<sub>n</sub> i un RFLP *HindIII* d'aquest gen.

El VNTR (CA)<sub>n</sub> és un microsatèl·lit producte de la repetició d'un dinucleòtid, que es troba localitzat a la posició 6321 a l'intró 4 del gen (figura I.17). Aquest VNTR s'ha identificat com a putatiu element regulador de l'expressió del gen (Bosma et al. 1988). L'amplificació per PCR de la zona que conté aquest microsatèl·lit genera 8 fragments de mides compreses entre **199** i **213 pb**. Aquests fragments constitueixen 8 al·lells que es numeren del **1** al **8** respectivament, donant-se una diferència d'una repetició entre dos al·lells consecutius. La numeració d'aquesta nomenclatura no indica el número de repeticions (Dawson et al. 1991).

L'RFLP *HindIII* es troba localitzat a la regió 3' gen (Dawson et al. 1991). Per tal de mantenir una unitat amb les nomenclatures dels altres RFLPs analitzats en aquest treball, s'ha decidit anomenar els dos al·lells possibles per aquest polimorfisme com **Hd1** (per la presència de la diana *HindIII*) i **Hd2** (per l'absència de la diana de restricció).

**PAI-1 (7q21.3-q22)**

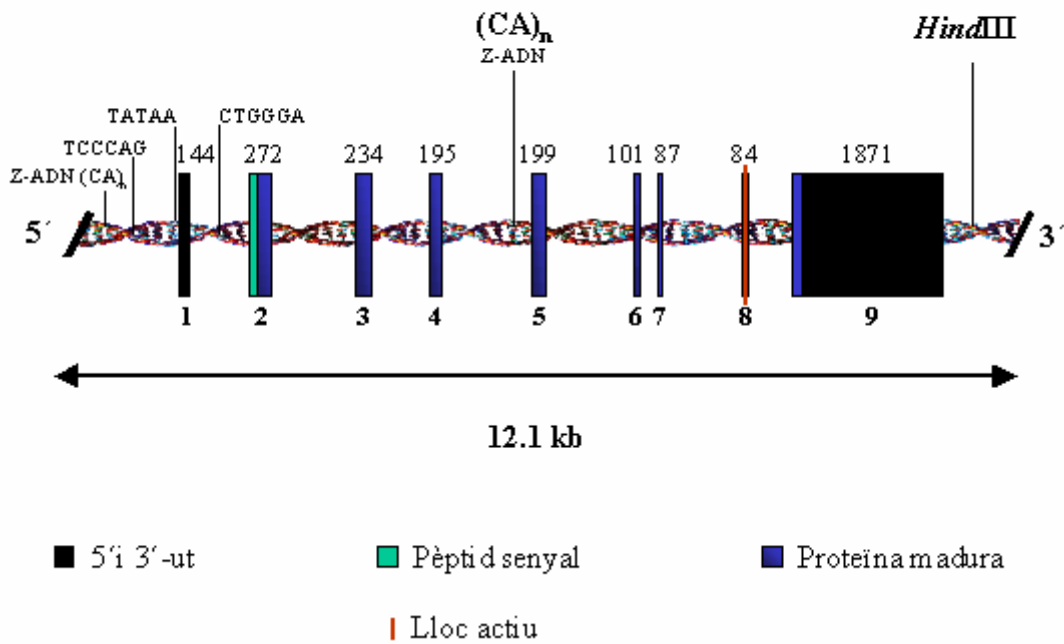


Figura I.17. Estructura del gen PAI-1 humà. Els exons es troben representats per rectangles, per sota dels mateixos s'indica la seva numeració i per sobre la seva longitud en pb. Per sobre del gen es mostra la posició de la caixa TATA i dels putatius elements reguladors de la transcripció. En negreta per sobre del gen s'indica la posició del VNTR (CA)<sub>n</sub> i de l'RFLP HindIII.

## **4. PAPER DELS SISTEMES DE COAGULACIÓ I FIBRINOLISI EN LES BASES FISIOPATOLÒGIQUES DE LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

Els processos de coagulació i fibrinolisi tenen una funció vital a l'organisme. Per contra, un funcionament anormal dels mateixos pot estar implicat en les bases fisiopatològiques de la CAI. La hipotesi de que els processos trombòtics estan implicats en l'aterogènesi ja va ser formulada per Rokitansky l'any 1852 i més tard represa per Duguid l'any 1948. Sembla raonable assumir que un desajustament de l'hemostasi degut a un increment de l'activitat coagulant, una defectuosa activitat fibrinolítica o una combinació d'ambdues facilitaria l'aparició d'oclusions trombòtiques completes, donada la influència d'aquests processos sobre el creixement i el tamany final del trombe en desenvolupament. A més, existeixen evidències experimentals de que la deposició de fibrina a la superfície de l'íntima arterial intervé en la formació i creixement de plaques d'ateroma.

Com ja s'ha vist en aquesta introducció, es donen fenòmens basals de formació i degradació de fibrina de forma natural. En aquestes circumstàncies, la via extrínseca de la coagulació és la responsable de l'activació basal del factor IX, factor X i protrombina, ja que s'ha demostrat que aquesta via és constitutivament activa (Rosenberg i Aird, 1998). Només quan es dona la presència d'un estimul trombòtic, la via extrínseca produeix suficient factor Xa i trombina com per activar la via intrínseca, encara que aquesta última pot també ser activada de forma independent en presència de superfícies carregades negativament. D'aquesta manera, entre les dues vies es genera un brot d'activitat de trombina que desborda els mecanismes normals d'anticoagulació i provoca la formació local d'un trombe.

L'excés d'activació de la coagulació s'anomena **estat d'hipercoagulació**. Aquest estat es caracteritza per un increment crònic de la generació de factor Xa, sense un increment, o en tot cas molt lleu, dels valors de trombina lliure. Els pacients que presentin aquest tipus d'alteració es trobarien més propers al llindar d'activació de la via intrínseca latent davant d'un estímul trombòtic, donant lloc a un brot d'activitat de trombina desmesurat que desbordaria els mecanismes d'anticoagulació normals provocant una trombosi arterial o venosa. La definició de l'estat d'hipercoagulació ha estat validada en pacients amb estats d'hipercoagulació congènits per deficiències de les proteïnes C i S i també en persones sanes a mesura que envelleixen. L'estat d'hipercoagulació s'observa també en pacients d'angina de pit inestable i infart de miocardi, existint indicis de que aquest estat podria ser

previ a l'inici de la síndrome coronària aguda i en part responsable d'ella (Rosenberg i Aird, 1998). En la circulació coronària, l'estat d'hipercoagulació actuaria com un important mecanisme potenciador del desenvolupament d'una oclusió trombòtica final, causant de la isquèmia de la zona irrigada pel vas afectat, allí on espontàniament s'ha produït la ruptura d'una placa ateroscleròtica.

Els processos implicats en l'hemostasi també podrien estar a la base dels mecanismes fisiopatològics que fan de la lipoproteïna (a) un factor de risc per la CAI quan es troba a nivells plasmàtics elevats. L'interés d'aquest element del metabolisme lipídic radica en la gran homologia entre la seqüència aminoacídica de l'apolipoproteïna (a) i l'estructura del plasminogen. Aquesta homologia fa que se la pugui relacionar amb processos d'inhibició competitiva de l'unió entre el plasminogen i el fibrinogen o la fibrina. A més, s'ha pogut observar com la lipoproteïna (a) pot interferir en la lisis de coàguls mitjançada per t-PA. Aquests fets farien pensar en un paper protrombòtic de la lipoproteïna (a) a través d'una interferència en el través de la fibrinolisi (Hamsten, 1993).

La utilització com a caràcters quantitius indicadors de risc en la CAI dels nivells plasmàtics (en el cas de proteïnes circulants) o d'expressió en membranes (en el cas de receptors) de les proteïnes que intervenen en el procés de l'hemostasi, ha posat de manifest que nivells alterats d'aquestes proteïnes (especialment fibrinogen, factor VII, vWF, PAI-1 i t-PA) presenten interaccions amb factors de risc clàssics per a la malaltia arterial coronària com ara tabaquisme, hiperlipoproteinèmia, hipertensió, hiperinsulinèmia, diabetes, obesitat i edat avançada. A més, els nivells alterats d'aquestes proteïnes són per si mateixos un factor de risc per la CAI (per a una revisió del tema consultar Hamsten, 1993; Grant i Humphries, 1999; McCallum i Meade, 1999; Lane i Grant, 2000).



#### **4.1. PAPER POTENCIAL EN LES BASES FISIOPATOLÒGIQUES DE LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA DELS GENS CANDIDATS TRIATS, ESTUDIS PREVIS I INTERACCIONS DESCRITES AMB FACTORS DE RISC PER A LA MALALTIA**

A continuació s'analitza l'interès dels gens candidats escollits en aquest treball en funció de la ubicació del seu producte proteic dins dels processos de coagulació i fibrinolisi. A més, s'exposen els possibles mecanismes fisiopatològics en la base de la CAI en els que es troben implicats i les interaccions descrites amb altres factors de risc per la malaltia.

##### **A. FACTOR VII**

Com ja s'ha vist, la via extrínseca juga un paper fonamental en la iniciació del procés de la coagulació donat que és constitutivament activa. El gen FVII va ésser escollit per ser estudiat en aquest treball per trobar-se el seu producte proteic implicat en l'inici d'aquesta via.

Els principals estudis prospectius realitzats per tal d'establir els factors de risc per la malaltia arterial coronària ofereixen resultats controvertits respecte al paper que juguen els nivells plasmàtics de factor VII, així com d'activitat coagulant del factor VII (FVII:C) en l'origen de la CAI. L'interès en la relació entre el factor VII i la malaltia cardiovascular va ser despertat pel descobriment al *Northwick Park Heart Study* (Meade et al. 1986) de l'associació entre la FVII:C i esdeveniments de la CAI amb desenllaç fatal. Aquest resultat va ser només parcialment confirmat a l'estudi *PROCAM* (Heinrich et al. 1994). Per altra banda, a l'*Edinburgh Artery Study* (Smith et al. 1997) el factor VII no es va mostrar com a factor de risc independent per a la malaltia coronària i a l'estudi *ECTIM* (Lane et al. 1996) els controls van mostrar nivells plasmàtics de factor VII uniformement més alts que els pacients.

Les implicacions fisiopatològiques d'uns nivells plasmàtics incrementats de FVII:C, que han mostrat relació amb nivells plasmàtics incrementats de factor VII com a antigen, es basarien en l'aparició d'un estat d'hipercoagulació com a conseqüència d'una excessiva activació de la via extrínseca. Aquest fet faria que davant l'estímul trombòtic generat per l'exposició de factor tissular al torrent sanguini com a conseqüència de la ruptura d'una placa d'ateroma, es generés una reacció trombòtica descontrolada en aquesta zona. Això conduiria a la formació d'un trombe de gran tamany, donat que els mecanismes

anticoagulants es veurien desbordats en la tasca de limitar l'extensió del mateix, que acabaria per obstruir l'artèria i produiria l'isquèmia. A part d'aquestes implicacions en la trombosi una excessiva activació de la via extrínseca també intervindria indirectament en l'aterosclerosi afavorint la deposició de fibrina. Tal com es veurà a l'apartat corresponent al fibrinogen, la deposició de fibrina en les artèries afavoreix l'aparició i creixement d'ateromes.

En els estudis en que s'observen nivells incrementats de FVII:C en individus amb risc cardiovascular (pacients amb angina de pit o supervivents d'infart de miocardi) s'observa que aquest increment es deu principalment a una fracció de FVII:C que pot ser inactivada sota l'acció de la fosfolipasa C. Aquest fet va fer sospitar que existia algun tipus d'interacció entre el factor VII i els lípids plasmàtics sensibles a l'acció de la fosfolipasa C que repercutia en un increment de FVII:C. En conseqüència, l'activitat de la fosfolipasa C provocaria una disrupció d'aquesta interacció provocant una disminució de la FVII:C. Malgrat tot, estudis *in vitro* han mostrat que l'addició de quilomicrons a plasma amb concentracions constants de factor VII no genera un increment de FVII:C, suggerint que la disminució de la FVII:C duta a terme per la fosfolipasa C es deu a que aquest enzim provoca transformacions de les lipoproteïnes riques en triglicèrids que les fan capaces d'unir-se a factor VII dificultant la seva activació (Petersen et al. 1995). Cal destacar que en molts estudis epidemiològics s'ha mostrat una correlació positiva entre els nivells plasmàtics de FVII:C i els lípids plasmàtics, més concretament amb lipoproteïnes de gran tamany amb càrrega negativa, LDLs, VLDLs, quilomicrons i els seus triglicèrids. Aquestes relacions s'han mostrat influenciades per la ingesta de lípids en la dieta. S'ha demostrat que la lipòlisi d'aquest tipus de partícules a través de l'acció de la lipoproteïna lipasa genera superfícies lipídiques carregades negativament, que provocarien l'activació del factor VII a través de la via intrínseca. Estudis en individus amb hipertrigliceridèmia crònica han mostrat que una activació sostinguda de factor VII provoca un increment de la producció de factor VII a través d'un cicle de retroalimentació positiva provocat per l'alliberament del fragment de protrombina  $F_{1+2}$  que ha mostrat ser estimulador de la síntesi de factors de coagulació dependents de vitamina K (entre ells el factor VII). Aquestes observacions podrien donar explicació a la relació existent entre la hipertrigliceridèmia i les malalties arterials trombòtiques com l'infart agut de miocardi (Grant i Humphries, 1999).

Pel que fa als factors genètics, fins al moment s'han identificat 5 polimorfismes al llarg del gen FVII. Alguns d'ells han estat sotmesos a estudi per tal de buscar associacions dels seus al·lels amb els nivells plasmàtics de factor VII o de FVII:C i en darrer terme amb risc per la malaltia cardiovascular. Una substitució A/G al codó 353 del exó 8 ha estat el polimorfisme més estudiat donat que provoca un canvi Arg/Gln en aquesta posició. Es va pensar que podria afectar la FVII:C, però, no s'ha mostrat cap associació consistent amb nivells alterats de factor VII, FVII:C ni amb el risc per la malaltia (Lane i Grant, 2000).

Dels polimorfismes que s'analitzen a la present tesi, el FVII -323 10 pb INS/DEL presenta un fort desequilibri de lligament amb el polimorfisme Arg353Gln (Grant i Humphries, 1999). El seu interès, però, radica en el seu posicionament a 5', aprop de les seqüències reguladores de la transcripció del gen (figura I.9), essent susceptible de presentar associacions amb els nivells d'expressió del gen i per tant amb els nivells plasmàtics de factor VII i de FVII:C. Seguint aquest raonament, Pollak i col·laboradors (1996) van observar, en un estudi *in vitro*, que la inserció del decanucleòtid provoca una davallada del 33% en l'activitat del promotor del gen. En el cas de FVII HVR4, malgrat estar situat en un intró (intró G), el seu interès radica en que es troba a la zona del gen que codifica pel domini proteasa de serina de la proteïna madura, fet que el fa susceptible de presentar associació amb els nivells de FVII:C en el cas de que es trobés en desequilibri de lligament amb un locus que realment sí provoqués una alteració d'aquest domini. A més, un estudi *in vitro* realitzat per Pinotti i col·laboradors (2000) ha detectat una relació positiva entre el número de repeticions de 37 pb i els nivells d'expressió de ARNm del gen. Aquest tipus de relació entre el número de repeticions de HVR4 i els nivells plasmàtics de factor VII va ser confirmada en una mostra de 438 individus. Els autors hipotetitzen que el polimorfisme afecta l'eficiència del procés d'*splicing* donat que cada repetició conté 2 triplets G que poden actuar com a potenciadors intrònics d'aquest procés, fet que faria que s'incrementés la unió de factors d'*splicing* en incrementar-se el número de repeticions.

Les possibles associacions d'aquests polimorfismes amb els nivells plasmàtics de factor VII i de FVII:C serien la base per explicar les associacions dels seus al·lels amb el risc per la CAI.

## B. FIBRINOGEN

Els gens codificants pel fibrinogen estudiats en la present tesi van ésser triats donat el paper central que juga aquesta proteïna dins de l'hemostasi. La seva transformació en fibrina i posterior polimerització són el darrer pas del procés de la coagulació a on convergeixen les vies intrínseca i extrínseca a través de la via comú. A més, el fenomen de l'agregació plaquetaria depén en gran mesura de l'interacció de la fibrina amb el receptor plaquetari IIb/IIIa també estudiat en el present treball. El biopolímer de fibrina constitueix l'esquelet bàsic del coàgul que fa de tap per evitar la pèrdua de sang en el cas d'una lesió vascular, però que en el cas de la CAI provoca l'obstrucció final que condueix a la isquèmia.

Diversos estudis prospectius han relacionat nivells plasmàtics elevats de fibrinogen amb les manifestacions clíniques de la CAI. D'aquests estudis destaquen per la seva importància el *Northwick Park Heart Study* (Meade et al. 1986), l'estudi Framingham (Kannel, 1992), l'*Scottish Heart Health Study* (Lee et al. 1993), l'estudi *PROCAM* (Heinrich et al. 1994), l'estudi *ECAT* (Thompson et al. 1995a) i, més recentment, el *Physicians' Health Study* (Ma et al. 1999). Com a conseqüència, s'han realitzat molts estudis per tal d'aclarir el paper fisiopatològic del fibrinogen en la malaltia arterial coronària quan aquest es presenta en concentracions plasmàtiques considerades altes. Hamsten (1993), Fay i Ginsburg (1994), Smith i Thompson (1994) i, més recentment, Grant i Humphries (1999), McCallum i Meade (1999) i Lane i Grant (2000), entre d'altres, han elaborat extenses revisions sobre aquest tema. A continuació es resumeixen les principals conclusions a les que s'han arribat en aquests treballs.

El fibrinogen és la proteïna de l'hemostasi per a la que s'han descrit més mecanismes a través dels quals pot intervenir en l'aparició i desenvolupament de la CAI. Existeixen diversos mecanismes potencials mitjançant els quals una concentració elevada de fibrinogen en plasma pot contribuir al desenvolupament de la trombosi coronària:

- Aquesta proteïna és un important determinant de la viscositat de la sang donat el seu relativament gran tamany (340 kDa) i la seva elevada concentració a plasma (al voltant de 270 mg/dl). Una viscositat elevada de la sang pot donar predisposició cap a trombosi per alteració del fluxe sanguini.

- Estudis *in vitro* demostren que l'agregabilitat plaquetària es troba associada positivament amb els nivells plasmàtics de fibrinogen.

A més, existeixen mecanismes a través dels quals el fibrinogen pot contribuir al desenvolupament de lesions ateromatoses si es troba en concentracions plasmàtiques elevades:

- Un increment local de la formació de fibrina ha estat associat a lesions a nivell de les cèl·lules endotelials. Estudis *in vitro* han demostrat que el gel de fibrina pot obstruir l'intercanvi d'oxigen i nutrients cap a les cèl·lules endotelials provocant una desorganització de la monocapa que forma l'endoteli. Aquest fet dóna lloc a un edema en l'íntima arterial que, juntament amb la proliferació de cèl·lules musculars llises, caracteritzen estadis molt primerencs de les lesions ateromatoses.
- Els pèptids despresos en la transformació del fibrinogen a fibrina (fibrinopèptids A i B) així com els que es desprenen en la degradació del fibrinogen o la fibrina per part de la plasmina (fragments X i Y, fibrinopèptids D i E) tenen propietats mitogèniques i quimiotàctiques provocant la proliferació i migració de les cèl·lules musculars llises desde la túnica mitja a l'íntima arterial. A més, existeixen evidències de que el fibrinopèptid E estimula als macròfags i cèl·lules del teixit connectiu a la producció de IL-6, la qual cosa provoca una retroalimentació positiva en la producció hepàtica de fibrinogen i altres proteïnes de fase aguda.
- La xarxa de fibrina constitueix una estructura per sobre de la qual les cèl·lules musculars llises de la túnica mitja arterial poden migrar cap a l'íntima arterial. Aquest fenomen és possible gràcies a la presència de l'integrina  $\alpha_V\beta_3$  (de la mateixa família que la  $\alpha_{IIb}\beta_3$  plaquetària) a la membrana de les cèl·lules musculars llises mitjançant la qual poden unir-se a la fibrina.
- La fibrina continguda en les plaques ateroscleròtiques en creixement pot unir-se a les LDL (lipoproteïnes de baixa densitat). Aquest fenomen es donaria a través de l'apo(a) que, unida per pont disulfur a l'apoB de les LDL, constitueix la lipoproteïna (a). Donada l'elevada homologia de l'apo(a) amb el plasminogen, aquesta s'uniria a la fibrina a través de les seves estructures homòlogues a *kringle* IV del plasminogen. Aquest fet

s'evidencia amb l'alliberament conjunt de lipoproteïnes i fragments de degradació de fibrina que s'observa en incubar lesions d'íntima arterial en presència de plasmina. L'increment en la quantitat de lípids acumulats a l'ateroma disminueix l'estabilitat de la placa i incrementa la probabilitat de l'aparició d'una oclusió trombòtica a través de la ruptura de la mateixa.

- Per altra banda, l'estructura de la xarxa del gel de fibrina depèn de la capacitat de polimerització d'aquesta molècula, que al seu torn depèn de modificacions dels seus dominis estructurals (Henschen 1993), i també de la concentració plasmàtica de fibrinogen. Una elevada concentració plasmàtica de fibrinogen afavoreix que el gel de fibrina formi una xarxa estreta, rígida, amb un tamany de porus molt petit i baixa permeabilitat. Aquest tipus de xarxa de fibrina és més trombogènica que no pas una xarxa amb un tamany de porus més gran com la que es formaria a concentracions plasmàtiques de fibrinogen més baixes (considerades normals). Això es deu a que aquestes xarxes de fibrina formades com a conseqüència del trencament d'una placa d'ateroma en un context d'elevada concentració plasmàtica de fibrinogen serien més resistents a les forces mecàniques de la sang, essent la base d'un trombe obstructiu o bé podent ser incorporades a la paret arterial. De fet, a les plaques d'ateroma de gran tamany s'observa freqüentment una deposició estratificada de xarxes de fibrina que demostren repetits episodis de trencament de la placa seguits de trombosi mural. Aquest fet contribueix al creixement episòdic sobtat de les plaques ateroscleròtiques.

En els estudis mencionats al començament d'aquest apartat, també s'ha posat de manifest que els nivells plasmàtics incrementats de fibrinogen presenten interaccions amb altres marcadors de risc cardiovascular com ara hipertensió, diabetes, edat, obesitat i malaltia vascular perifèrica en ambdós sexes. En el cas específic del sexe femení, l'ús d'anticonceptius orals, l'embaràs i la menopausa són altres factors que també afecten els nivells plasmàtics de fibrinogen. Malgrat tot, el factor ambiental que presenta un efecte més dramàtic a l'hora d'incrementar els nivells plasmàtics de fibrinogen és el consum de tabac. Tant és així, que s'ha arribat a proposar que la relació que existeix entre el consum de tabac i la CAI es dona mitjançant la pujada que provoca en els nivells plasmàtics de fibrinogen. Cal tenir en compte que el fibrinogen és una proteïna de fase aguda i que els seus nivells poden experimentar un increment sobtat com a resposta a inflamació, infecció o trauma. La pujada dels nivells plasmàtics de fibrinogen provocada pel tabaquisme podria

estar mitjançada per l'alliberament de citoquines com IL-1, IL-6 i TGF $\beta$  per part dels macròfags pulmonars com a resultat d'una resposta inflamatòria crònica al fum del tabac (Grant i Humphries, 1999). En el mateix sentit, cal considerar que les lesions ateroscleròtiques presenten moltes característiques de la resposta inflamatòria. Això ha fet pensar que l'increment en els nivells plasmàtics de fibrinogen que es presenten conjuntament amb la CAI no són una de les causes si no una de les conseqüències d'un procés ateroscleròtic preexistent (Hamsten, 1993).

En base a totes aquestes evidències, es pot considerar que el manteniment d'uns nivells plasmàtics de fibrinogen elevats (per sobre dels considerats normals) impliquen un risc per al desenvolupament de la CAI. Per aquesta raó, els estudis d'associació que han utilitzat com a gens candidats a estar implicats en la fisiopatologia de la CAI aquells que codifiquen pel fibrinogen, han utilitzat polimorfismes que es creu que poden estar associats amb nivells d'expressió del gen. Els tres marcadors estudiats en el fibrinogen en la present tesi es troben localitzats en les regions 5' i 3' flanquejants i per tant són propers a les regions reguladores (*cis* i *trans*) dels gens on es troben (figura I.11). L'anàlisi d'aquests polimorfismes en la dècada dels 90 del passat segle, va ser impulsada per la idea de que seria possible que alguns individus presentessin genotips més sensibles als factors ambientals i en conseqüència presentessin un increment dels nivells plasmàtics de fibrinogen superior a la mitja com a resposta a estímuls ambientals moderats. Aquests individus, per tant, presentarien un risc superior a la mitjana de patir una trombosi quan es donessin pics en el nivell plasmàtic de fibrinogen i per tant tindrien una major probabilitat de desenvolupar la CAI (Grant i Humphries, 1999).

Estudis *in vitro* suggereixen que la síntesi de la cadena  $\beta$  limita la producció de la molècula madura de fibrinogen (Lane i Grant 2000). Per aquesta raó, dels tres polimorfismes estudiats en el fibrinogen, dos es troben en el gen FGB, un dels quals (l'RFLP *Hind*III) és molt proper als elements de resposta a IL-6 i HNF-1 (que són reguladors de la transcripció del gen tant en condicions basals com en situació de resposta de fase aguda). Malgrat tot, aquest polimorfisme ha estat relativament poc utilitzat en estudis d'associació amb risc per la malaltia arterial coronària essent els polimorfismes més estudiats en aquest aspecte un RFLP *Hae*III (G/A -455), també localitzat a la regió 5' del gen però no tan proper als mencionats elements reguladors de la transcripció, i l'RFLP *Bcl*II de la regió 3' del gen.

Per altra banda, l'interés pels polimorfismes presents al gen FGA ha anat incrementant-se en els darrers anys degut al paper que juga la cadena de fibrinogen A $\alpha$  en l'ensamblatge de la fibrina (Ferrer-Antunes 1998b). De tots els polimorfismes descrits en aquest gen, l'RFLP *TaqI* ha estat pobrement estudiat en relació amb la seva associació amb risc per la malaltia arterial coronària.

### **C. GLUCOPROTEÏNA IIb/IIIa**

L'estudi dels gens que codifiquen per la glucoproteïna plaquetària IIb/IIIa va ser inicialment motivat per la recerca de les bases genètiques de la trombastènia de Glanzmann, un trastorn hemorràgic hereditari autosòmic recessiu causat per un defecte quantitatiu o qualitatiu d'aquesta glucoproteïna. Fins al moment, han estat descobertes 18 mutacions implicades en aquest tipus de trastorn hemorràgic en els dos gens codificants per aquesta glucoproteïna. En aquest cas, aquests gens es comporten com a gens necessaris, donat que, l'aparició d'alguna d'aquestes mutacions dóna com a conseqüència l'aparició del fenotip que caracteritza la malaltia.

Per altra banda, els gens GPIIb i GPIIIa també poden ser gens candidats a estar implicats en la patofisiologia de la CAI. Aquesta consideració es basa en el paper central que juguen l'adhesió i agregació plaquetàries (processos mitjançats per la glucoproteïna IIb/IIIa) en la formació tant fisiològica com patològica del trombe. S'ha observat que l'agregació plaquetària és particularment activa allà on es dóna l'erosió o fractura de plaques ateroscleròtiques coronàries, situacions que caracteritzen l'angina de pit inestable i l'infart de miocardi (Anderson et al. 1999). La fractura de les plaques d'ateroma exposa proteïnes adhesives que són reconegudes per la glucoproteïna IIb/IIIa de la superfície activada dels trombòcits. Aquest fet desencadena l'agregació plaquetària i la formació d'un trombe agut que pot acabar obstruint l'artèria afectada. Una altra prova de la intervenció d'aquest receptor plaquetari en el desenvolupament de la malaltia aterotrombòtica cardiovascular es manifesta en l'eficàcia dels tractaments per la malaltia basats en inhibidors de la glucoproteïna IIb/IIIa.

Tots aquests fets donen sentit a la realització d'estudis d'associació que intentin determinar el risc per la CAI associat als al·lels de polimorfismes presents en els gens GPIIb i GPIIIa. Aquests estudis es recolzen en la hipòtesi de que la variabilitat genètica en



aquests *loci* pot repercutir d'alguna manera en diferències individuals en la trombogenicitat de les plaquetes. El polimorfisme més estudiat al respecte ha estat l'anomenat  $PI^{A1/A2}$  que es dona per una substitució Leu/Pro a l'aminoàcid 33 de GPIIIa i que determina el sistema HPA-1 d'antígens plaquetaris. Aquest canvi en la seqüència aminoacídica ha estat associat amb un increment de la capacitat d'unió a fibrinogen per part del receptor (Goodall et al 1999), encara que aquest resultat no s'ha replicat (Meiklejohn et al 1999, Green i Watkins 1999). Els estudis d'associació d'aquest polimorfisme amb el risc per al desenvolupament de la CAI han donat resultats contradictoris i sovint no replicables. Mentre que Weiss i col·laboradors (1996) trobaren associació entre l'al·lel Pro33 i risc per l'infart de miocardi, dos grans estudis prospectius, l'estudi *ECTIM* (Herrmann et al. 1997) i l' *US Physicians Health Study* (Ridker et al. 1997b), no van mostrar cap associació entre aquest al·lel i aquest tipus de manifestació de la CAI (per una revisió del tema consultar Lane i Grant, 2000).

En la present tesi s'han estudiat polimorfismes localitzats tant a GPIIb com a GPIIIa. Dos dels quatre polimorfismes analitzats es troben localitzats dins d'exons, GPIIb 3036C→T (exó 30) i GPIIIa *TaqI* (exó 9), els altres dos es troben localitzats dins d'introns, GPIIb 9 pb INS/DEL (intró 21) i GPIIIa (CT)<sub>n</sub> (intró 6) (figura I.13). Malgrat que no produeixen cap canvi aminoacídic, el seu estudi es va considerar interessant donada la seva nul·la utilització en estudis d'associació per la CAI. A més, els dos polimorfismes presents a GPIIIa i el 9 pb INS/DEL de GPIIb es troben situats en les zones codificants pel domini extracel·lular d'aquestes dues glucoproteïnes. En el cas que es donés alguna associació dels al·lells d'aquests polimorfismes amb risc per al desenvolupament de la CAI, es podria suggerir un lligament amb algun locus que realment provoqués modificacions en aquest domini afectant la seva unió amb la fibrina i per tant la trombogenicitat de les plaquetes. Per altra banda, el polimorfisme GPIIb 3036C→T es troba situat a la zona del gen GPIIb que codifica pel domini citoplasmàtic i l'associació d'algun dels seus al·lells amb el risc per al desenvolupament de la CAI suggeriria un lligament amb algun locus que provoqués modificacions en aquest domini afectant la transmissió de senyals des d'aquest receptor al nucli, alterant el procés d'activació plaquetària.

## D. PAI-1 I PLAT

Els gens PLAT i PAI-1 són els representants del procés de la fibrinolisi en el present treball. Els productes proteics d'aquests gens desenvolupen un paper fonamental en la regulació d'aquest procés. Les dues proteïnes interaccionen entre si durant la fibrinolisi essent PAI-1 l'inhibidor de t-PA. A més, aquest darrer actua directament sobre l'efector final de la via (el plasminogen) i amb la fibrina, que té un paper estimulador de l'activació del plasminogen a través del t-PA. Un bon funcionament d'aquest sistema permet el control de la formació dels polimers de fibrina que formen els trombe i la degradació dels mateixos quan el teixit lesionat ha estat reparat. Una alteració que generés un excés de funció de PAI-1 o un defecte de funció de t-PA dificultaria la dissolució de coàguls facilitant l'aparició de trombosi arterial. Aquest fet, fa que aquests siguin bons gens candidats per estar implicats en la fisiopatologia de la CAI.

Estudis cas-control realitzats sobre pacients que pateixen angina de pit o han sobreviscut a un infart de miocardi han demostrat de forma consistent que aquests presenten una activitat fibrinolítica disminuïda comparada amb els controls (Hamsten 1993).

Durant molts anys es va creure que una funció fibrinolítica defectuosa a causa d'una disfunció de t-PA (centrada principalment en nivells plasmàtics anormalment baixos de la proteïna) podia ser un factor de risc per la trombosi. Actualment però, s'està incrementant l'interés sobre els nivells plasmàtics elevats de t-PA donat que estudis prospectius recents com l'estudi *ECAT* (Ridker et al. 1994) i l'*US Physicians Health Study* (Thompson et al. 1995b) han mostrat un risc incrementat per a futurs infarts de miocardi en persones amb un nivell plasmàtic elevat de t-PA. Una possible explicació d'aquest fet seria que els nivells elevats de t-PA en realitat reflecteixen uns nivells elevats de PAI-1 amb el qual forma complexos inactius.

Pel que respecta a PAI-1, s'ha pogut observar que en les plaques d'ateroma es troben elevades concentracions de PAI-1. Nivells plasmàtics elevats d'aquesta proteïna han estat consistentment associats a risc vascular (Lane i Grant 2000). En molts estudis s'ha pogut detectar una correlació positiva entre els nivells plasmàtics de PAI-1 i els nivells de triglicèrids sèrics especialment en pacients diabètics i supervivents d'infart de miocardi. Aquests tipus de pacients presenten nivells plasmàtics incrementats de PAI-1 (Humphries et al. 1997). S'ha suggerit que PAI-1 podria ser mitjancer del risc cardiovascular associat amb un metabolisme lipídic anormal (Fay i Ginsburg 1994).

Dels tres polimorfismes localitzats en el gen PLAT que han estat estudiats en la present tesi, la inserció *Alu* polimòrfica TPA25 ha estat estudiada en relació a la malaltia cardiovascular, encara que no de forma extensa, no existint estudis en aquest sentit que utilitzin els dos STRs. Tant TPA25 com els STRs (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> i (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> es troben situats en regions intròniques (figura I.15). Els dos STRs es troben localitzats a l'intró 1 a prop de la regió que codifica per l'anomenat domini digital de la proteïna madura, mentre que TPA25 es troba a l'intró 8 a la zona del gen que codifica per les regions *kringle* de la proteïna madura. Tant el domini digital com les regions *kringle* de de t-PA intervenen en la seva interacció amb la fibrina, interacció que s'ha mostrat estimuladora de l'activació del plasminogen que duu a terme. L'associació d'algun dels al·lels d'aquests polimorfismes amb el risc per al desenvolupament de la CAI suggeriria un lligament dels mateixos amb algun locus que provoqués modificacions en aquests dominis afectant l'activació del plasminogen per part de t-PA i per tant afectant la funció fibrinolítica.

Pel que respecta als polimorfismes estudiats en el gen PAI-1, tant en el cas del STR (CA)<sub>n</sub> com del RFLP *HindIII* han estat associats amb variabilitat en nivells plasmàtics de PAI-1 (Dawson et al. 1991). Cal destacar la importància de l'estudi del STR (CA)<sub>n</sub> en relació amb els nivells plasmàtics de PAI-1 ja que constitueix una estructura Z-ADN essent un putatiu element de regulació de l'expressió del gen. Pel que respecta al RFLP *HindIII*, un estudi *in vitro* realitzat per Li i col.laboradors (1997) va posar de manifest que determinats genotips per a aquest polimorfisme eren més sensibles a l'efecte que tenen sobre l'expressió del gen les VLDLs i la Lp(a) (veure taula I.1). Malgrat tot, aquests polimorfismes han estat molt poc utilitzats en estudis d'associació amb risc per la CAI, essent un polimorfisme anomenat 4G/5G, localitzat a 5' del gen PAI-1, el més estudiat en aquest aspecte.

## **4.2. ASSOCIACIONS DESCRITES EN ELS POLIMORFISMES ANALITZATS**

Com ja s'ha vist en aquesta introducció, la malaltia cardiovascular és una malaltia complexa en la qual intervenen múltiples components ambientals (multifactorial) i genètics (poligènica). Aquest darrer aspecte de la malaltia s'ha posat de manifest al demostrar-se l'heretabilitat de la mateixa en estudis de bessons, de segregació familiar i de risc relatiu en immigrants, arribant-se a considerar com a factor de risc el fet de tenir antecedents familiars per a la malaltia, especialment en casos en els que aquesta ha aparegut de forma prematura.

Un gran nombre d'estudis prospectius a la recerca de factors de risc per a la malaltia cardiovascular realitzats a mitjans de la dècada dels 80 i al llarg de la dècada dels 90 del passat segle van mostrar que elevades concentracions plasmàtiques, especialment de fibrinogen, PAI-1 i t-PA i de forma no tan clara de factor VII, estaven relacionades amb risc per la malaltia. A més, es posaren de manifest interaccions entre aquests nivells plasmàtics i altres factors de risc considerats clàssics.

Les evidències de que la CAI té un component hereditari i els resultats dels mencionats estudis prospectius, han fet que es sotmetés a estudi la intervenció de la variabilitat normal (present en la població general) dels gens implicats en l'hemostasi en el component hereditari de la malaltia cardiovascular. En una primera aproximació, moltes investigacions es van encaminar a l'estudi de la relació entre els polimorfismes presents en aquests gens i els nivells plasmàtics o de densitat d'expressió (en el cas de receptors) de les proteïnes per les que codifiquen. En molts casos (encara que no en tots) es va poder establir que aquesta relació existia (veure taula I.1). Malgrat tot, els estudis que han intentat relacionar directament la variabilitat en aquests gens amb un risc per al desenvolupament de la malaltia cardiovascular han obtingut resultats poc consistents.

L'existència d'una relació entre els nivells plasmàtics de la proteïna i la malaltia, així com entre el gen i els nivells plasmàtics de la proteïna, però no entre el gen i la malaltia genera una aparent paradoxa que pot ser explicada tenint en compte la contribució quantitativa a l'heretabilitat dels nivells plasmàtics d'aquestes proteïnes. La influència genètica total (considerant tots els polimorfismes que es poguessin descriure en el gen) sobre la varianza dels nivells plasmàtics de la proteïna s'ha estimat al voltant del 50% en el cas del fibrinogen, en més del 30% en el cas del factor VII, fins a un 71.4% en el cas de PAI-1, no estant clara l'influència genètica sobre la varança dels nivells plasmàtics de t-PA

(Lane i Grant, 2000). Per tant, aquesta influència genètica no s'ha mostrat mai amb un valor del 100% en cap dels gens que s'estudien en la present tesi. En el cas de que aquesta influència gènica fos del 100%, aquests gens tindrien un poder predictiu sobre la malaltia de la mateixa magnitud que els nivells plasmàtics de les proteïnes per les que codifiquen.

A la taula I.1 s'exposa un resum dels estudis d'associació previs que han utilitzat els polimorfismes analitzats en la present tesi. Existeix un nombre considerable d'estudis en els que no s'ha demostrat relació entre la variabilitat normal dels gens que codifiquen per aquests components de l'hemostasi i els seus nivells plasmàtics ni entre aquests nivells i la malaltia. Aquests estudis contrastats als que sí han donat resultats positius en aquest terreny generen la sensació de que l'associació d'aquests gens amb risc per la CAI és confusa. Aquesta manca de replicabilitat s'origina d'una sèrie de problemes de tipus metodològic presents en la majoria d'estudis realitzats fins al moment sobre aquest tema:

- Els nivells plasmàtics de les proteïnes implicades en l'hemostasi presenten una gran variabilitat a nivell intraindividual. Per exemple, s'ha observat que els nivells plasmàtics de fibrinogen i de FVII:C són significantment més alts durant l'hivern, fet que s'ha relacionat amb la variació estacional en la mortalitat per CAI en la vellesa (Petersen et al. 1995). Com ja s'ha exposat en aquesta introducció, s'observen correlacions positives entre els nivells plasmàtics d'aquestes proteïnes amb altres caràcters quantitius indicadors de risc per la CAI, alguns d'ells modificables com el tabaquisme en el cas del fibrinogen o la ingesta de lípids en la dieta en el cas del factor VII i de PAI-1. A més el fibrinogen i el PAI-1 són proteïnes de fase aguda i, com a tals, els seus nivells plasmàtics es veuen alterats en situacions d'inflamació, infecció o trauma. Per tant, obtenir una mesura representativa dels nivells plasmàtics d'aquestes proteïnes representa un gran problema de difícil solució. Molts dels estudis d'associació realitzats es basen en una sola mesura per individu dels nivells plasmàtics d'aquestes proteïnes, fet que, sumat a l'error de laboratori generat en el mesurament, altera en gran mesura la capacitat per trobar qualsevol associació amb la CAI.
- Existeix una gran pluralitat en les manifestacions clíniques de la malaltia cardiovascular (infart de miocardi, angina de pit estable i inestable, malaltia vascular perifèrica, malaltia cerebrovascular isquèmica, anomalies cardíques d'origen infeccions o congènit), podent donar-se diferències en quant als factors ambientals o genètics que participarien en cadascuna d'elles. És necessari el rigor en la identificació del fenotip

clínic objecte de l'estudi per tal de poder despendre unes conclusions correctes i susceptibles de ser replicades en individus que realment posseeixin les mateixes manifestacions clíniques en altres estudis. El fenotip clínic a estudiar no es defineix amb prou rigor en molts dels mencionats estudis.

- La majoria dels estudis realitzats són estudis d'associació basats en població o estudis cas/control. Com ja s'ha exposat en aquesta introducció, aquest tipus d'estudis presenten problemes de selecció d'una mostra control escaient, problemes d'heterogeneïtat genètica i estratificació de la població, i problemes de definició de la malaltia. A més, aquest tipus d'estudis necessiten un gran tamany mostral per ser prou sensibles i aquest és un requeriment no sempre fàcil d'aconseguir.

ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ AMB POLIMORFISMES DELS GENS FGA I FGB					
Polimorfisme	Tipus de mostra i lloc d'origen	N	Al·lel, haplotip o genotip associat	Efectes	Referència
FGB <i>HindIII</i>	Negroides Sud-asiàtics Caucasoides (Londres, UK)	479 459 453	Hd2	Promig ↑ [fibrinogen] en els 3 grups ètnics = 0.14 g/l (I.C. 95%: 0.02 - 0.26 g/l) dones i 0.15 g/l (I.C. 95%: 0.03 - 0.27 g/l) homes.	Cook et al. 2001
FGB <i>BclII</i> FGA <i>TaqI</i>	Cas / control MI (Països Baixos)	560 / 646	B1	Associat a ↑ [fibrinogen].	Doggen et al. 2000
FGB <i>HindIII</i>	Quechua parlants (Perú) Na-dene (USA i Canadà) Caucasoides (USA)	60 50 31	Hd2	Molt baixa freq. a quechua parlants. Contrarresta l'efecte ↑ viscositat de la sang provocada per un ↑ hematocrit?	Rupert et al. 1999
FGB <i>HindIII</i>	Població general (Austria)	399	Hd2Hd2	Associació amb ↑ grau d'aterosclerosi a la caròtida r.r.= 6.17 (I.C. 95%: 1.7 - 22.36)	Schmidt et al. 1998
FGB <i>BclII</i> FGA <i>TaqI</i>	Pacients amb traumatisme cranial o toràcic (Portugal)	45	-	No associació amb increment de [fibrinogen] en situació de fase aguda.	Ferrer-Antunes 1998a
FGB <i>BclII</i> FGB <i>HindIII</i> FGA <i>TaqI</i>	dones postmenopàusiques (Finlàndia)	191	-	No associació amb [fibrinogen].	Rauramaa et al. 1997

Polimorfismes en gens de l'hemostasi

FGB <i>BcII</i>	Cas / control AMI (Itàlia)	102 / 173	B1B1 + B1B2	Associació amb ↑ [fibrinogen] a casos i controls. Risc per AMI r.r.= 2.4 (I.C. 95%: 1.2 - 4.6)	Zito et al. 1997
FGB <i>BcII</i> FGB <i>HindIII</i> FGA <i>TaqI</i>	Població general (Finlàndia)	206	-	No associació amb [fibrinogen].	Vaisanen et al. 1997
FGB <i>BcII</i> FGB <i>HindIII</i> FGA <i>TaqI</i>	Cas / control CAD (UK) (França)	182 / 168 383 / 500	B1	Associació amb severitat de la CAD.	Behague et al. 1996
FGB <i>BcII</i>	Cas / control AP (Països Baixos)	26 / 20	B1B1, B2B2 i B1B2	Associació amb [fibrinogen] a controls però no a afectats de AP.	de Maat et al. 1996
FGB <i>BcII</i> FGB <i>HindIII</i> FGA <i>TaqI</i>	Població general, homes 50-60 anys (Finlàndia)	189	T1/T1 T2/T2	Influència sobre l'associació entre la [fibrinogen] amb la VO <sub>2</sub> màx. i la despesa energètica.	Vaisanen et al. 1996
FGB <i>BcII</i> FGB <i>HindIII</i> FGA <i>TaqI</i>	Pacients CHD (Alemanya)	384	B1 Hd2 T1	Associació amb ↑ [fibrinogen]. Junts expliquen el 5.8 % de la Variança total de [fibrinogen].	Heinrich et al. 1995
FGB <i>BcII</i> FGA <i>TaqI</i>	Inuits (Groenlàndia)	133	B1 T1	Freq. més baixes que en poblacions caucasoides.	de Maat et al. 1995



FGB <i>BclII</i> FGB <i>HindIII</i>	Caucasoides (USA) Mongoloides (Japó)	146 147	B1 Hd2	↑ freq. a caucasoides respecte japonesos ( $p < 0.01$ per B1 i $p < 0.001$ per Hd2). Caucasoides tenen [fibrinogen] ↑ respecte els japonesos.	Iso et al. 1995
FGB <i>BclII</i> FGA <i>TaqI</i>	Pacients NIDDM (UK)	100	B1B2	↑ 16% [fibrinogen] respecte individus sense al·lel B1.	Snowden et al. 1992
FGB <i>BclII</i> FGA <i>TaqI</i>	Cas / Control malaltia arterial periférica (UK)	121 / 126	B1B1 B1B2  T1T2:B1B2	· ↑ freq. a afectats de malaltia arterial periférica.  · Associat a risc malaltia arterial periférica r.r.= 4.8 (1.2 - 19.0) $p < 0.05$	Fowkes et al. 1992
FGB <i>BclII</i> FGA <i>TaqI</i>	Població general (UK)	247	-	No associació amb [fibrinogen].	Connor et al. 1992
FGB <i>BclII</i> FGA <i>TaqI</i>	Població general (Noruega)	118	-	No associació amb [fibrinogen].	Berg i Kierulf 1989
FGB <i>BclII</i> FGA <i>TaqI</i>	Població general (UK)	91	B1 T1 B1B1:T1T1	Associació amb ↑[fibrinogen]. Expliquen el 15% de la Variança total de [fibrinogen].	Humphries et al. 1987

ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ AMB POLIMORFISMES DEL GEN FVII					
Polimorfisme	Tipus de mostra i lloc d'origen	N	Al·lel, haplotip o genotip associat	Efectes	Referència
-323 10 pb INS/DEL HVR4	Cas / control MI amb historia familiar de trombosi arterial (Itàlia)	176 / 227	DD+H6H6 (ID+II)+H6H6  DD+(H6H7+H7H7)  (ID+II)+(H6H7+H7H7)  I	·Risc familiar de MI r.r.= 1 r.r.= 0.44 (I.C. 95%: 0.14 - 1.38) r.r.= 0.54 (I.C. 95%: 0.28 - 1.06) r.r.= 0.49 (I.C. 95%: 0.24 - 0.98).  ·↓ risc per MI portadors de l'al·lel, r.r.= 0.65 (I.C. 95%: 0.37-1.12)	Di Castelnuovo et al. 2000
-323 10 pb INS/DEL HVR4	Cas / control CAD (Itàlia)	444 / 133	II II i ID  ID	·↓ en 66% [FVII activat]. ·↑ Freq. casos sense MI (p=0.008). ·Protecció contra MI a casos r.r.= 0.47 (I.C. 95%: 0.27 -0.81).	Girelli et al. 2000

-323 10 pb INS/DEL HVR4	Cas / control deficiència lleu de FVII (Itàlia)	438 / 52	I  H5, H6, H7, H8	·↓ [FVII activat] controls ↓[antigen FVII] controls. ·Relació + entre el núm. de repeticions i els nivells de FVII.	Pinotti et al. 2000
-323 10 pb INS/DEL HVR4	Cas / control MI (Japó)	208 / 285	I	↓ [antigen FVII]. No associació amb MI.	Tamaki et al. 1999
-323 10 pb INS/DEL	Població General (França, Itàlia, Països Baixos, Noruega i Espanya)	459	DD	[fosfolípids] prediu valors de FVII:C i [FVII activat] unicament en aquest genotip.	Mariani et al. 1999a
-323 10 pb INS/DEL	Població General (França, Itàlia, Països Baixos, Noruega i Espanya)	172 dones	DD	↑ FVII:C i [FVII activat], especialment en consumidores d'anticonceptius orals.	Mariani et al. 1999b
-323 10 pb INS/DEL HVR4	Població general (Itàlia)	335 105 dones i 230 homes	I i H7  H5	· Portadors ↓ FVII:C i [antigen FVII] que homozigots per al·lels complementaris, en homes. · Portadors presenten els més alts [antigen FVII], en homes. Expliquen 22% i 15% Var. [antigen FVII] respectivament.	Di Castelnuovo et al. 1998

Polimorfismes en gens de l'hemostasi

HVR4	Cas / control MI (Itàlia)	165 / 225	H7H7  H7H5 i H6H5	<ul style="list-style-type: none"> <li>· ↓ risc MI, r.r.= 0.22 (I.C. 95%: 0.08 -0.63) ↓ FVII:C i [antigen FVII].</li> <li>· Associats a risc per MI, r.r.= 1.69 (I.C. 95%: 0.16 - 17.3)</li> </ul>	Iacoviello et al. 1998
-323 10 pb INS/DEL HVR4	Europeus (Nord-Europa) Inuits (Groenlàndia) Afrocaribenys (UK) Indis Gujuratis (UK)	182 133 113 130	II   H6H6	<ul style="list-style-type: none"> <li>· ↓ FVII:C respecte els altres genotips a tots grups menys a afrocaribenys.</li> <li>· ↑ FVII:C respecte altres genotips, només a inuits.</li> </ul>	de Maat et al. 1997
-323 10 pb INS/DEL HVR4	Població general (Noruega, Països Baixos, França, Itàlia i Espanya)	500	I	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ [FVII activat].</li> <li>↓ freq. a nord Europa.</li> </ul> <p>Variació genètica explica 32% de la variança total de [FVII activat] i el 26.8% a FVII:C.</p>	Bernardi et al. 1997
-323 10 pb INS/DEL	Cas / control embolia (UK)	317 / 198	I i D	<p>No associació amb risc embolia.</p> <p>Associació a FVII:C tant a casos com a controls, portadors al·lel D ↑ FVII:C p&lt;0.0001</p>	Heywood et al. 1997
-323 10 pb INS/DEL	Població general (Itàlia)	55	DD	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ FVII:C i [antigen FVII] respecte altres genotips.</li> </ul>	Dell'Acqua et al. 1997

-323 10 pb INS/DEL	Població general (UK)	705	I	Portadors de l'al·lel ↓ 20% FVII:C i [antigen FVII] respecte no portadors (p<0.0001).	Humphries et al. 1996
-323 10 pb INS/DEL	Cas / control hipertrigliceridemia (Itàlia)	100 / 19	DD	↑ FVII:C i [antigen FVII] respecte heterozigots (p<0.001). Relació + entre FVII:C , [antigen FVII] i [triglicèrids] només en aquest genotip.	Sacchi et al. 1996
<b>ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ AMB POLIMORFISMES DEL GEN PLAT</b>					
<b>Polimorfisme</b>	<b>Tipus de mostra i lloc d'origen</b>	<b>N</b>	<b>Al·lel, haplotip o genotip associat</b>	<b>Efectes</b>	<b>Referència</b>
TPA25	Cas / Control MI i tromboembolisme venós Afroamericans (USA)	108 + 91 / 185	D	Associació amb tromboembolisme venós, però no amb MI.	Hooper et al. 2000
TPA25	Inuits (Groenlàndia).	133	I	↓ ferq. Respecte a caucasoides. Es relaciona amb el ↓ risc de malaltia cardiovascular a inuits?	de Maat et al. 1999
TPA25	Cas / control MI (UK)	529 / 525	-	No associació amb MI.	Steeds et al. 1998
TPA25	Cas / control MI (USA)	369 / 369	-	No associació amb MI.	Ridker et al. 1997a

TPA25	Cas / control MI (Països Baixos)	121 / 250	II	Associació amb risc per MI r.r.= 2.24 (I.C. 95%: 1.11-4.50)	van der Boom et al. 1997
<b>ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ AMB POLIMORFISMES DEL GEN PAI-1</b>					
<b>Polimorfisme</b>	<b>Tipus de mostra i lloc d'origen</b>	<b>N</b>	<b>Al·lel, haplotip o genotip associat</b>	<b>Efectes</b>	<b>Referència</b>
PAI-1 <i>Hind</i> III	Cas / control aterosclerosi coronària i perifèrica (UK)	283 / 423	-	No associació amb aterosclerosi coronària i perifèrica.	Lee et al. 1999
PAI-1 <i>Hind</i> III	Cèl·lules endotelials venoses de cordó umbilical <i>in vitro</i> (USA)	24	Hd2Hd2	Insulina indueix: ↑ 1.7-2.2 cops secreció antigen PAI-1 i ↑ 1.8-2.8 cops nivells ARNm. Només en aquest genotip.	Grenett et al. 1999
PAI-1 <i>Hind</i> III	Cas / control CAD (caucasoides, USA)	49	Hd1Hd1 i Hd2Hd2	↑ extensió de CAD que els heterozigots. El genotip PAI-1 prediu l'extensió de la CAD (p= 0.019).	Benza et al. 1998a
PAI-1 <i>Hind</i> III	Trasplantats de cor (USA)	48	Hd1Hd1	Implica risc significatiu de desenvolupament de CAD després de trasplantament quan el donant té aquest genotip (p<0.05).	Benza et al. 1998b

PAI <i>Hind</i> III	Cèl·lules endotelials venoses de cordó umbilical <i>in vitro</i> (USA)	24	Hd1Hd1	VLDLs hipertrigliceridèmiques i Lp(a) indueixen respectivament: ↑ 2-3 i 1.6-2 cops secreció antigen PAI-1 i ↑ 3-4.5 i 2.5-3.2 cops nivells ARNm. Només en aquest genotip.	Li et al. 1997
PAI-1 <i>Hind</i> III	Pacients NIDDM (Caucasoides, UK)	189	-	No associació amb [PAI-1] en condicions de resistència a insulina.	Mansfield et al. 1995
PAI <i>Hind</i> III PAI-1 (CA) <sub>N</sub>	Cas/ control MI (UK)	145 / 95	Al·lels petits de (CA) <sub>N</sub>	Associació amb ↑ [PAI-1] en afectats per MI (p= 0.03).	Dawson et al. 1991

*Taula I.1. Estudis d'associació realitzats amb els polimorfismes utilitzats en el present treball. Els gens GPIIb i GPIIIa no apareixen en aquesta taula donada la no existència d'estudis d'associació amb risc per la CAI que utilitzin els polimorfismes d'aquests gens analitzats a la present tesi. Cal tenir en compte que, donada la manca d'uniformitat entre els autors, la nomenclatura dels al·lels es troba adaptada a l'utilitzada en el present treball i en molts casos no és la mateixa que l'emprada al treball original. N: Número d'individus.[ ]: Concentració plasmàtica.*

El grup investigador de la UB en el si del qual ha estat realitzada la present tesi, va iniciar, ara fa uns anys, investigacions sobre la diversitat poblacional de gens relacionats amb el metabolisme lipídic i la seva influència com a factors de susceptibilitat genètica per a la malaltia cardiovascular en la Mediterrània. Dins d'aquest context, el següent treball es centra en l'exploració poblacional i epidemiològica de la variació dels gens FVII, FGB, FGA, GPIIb, GPIIIa, PLAT i PAI-1 donada la seva importància funcional en els processos de l'hemostasi.

Els objectius principals del treball són els següents:

1. Analitzar, dins dels esmentats gens, la diversitat poblacional de 9 marcadors ben coneguts a nivell epidemiològic, però amb una variació poblacional que no ha estat sistemàticament analitzada. Per a tal fi, es realitzarà una avaluació de la distribució de les freqüències al·lèliques i haplotípiques dels esmentats marcadors en 7 mostres poblacionals (un total de 763 individus) obtingudes seguint criteris antropològics ben definits disponibles en el nostre laboratori. D'entre aquestes mostres, 6 procedeixen de la Mediterrània Occidental (Península Ibèrica, Sardenya i Marroc) i 1 de l'Àfrica Sud-sahariana. Aquest estudi proporcionarà noves dades sobre la caracterització genètica de les esmentades poblacions i permetrà avaluar el grau d'informativitat d'aquests marcadors sobre les relacions genètiques entre elles. També es compararan les freqüències dels esmentats polimorfismes en les poblacions analitzades amb les d'altres poblacions ja descrites en la bibliografia per a aquests *loci*. A més, els resultats obtinguts permetran establir la pauta de variació dels polimorfismes estudiats en població general de la Península Ibèrica que s'aprofitarà per a fer comparacions en la part epidemiològica de la present tesi.
2. Determinar el significat de la variació d'aquests gens com a factor de risc cardiovascular en una mostra d'afectats per CAI originària de la Península Ibèrica mitjançant el disseny d'un estudi d'associació de gens candidats basat en famílies. Per a tal fi, s'analitzarà, en una mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI, la distribució dels marcadors indicats anteriorment així com 4 microsatèl·lits localitzats en els gens GPIIIa, PLAT i PAI-1 amb la finalitat d'obtenir informació genètica més detallada. L'associació serà avaluada a través



de la tècnica estadística del Test de Desequilibri de la Transmissió (TDT). Aquest test permetrà detectar l'existència d'excessos o defectes en la transmissió de determinades variants al·lèliques o haplotípiques dels gens candidats triats, o bé el lligament d'alguna d'aquestes variants amb algun altre locus desconegut que realment s'associï amb la malaltia. La finalitat d'aquesta anàlisi és proporcionar noves dades genètiques sobre la importància dels sistemes de coagulació i fibrinolisi en l'etiologia de la CAI en les poblacions humanes i, en segon terme, confirmar o rebutjar les associacions previament descrites a la bibliografia en mostres poblacionals d'origens ètnics diferents.

3. Detectar la presència d'interaccions entre variants al·lèliques o haplotípiques presents en els gens candidats triats i els nivells de determinats paràmetres sèrics quantitativs considerats factors de risc intermedi per a la CAI. Per a tal fi, a la mateixa mostra de famílies nuclears, s'analitzarà la presència d'interaccions de les variants gèniques amb els nivells plasmàtics de triglicèrids, lipoproteïna (a), colesterol total i HDL colesterol, ja que aquests paràmetres han mostrat estar relacionats amb els nivells plasmàtics dels productes proteics d'alguns dels gens candidats escollits en el present treball, o es sospita que poden interferir d'alguna manera en els processos de coagulació i fibrinolisi.

El grup investigador de la UB en el si del qual ha estat realitzada la present tesi, va iniciar, ara fa uns anys, investigacions sobre la diversitat poblacional de gens relacionats amb el metabolisme lipídic i la seva influència com a factors de susceptibilitat genètica per a la malaltia cardiovascular en la Mediterrània. Dins d'aquest context, el següent treball es centra en l'exploració poblacional i epidemiològica de la variació dels gens FVII, FGB, FGA, GPIIb, GPIIIa, PLAT i PAI-1 donada la seva importància funcional en els processos de l'hemostasi.

Els objectius principals del treball són els següents:

1. Analitzar, dins dels esmentats gens, la diversitat poblacional de 9 marcadors ben coneguts a nivell epidemiològic, però amb una variació poblacional que no ha estat sistemàticament analitzada. Per a tal fi, es realitzarà una avaluació de la distribució de les freqüències al·lèliques i haplotípiques dels esmentats marcadors en 7 mostres poblacionals (un total de 763 individus) obtingudes seguint criteris antropològics ben definits disponibles en el nostre laboratori. D'entre aquestes mostres, 6 procedeixen de la Mediterrània Occidental (Península Ibèrica, Sardenya i Marroc) i 1 de l'Àfrica Sud-sahariana. Aquest estudi proporcionarà noves dades sobre la caracterització genètica de les esmentades poblacions i permetrà avaluar el grau d'informativitat d'aquests marcadors sobre les relacions genètiques entre elles. També es compararan les freqüències dels esmentats polimorfismes en les poblacions analitzades amb les d'altres poblacions ja descrites en la bibliografia per a aquests *loci*. A més, els resultats obtinguts permetran establir la pauta de variació dels polimorfismes estudiats en població general de la Península Ibèrica que s'aprofitarà per a fer comparacions en la part epidemiològica de la present tesi.
2. Determinar el significat de la variació d'aquests gens com a factor de risc cardiovascular en una mostra d'afectats per CAI originària de la Península Ibèrica mitjançant el disseny d'un estudi d'associació de gens candidats basat en famílies. Per a tal fi, s'analitzarà, en una mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI, la distribució dels marcadors indicats anteriorment així com 4 microsatèl·lits localitzats en els gens GPIIIa, PLAT i PAI-1 amb la finalitat d'obtenir informació genètica més detallada. L'associació serà avaluada a través

de la tècnica estadística del Test de Desequilibri de la Transmissió (TDT). Aquest test permetrà detectar l'existència d'excessos o defectes en la transmissió de determinades variants al·lèliques o haplotípiques dels gens candidats triats, o bé el lligament d'alguna d'aquestes variants amb algun altre locus desconegut que realment s'associï amb la malaltia. La finalitat d'aquesta anàlisi és proporcionar noves dades genètiques sobre la importància dels sistemes de coagulació i fibrinolisi en l'etiologia de la CAI en les poblacions humanes i, en segon terme, confirmar o rebutjar les associacions previament descrites a la bibliografia en mostres poblacionals d'origens ètnics diferents.

3. Detectar la presència d'interaccions entre variants al·lèliques o haplotípiques presents en els gens candidats triats i els nivells de determinats paràmetres sèrics quantitius considerats factors de risc intermedi per a la CAI. Per a tal fi, a la mateixa mostra de famílies nuclears, s'analitzarà la presència d'interaccions de les variants gèniques amb els nivells plasmàtics de triglicèrids, lipoproteïna (a), colesterol total i HDL colesterol, ja que aquests paràmetres han mostrat estar relacionats amb els nivells plasmàtics dels productes proteics d'alguns dels gens candidats escollits en el present treball, o es sospita que poden interferir d'alguna manera en els processos de coagulació i fibrinolisi.

# **1. RECOLLIDA I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES UTILITZADES**

D'acord amb les vessants epidemiològica i poblacional del present treball, les determinacions genètiques han estat realitzades sobre dos tipus de mostres que es descriuen tot seguit.

## **1.1. MOSTRA DE FAMÍLIES NUCLEARS AMB CARDIOPATIA ISQUÈMICA**

### **A. CRITERIS D'INCLUSIÓ EN LA MOSTRA**

Els criteris que es van seguir per tal d'obtenir una mostra de famílies nuclears per a realitzar l'estudi d'associació amb la cardiopatia isquèmica van ser els següents:

1. La família és seleccionada a partir d'un individu afectat de cardiopatia isquèmica. Per considerar que un individu és afecte d'aquesta malaltia cal que aquest hagi estat diagnosticat almenys un cop per un especialista en cardiologia d'una (o d'ambdues) de les següents manifestacions clíniques:

- Angina de pit: 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.

2. Condicionats per l'estructura familiar del disseny i per tal d'augmentar les possibilitats de trobar progenitors vius dels individus afectats, el mostreig es va restringir a aquells malalts que van sofrir la crisi coronària abans dels 55 anys d'edat. D'aquesta manera, la mostra inclou casos de cardiopatia prematura (es considera cardiopatia prematura quan es manifesta a edats inferiors als 55 anys pels homes i 65 anys per les dones) en els que cal suposar una component hereditària més important en comparació amb els d'aparició tardana.

3. El mostreig de cada família va incloure l'obtenció de material (mostra de sang) en l'individu afectat i els seus pares, independentment de si aquests havien patit o no la malaltia. En alguns casos també es va obtenir material d'un o més germans de l'afectat per tal de poder tenir la possibilitat d'inferir el genotip de progenitors absents

## **B. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES**

Les mostres van ser recollides amb la col·laboració de diversos hospitals de l'àrea metropolitana de Barcelona. En l'obtenció de les mostres de famílies nuclears van participar-hi les següents persones i institucions: 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 (Dr. Francino).

En tots els centres el procés de recollida va ser el mateix:

1. Selecció a la base de dades de l'hospital dels pacients més joves diagnosticats recentment (darrers 2-3 anys) d'infart de miocardi o d'angina de pit en funció dels criteris mencionats anteriorment.
2. Contacte telefònic o directe amb el pacient per saber si hi havia possibilitat de mostrejar els seus progenitors i/o algun germà. En cas afirmatiu s'informava de les característiques de l'estudi i es demanava la participació del pacient i de la seva família.
3. En cas d'obtenir el consentiment verbal de la família, se'ls citava en dejú a l'hospital, conjuntament o per separat, per tal de realitzar l'extracció de sang i contestar un qüestionari de factors de risc i antecedents familiars. Si algun membre de la família no podia acudir a l'hospital i acceptava participar a l'estudi, se'l citava a l'ambulatori més proper al seu domicili o s'acudia al mateix domicili amb una infermera per a realitzar l'extracció.

4. Arribat el dia en que s'havia citat el pacient o la seva família, se'ls tornava a informar de les característiques de l'estudi i la seva utilitat, se'ls demanava el seu consentiment per escrit i se'ls garantia la privacitat de les dades obtingudes.
5. Es procedia a l'extracció de 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).
6. Finalment els participants responien un qüestionari i se'ls agraiava la seva participació.

El full de consentiment que van signar tots els participants en el present estudi i el qüestionari sobre factors de risc i antecedents familiars es presenta a l'annex 1.

La finalitat del qüestionari era recopilar, de cada participant, dades que poden 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, en cas d'immigració recent, es registrava el lloc de naixement del mateix i dels seus avis. A més, es recollia informació sobre l'edat dels progenitors, en el cas que s'hagués donat la defunció d'algun dels mateixos, s'annotava 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'interrogatori per evitar confusions terminològiques. S'inclouen qüestions sobre tabaquisme, realització d'exercici, obesitat, consum d'alcohol,

hipertensió, diabetes, tractaments hormonal, dislipèmia, hiperuricèmia, antecedents personals de malalties cardiovasculars no coronàries, tipus de personalitat (incloent estrés i personalitat de tipus A), nivell d'estudis, situació laboral i estat civil (que pot indicar situacions d'estrés 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, com per exemple els fàrmacs hipolipemians, i que per tant podrien ésser rellevants a l'hora d'interpretar els resultats.

La campanya de recollida de la mostra de famílies es va estendre de gener de 1997 a juliol de 1998 i va ser efectuada per la Dra. Neus Valveny Llobet i l'autor de la present tesi 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.

### C. CARACTERÍSTIQUES DE LA MOSTRA DE FAMÍLIES

Les taules III.1 i III.2 exposen 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
<b>Total famílies</b>	<b>93</b>	<b>8</b>

*Taula III.1. Composició de les famílies que formen part de l'estudi.*

TIPUS D'INDIVIDU	HOMES	DONES	RANG D'EDAT (MITJANA ± E.S.)
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 al present estudi.*

Com es pot apreciar a la taula III.2, del total de fills afectats (101), el 92.07% (93) eren homes mentre que només el 7.93% (8) eren dones. Aquesta desproporció entre els sexes era totalment esperable en el rang d'edats mostrejat ja que en els homes l'edat d'incidència de la CAI es 10 anys inferior a la de les dones, diferència que pot arribar fins a 20 anys en el cas concret de l'infart de miocardi. En el cas dels progenitors, la proporció de sexes s'inverteix, estant més representades les dones que els homes (63.4 % i 36.6% del total de progenitors, respectivament), aquest fet també es esperable en aquest subgrup mostral amb una mitjana d'edat elevada ( $71 \pm 1.9$ ), en que molts dels progenitors del sexe masculí ja havien mort donades les diferències sexuals en les esperances de vida (75.9748 anys per als homes i 82.6391 anys per a les dones a Catalunya a l'any 1998 (BEC, 2000)).

A la taula III.3 es resumeix la informació sobre els antecedents personals i familiars dels 101 malalts afectats de CAI mostrejats a l'estudi.

*Taula III.3 (pàgina següent). Resum de les dades (obtingudes mitjançant el qüestionari) sobre els antecedents personals i familiars dels 101 malalts de Cardiopatia Isquèmica mostrejats.*

<sup>1</sup> BMI (Body mass index) = (pes en kg) / (alçada en m)<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Entés com una sensació continuada per part de l'individu de preocupació o ansietat i la impressió al llarg de tot el dia de no poder controlar els problemes amb que s'enfronta.

<sup>3</sup> Entesa com una forma de caràcter hiperactiu, més aviat dominant, sovint amb agressivitat continguda envers als altres (Friedman i Rosenman, 1959; Albright et al. 1988).

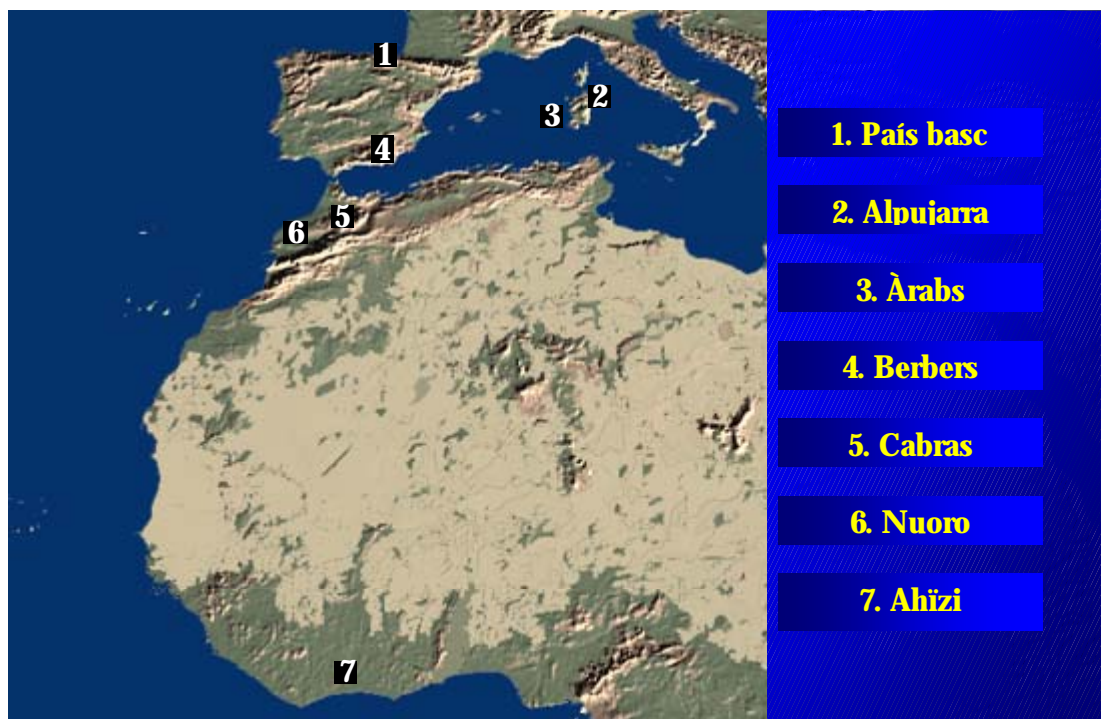


VARIABLE	CATEGORIES	% MALALTS	VARIABLE	CATEGORIES	% MALALTS
Dieta prèvia a l'aparició de la malaltia	Normal	34.0%	Diagnòstic inicial de CAI	Infart de Miocardi	71.7%
	Rica en greixos	46.0%		Angor evolutiu	18.2%
	Pobre en greixos	1.0%		Angor crònic	4.0%
	Per a diabètics	1.0%		Assimptomàtics	6.1%
BMI <sup>1</sup>	<25 (normal)	19.8%	Antecedents familiars de CAI	Només paterns	20.0%
	25-30 (sobrepès)	65.3%		Només materns	25.0%
	>30 (obès)	14.9%		Paterns i materns	20.0%
Exercici	Gens	45.7%	Antecedents familiars de dislipèmies	Cap	35.0%
	Moderat	34.0%		Només paterns	10.0%
	Fort	20.2%		Només materns	25.0%
Consum d'alcohol	Gens	39.4%	Tractament actual dislipèmia	Paterns i materns	5.0%
	<30 g/dia	50.0%		Cap	55.0%
	>30 g/dia	10.6%		Hipolipemiant	4.0%
Fumador previ a l'aparició de la malaltia	Gens	17.0%	Antecedents familiars de AVC	Dieta baixa en greixos	27.0%
	<15 cigarretes/dia	8.0%		Dieta+hipolipemiant	30.0%
	15-25 cigarretes/dia	28.0%		Només paterns	15.0%
	>25 cigarretes/dia	47.0%		Només materns	22.0%
Fumador en l'actualitat	Gens	73.5%	Regió de naixement dels avis	Paterns i materns	10.0%
	<15 cigarretes/dia	11.2%		Cap	53.0%
	15-25 cigarretes/dia	13.3%		Catalunya	27.6%
	>25 cigarretes/dia	2.0%		Andalusia i Múrcia	40.8%
Hipertensió		30.6%			
Estrés <sup>2</sup>		66.3%			
Personalitat tipus A <sup>3</sup>		42.2%			
Diabetes	Tipus I	2.0%			
	Tipus II	8.0%			
Dislipèmia	Hipercolesterolèmia	60.6%			
	Hipertrigliceridèmia	33.7%			
Malaltia Vascul. Perifèrica		15.6%			
Mal.Cerebrovasc.		2.1%			
				Extremadura	4.9%
				Balears	0.6%
				Altres	1.1%

## 1.2. MOSTRES POBLACIONALS

### A. LOCALITZACIÓ GEOGRÀFICA I CRITERIS DE MOSTREIG

Han estat sotmeses a estudi 7 mostres poblacionals d'origen divers, aquestes són les següents: País Basc, Alpujarra, àrabs (Marroc), berbers (Marroc), Cabras (Sardenya), Nuoro (Sardenya) i Ahizi (Costa d'Ivori). Amb l'inclusió d'aquestes mostres a l'estudi es pretén, paral·lelament a l'estudi d'associació en famílies, el coneixement de la variació poblacional dels gens de l'hemostasi, centrant-nos principalment a la regió de la Mediterrània Occidental a la que pertanyen 6 de les 7 mostres analitzades. La distribució geogràfica de les mateixes és mostrada a la figura III.1. Les 7 poblacions es troben distribuïdes en un eix Nord-Sud amb una distància de 4200 Km entre la població més septentrional (País Basc) i la més meridional (Ahizi).



*Figura III.1. Localització geogràfica de les mostres poblacionals utilitzades.*

Dins del bloc de poblacions de la Mediterrània Occidental estudiades es poden distingir tres grups:

**1. Poblacions de la Península Ibèrica.** Aquestes poblacions (País Basc i Alpujarra), pertanyen al conjunt de la població espanyola així com la mostra de 101 famílies nuclears amb CAI, aquesta última es troba formada per individus procedents de tota la geografia espanyola, especialment d'Andalusia, Múrcia, Catalunya i Castella (veure taula III.3).

**2. Poblacions del nord d'Àfrica.** D'aquesta localització geogràfica han estat estudiades dues mostres poblacionals corresponents als principals grups etnolingüístics del Marroc: àrabs i berbers. L'anàlisi d'aquestes mostres poblacionals permetrà investigar el grau d'homogeneïtat genètica existent entre elles i amb la resta de poblacions analitzades, especialment amb les mostres de la Península Ibèrica donada la seva proximitat geogràfica amb el nord d'Àfrica.

**3. Poblacions de l'illa de Sardenya.** Aquests dos grups poblacionals (Nuoro i Cabras), es caracteritzen per trobar-se localitzats a dues zones de l'illa amb un entorn ben diferent. Mentre que la regió de Cabras es localitza en un terreny pantanós de la costa occidental de l'illa, la regió de Nuoro es situa en una zona muntanyosa a la part nord-oriental de Sardenya. Aquest fet va condicionar una diferent incidència de malària entre aquestes dues poblacions quan aquesta malaltia existia en aquesta illa. Així, mentre que a Nuoro no existeixen registres de la malaltia, a Cabras la malària va tenir una incidència elevada i només en una data relativament recent (l'any 1948) va aconseguir-se la seva erradicació. L'estudi de la composició genètica d'aquestes dues poblacions pretén contrastar, a través d'una possible diferència en la distribució de freqüències al·lèliques i haplotípiques entre elles, la hipòtesi formulada per Valveny (2000) en la qual s'atribueix part de la baixa incidència de CAI en les poblacions de l'àrea Mediterrània a una composició genètica protectora contra aquesta malaltia possiblement condicionada, entre d'altres factors, per la pressió selectiva exercida per la malària (endèmica en aquesta regió del món durant segles).

La població de la Costa d'Ivori va ésser inclosa a l'estudi com a població externa de referència, de composició genètica molt diferent a totes les que formen el bloc de poblacions de la Mediterrània Occidental.

Per totes les mostres poblacionals utilitzades, els criteris de mostreig van ser els mateixos en tots els casos, encaminats a obtenir una mostra poblacional homogènia i representativa de la regió segons criteris antropològics i històrics:

1. Els individus es seleccionen entre donants de sang, suposadament sans, als quals es demana el consentiment per a l'estudi mitjançant entrevista personal.
2. Els individus no poden estar emparentats entre ells, com a mínim fins al quart grau de parentiu.
3. Les persones mostrejades i els seus avantpassats han d'haver nascut en la zona d'interès almenys en les tres últimes generacions (els quatre avis).
4. Les mostres pertanyen a zones rurals, per evitar incloure individus provinents de les grans migracions del segle XX cap a les grans ciutats.

Aquestes mostres van ser recollides en diverses campanyes pel grup investigador de la Unitat d'Antropologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona dirigit pel doctor Pedro Moral Castrillo segons protocols aprovats pel comitè ètic de la institució en cada cas.

## **B. POBLACIONS ESTUDIADADES**

A continuació es farà una descripció de les característiques de cada una de les poblacions estudiades en la present tesi.

**1. País Basc.** La mostra de bascos està constituïda per 112 individus (homes/dones= 1.1) entre 22 i 56 anys d'edat, procedents de zones rurals de la província de Guipúscoa, al País Basc. Aquesta mostra va ésser recollida en una campanya efectuada per el Dr. Pedro Moral Castrillo de la Unitat d'Antropologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. L'ascendència basca va ser controlada a través del requisit que els quatre cognoms dels pares de l'individu fossin d'origen basc, i per interrogació directa del recol·lector a cada un dels individus mostrejats contrastant l'informació així obtinguda amb el coneixement al respecte dels representants locals del *Banco de Sangre de Guipúzcoa*.

**2. Alpujarra.** L'Alpujarra és una regió muntanyosa localitzada al Sud de Sierra Nevada. Dins d'aquesta mostra poblacional han estat inclosos 100 individus (homes/dones = 1) entre 25 y 54 anys d'edat pertanyents als municipis de Ohanes, Berja, Adra i Laujar de Andarax situats a la província d'Almeria. La mostra va ser recollida per el Dr. Pedro Moral Castrillo en col·laboració amb el *Departamento de Hematologia* i la *Hermandad de Donantes de Sangre* del *Hospital de Torrecárdenas* d'Almeria mitjançant unitats mòbils que es desplaçaven a les zones rurals on calia mostrejar. L'Alpujarra ha estat refugi en les repetides invasions que ha sofert Andalusia, aquest fet ha repercutit en la composició genètica de les poblacions d'aquesta regió. Per altra banda, es creu que l'Alpujarra ha tingut força aportacions genètiques de la regió Nord-Africana com a conseqüència d'aconteixements històrics relacionats amb l'ocupació musulmana de la Península Ibèrica.

**3. Àrabs de Marroc.** En aquesta mostra han estat recol·lectats individus en els quals la pertinença al grup etnolingüístic àrab es remunta com a mínim fins a les tres últimes generacions. Es van mostrejar un total de 101 individus (homes/dones = 1.3) amb una edat compresa entre els 20 i els 50 anys. Aquests individus pertanyen a diverses regions de la franja central del Marroc: Chaouia, Doukkala, Abda i Tadla. La recollida de material sanguini va ser possible gracies a la col·laboració de diferents hospitals del Marroc a través del Dr. Mustafà Kandil del *Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Chouaib Doukkali*, El Jadida (Marroc).

**4. Berbers de Marroc.** En aquesta mostra han estat recol·lectats individus en els quals la pertinença al grup etnolingüístic berber es remunta com a mínim fins a les tres últimes generacions. Van ser mostrejats un total de 140 individus (homes/dones = 1) amb una edat compresa entre els 20 i els 75 anys. Tots els individus van ser mostrejats a Khenifra, ciutat que al llarg de la història ha estat considerada la capital de totes les tribus berbers del Moyen-Atlas, regió del Marroc a la qual pertanyen tots els individus de la mostra. Les tribus a les que pertanyen els individus mostrejats s'agrupen en 4 confederacions (grups de tribus similars) principals: Zayane, Ichkern, Ait Sgougou i Beni M'Guild. La recol·lecció va ser duta a terme pel Dr. Nourdin Harich del *Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Chouaib Doukkali*, El Jadida (Marroc).

**5. Cabras (Sardenya).** En aquesta mostra han estat col·lectats individus pertanyents a diferents pobles de la regió de Cabras la qual es troba situada a la costa occidental de l'illa de Sardenya en un terreny pantanós. Com ja s'ha mencionat, l'interés d'aquesta mostra resideix en el seu passat recent de malària, aquesta malaltia fou erradicada d'aquesta zona l'any 1948. La mostra està formada per un total de 95 individus (homes/dones = 0.9) i va ser col·lectada a través de l'equip investigador del Dr. Giuseppe Vona del *Dipartimento di Biologia sperimentale "Bernardo Loddo", Sezione di scienze antropologiche* de Cagliari.

**6. Nuoro (Sardenya).** Diverses poblacions de Nuoro, regió muntanyosa situada a la zona nord-oriental de l'illa de Sardenya, són l'origen dels individus col·lectats en aquesta mostra. En contrast a la regió de Cabras, la regió de Nuoro no poseeix registres de malària, aquest fet pot haver provocat diferències en la composició gènica entre aquestes dues mostres com a conseqüència de la diferent pressió selectiva exercida per aquesta malaltia. Aquesta mostra està formada per un total de 93 individus (homes/dones = 1) i va ser col·lectada mitjançant l'equip investigador del Dr. Giuseppe Vona del *Dipartimento di Biologia sperimentale "Bernardo Loddo", Sezione di scienze antropologiche* de Cagliari.

**7. Ahizi (Costa d'Ivori).** Aquesta mostra inclou individus pertanyents a una ètnia del grup dels Akans anomenada Ahizi, fou col·lectada a un poble anomenat Nigui-Saff, localitzat a les rodalies de la capital de la Costa d'Ivori (Abidjan), mitjançant l'equip investigador del Dr Jean Michel Dugoujon del *Centre d'Anthropologie* de Toulouse. El número de persones que componen la mostra es de 122 (homes/dones = 0.7).

En totes les gràfiques i taules mostrades en els apartats on s'exposen els resultats i la discussió, les mostres poblacionals s'anomenen segons les següents abreviatures: BASC. (Bascos), ALPU. (Alpujarras), ÀRAB. (Àrabs), BERB. (Berebers), CABR. (Cabras), NUOR. (Nuoro) i AHÏZ. (Ahizi).

### 1.3. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

Tant en les famílies nuclears com en les mostres poblacionals el processament de les mostres va ser el mateix. En tots els casos es va recollir, mitjançant punció venosa en condicions de màxima esterilitat, sang total (10-20 ml) en tubs amb citrat de sodi com a anticoagulant. Aquesta sang va ser conservada a 4°C fins el moment del seu processament, l'interval de temps entre l'extracció i el processament no superava mai els 3 dies.

#### A. TRACTAMENT DE LES MOSTRES DE SANG

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 en el cas de les mostres poblacionals i a -80°C en el cas de les mostres de famílies ja que seria utilitzat per a realitzar determinacions plasmàtiques de parametres quantitius.
  - Fracció leucocitària (fase intermitja): aquesta es guardava a -40°C per al seu ús posterior per a extracció d'ADN.
  - 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 d'ADN de totes les mostres per tal de poder realitzar totes les determinacions genètiques.

#### B. EXTRACCIÓ DE L'ADN

L'ADN necessari per a les anàlisis genètiques va ésser extret de la fracció leucocitària seguint diferents protocols d'extracció (resina *Chelex 100*, *Bio-Rad Laboratories*, *Richmond, CA*; 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 de l'ADN, 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.



## **2. DETERMINACIONS GENÈTIQUES**

El primer pas en les determinacions genètiques de tots els marcadors analitzats va ser l'amplificació per PCR del fragment d'ADN que contenia la variabilitat. Aquestes amplificacions van ser realitzades en un termociclador *Perkin-Elmer 9600*. En funció de la metodologia utilitzada per a la detecció de la variació genètica, els polimorfismes analitzats poden dividir-se en 4 grups :

- Polimorfismes detectats per electroforesi directa del producte de PCR: FVII HVR4, FVII -323 10 pb INS/DEL, GPIIb 9 pb INS/DEL, i PLAT TPA25.
- Polimorfismes de longitud de fragments de restricció (RFLPs): FGB *HindIII*, FGB *BclI*, FGA *TaqI*, GPIIIa *TaqI*, i PAI-1 *HindIII*.
- Microsatèl·lits detectats mitjançant analitzador de fragments: GPIIIa (CT)<sub>n</sub>, PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub>, PLAT (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>, i PAI-1 (CA)<sub>n</sub>
- Polimorfisme de canvi nucleotídic simple (SNP) detectat per SSCP: GPIIb 3063C→T.

### **2.1. POLIMORFISMES DETECTATS PER ELECTROFORESI DIRECTA DEL PRODUCTE DE PCR**

Dins d'aquest grup van ésser analitzats els marcadors: FVII HVR4, FVII -323 10 pb INS/DEL, GPIIb 9 pb INS/DEL, i PLAT TPA25. La seqüència dels oligonucleòtids utilitzats i les condicions per a cada amplificació es descriuen a la taula III.4.

Un cop realitzada la PCR el producte amplificat va ser directament sotmés a electroforesi en gels d'agarosa o acrilamida. Les condicions utilitzades per a l'electroforesi, així com les bandes observades i la seva correspondència amb els al·lels per cada polimorfisme es mostren a la taula III.5.

Finalitzada la migració, els gels es tenyien en una solució de bromur d'etidi (10 mg/ml) durant aproximadament 30 minuts. La correspondència entre la grandària de les bandes observades (verificada per comparació amb marcador de pes molecular carregat als gels juntament amb les mostres) i els al·lels de cada polimorfisme es va assignar segons la bibliografia indicada a la taula III.4. En el cas concret del marcador FVII HVR4, aquesta assignació així com el número de repeticions contingut en cada al·lel van ser comprovats per purificació i seqüenciació directa del producte de PCR obtingut a partir d'individus



homozigots seguint el protocol indicat a l'annex 3. A la figura III.2 es mostra la seqüència obtinguda a partir d'un homozigot per a l'al·lel H7.

Aquests polimorfismes van ésser analitzats en les mostres poblacionals i en la mostra de famílies nuclears amb CAI. En la figura III.3, es mostren fotografies de gels d'electroforesi per cadascun d'aquests polimorfismes.

<b>OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS EN LA PCR</b>		
<b>POLIMORFISME</b>	<b>SEQÜÈNCIA</b>	<b>REFERÈNCIA</b>
<b>FVII HVR4</b>	5' AAT GTG ACT TCC ACA CCT CC 3' 5' GAT GTC TGT CTG TCT GTG GA 3'	Marchetti et al. (1991)
<b>FVII -323 10 pb INS/DEL</b>	5' AGG CTC TCT TCA AAT AAT TAC ATC 3' 5' CGG GCT GGC TCC TGG ATT T 3'	Marchetti et al. (1993)
<b>GPIIb 9 pb INS/DEL</b>	5' CAG ACC TTC CAA GGG AGC TT 3' 5' GTG AGG ACC AAG ATT CTG GC 3'	Peyruchaud et al. (1995)
<b>PLAT TPA25</b>	5' GTG AAA AGC AAG GTC TAC CAG 3' 5' GAC ACC GAG TTC ATC TTG AC 3'	Tishkoff et al. (1996b)
<b>CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ</b>		
<b>POLIMORFISME</b>	<b>CONTINGUT DE LA PCR</b>	<b>CICLES DE LA PCR</b>
<b>FVII HVR4</b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid; 10% DMSO. (volum total= 25 µl)	92 °C 5' 92 °C 1' 57 °C 1.5' 70 °C 1.5' 70 °C 5' } x 30
<b>FVII -323 10 pb INS/DEL</b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid. (volum total= 25 µl)	93 °C 5' 93 °C 1' 57 °C 1' 70 °C 1' 70 °C 5' } x 30
<b>GPIIb 9 pb INS/DEL</b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid. (volum total= 25 µl)	98 °C 30'' 55 °C 30'' 72 °C 1' 72 °C 5' } x 30
<b>PLAT TPA25</b>	250 ng ADN; 0.6U <i>Taq</i> polimerasa; 200 µM DNTPs; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 pmols de cada oligonucleòtid. (volum total= 25 µl)	94 °C 5' 94 °C 1' 61 °C 1' 72 °C 1' 72 °C 5' } x 30

Taula III.4. Oligonucleòtids utilitzats i condicions d'amplificació per al VNTR del FVII i les insercions / delecions presents a FVII, GPIIb i PLAT.

POLIMORFISME	GEL	VOLTATGE / TEMPS	BANDES OBSERVADES
<b>FVII HVR4</b>	Agarosa 2.5%	130 V / 3h:20'	<b>H8</b> = 517 pb (8 repeticions) <b>H7</b> = 480 pb (7 repeticions) <b>H6</b> = 443 pb (6 repeticions) <b>H5</b> = 406 pb (5 repeticions)
<b>FVII -323 10 pb INS/DEL</b>	Poliacrilamida 4% (T4C5) <sup>1</sup>	200 V / 5h:15' (a 14 °C)	<b>I</b> = 582 pb (inserció)
<b>GPIIb 9 pb INS/DEL</b>			<b>D</b> = 572 pb (deleció)
<b>PLAT TPA25</b>	Agarosa 2%	120 V / 1h	<b>I</b> = 570 pb (inserció) <b>D</b> = 260 pb (deleció)

Taula III.5. Condicions de migració en l'electroforesi del VNTR del FVII i de les insercions / deleccions presents a FVII, GPIIb i PLAT.

<sup>1</sup> Dimensions: 18 cm alçada x 20 cm amplada, separadors de 2 mm (gruix). Composició per gel: 2.28 g d'acrilamida, 0.12 g de bisacrilamida, 4.26 ml de glicerol al 87% (v/v, en aigua), 300 µl d'APS al 1%, 99.6 µl de TEMED, afegint-se TBE 1x fins a un volum final de 60 ml. Els dos polimorfismes podien determinar-se en el mateix gel barrejant els productes de PCR per carregar-los junts. En el cas de FVII -323 10 pb INS/DEL calia dissoldre a la meitat el producte de la PCR abans de carregar-lo al gel.

```

GNNGNANNNNNNCCGAGTCNGCACNGACATCNCCTGTTTG
CGGGTGANTGGAGCTCAGTTGTGTAANGGGGACNCTGCAT
CAACACCATCTGNGTGGTCTCCGCGNCCACTGTTTCGAC
AAAATCAACGAACTGGAGGAACCTGATCGC
GGTGCTGGGTGGGTACCACTCTCCCCTGTCCNANCGC 1
AGTGCTGGGTGGGTGCCACTCTCCCCTGTCCGACCGC 2
GGTGCTGGGTGGGTGCCACTCTCCCCTGTCCGACCGC 3
GGTGCTGGGTGGGTGCCACTCTCCCCTGTCCGACCGC 4
NGTGCTGGGTGGGTGCCACTCTCCCCTGTCCGACCGC 5
GGTGCTGGGTGGGTGCCACTCTCCGCTGTCCGACCGC 6
AGTGCTGGGTGGGTACCACTCTCCCCTGTCTGACCGC 7
ATNTCTCAAGTGTCTCAGGGGCTGTGGCTCTGGGCTTTCGT
GCTGTCACTTCCACAGACAGACAACANTCATTTGGGTNNNN
NNNNGNNA

```

Figura III.2. Seqüència d'un al·lel H7 del polimorfisme FVII HVR4. En color blau es mostra la seqüència aliniada de les set unitats de 37 pb. Cadascuna està numerada amb un dígit de color vermell. (N = base que no ha pogut ser determinada pel seqüenciador).

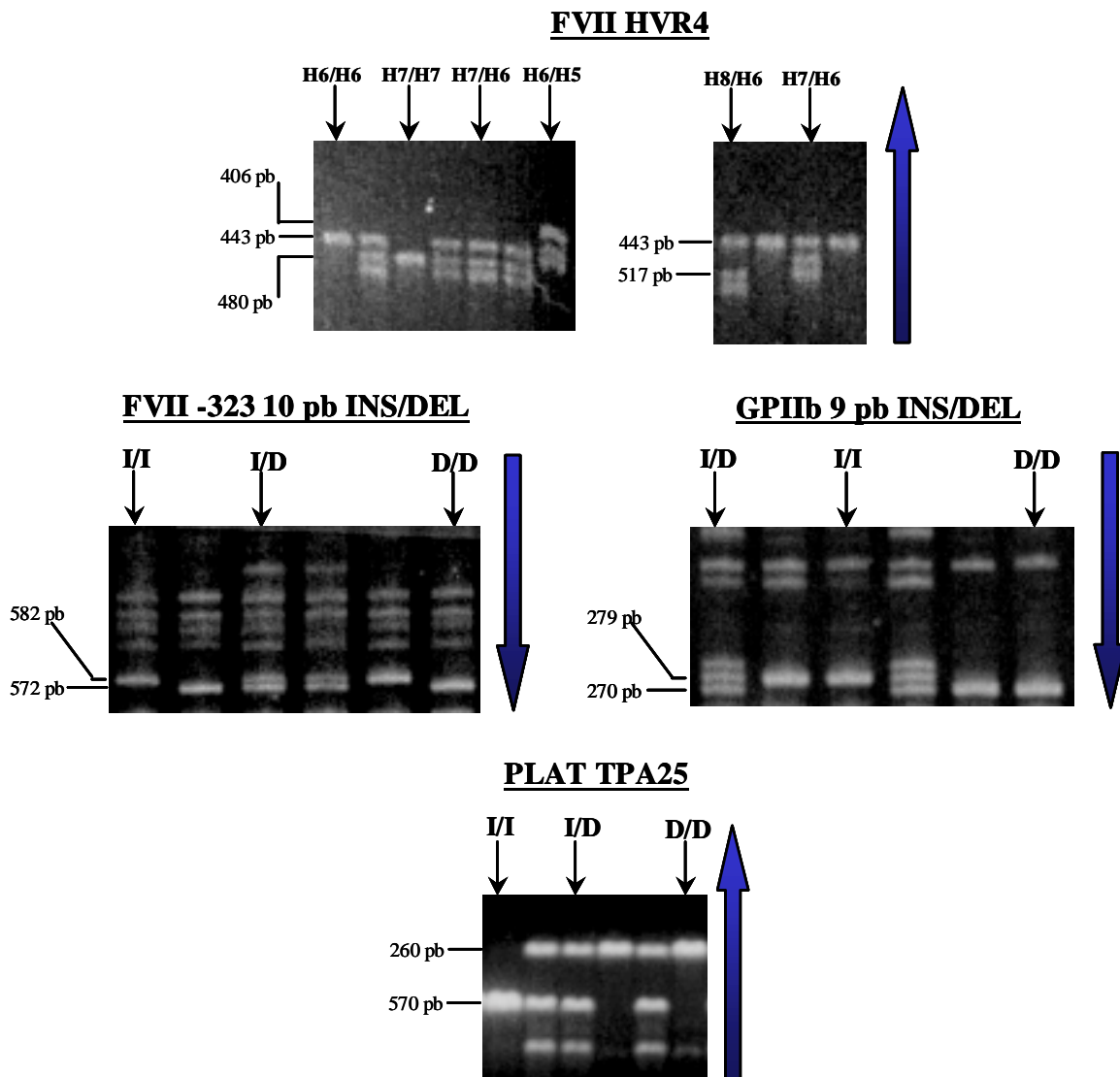


Figura III.3. Fotografies de gels d'electroforesi utilitzats en l'anàlisi del VNTR del FVII i les insercions / delecions presents a FVII, GPIIb i PLAT. Les fletxes blaves indiquen el sentit de la migració. En cada gel, a la part superior d'alguns carrils s'indica el genotip de l'individu i al costat es mostra el tamany de les bandes observades.

## 2.2. POLIMORFISMES DE LONGITUT DE FRAGMENTS DE RESTRICCIÓ (RFLPs)

Dins d'aquest grup van ser analitzats els polimorfismes FGB *HindIII*, FGB *BclI*, FGA *TaqI*, GPIIIa *TaqI* i PAI-1 *HindIII*. La seqüència dels oligonucleòtids utilitzats i les condicions per a cada amplificació es descriuen a la taula III.6.

En el cas dels polimorfismes FGB *HindIII*, GPIIIa *TaqI* i PAI-1 *HindIII*, els oligonucleòtids necessaris per a la PCR van ser dissenyats manualment en base a les seqüències dels gens que els contenen publicades en el GenBank. En el disseny es va tenir en compte que la longitud dels oligonucleòtids no superés les 20 bases, que el grau d'homologia interna fos el menor possible i que l'extrem 3' fos ric en G i C.

Un cop realitzada la PCR el producte amplificat era sotmés a digestió amb l'enzim de restricció corresponent. En cada cas, el resultat de la digestió va ser visualitzat per electroforesi en gels d'agarosa i posterior tinció dels mateixos en una solució de 10 mg/ml de bromur d'etidi durant 30 minuts. Les condicions sota les quals es van dur a terme aquestes digestions i les subsegüents electroforesis, es mostren a la taula III.7. A la mateixa taula s'exposa la grandaria de les bandes observades (verificada per comparació amb marcador de pes molecular carregat als gels juntament amb les mostres) i la seva correspondència amb els al·lels per a cada polimorfisme, aquesta es va ajustar al que s'esperava segons la bibliografia i les seqüències publicades citades a la taula III.6.

OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS EN LA PCR		
POLIMORFISME	SEQÜÈNCIA	REFERÈNCIA
<b>FGA <i>TaqI</i></b>	5' AGC CGT GCC TAT CTT TG 3' 5' TGT CTC AGG TAC ATT TAG C 3'	Thomas et al. (1994)
<b>FGB <i>HindIII</i></b>	5' TGG TTG CCT TGT GAG TAG G 3' 5' ATT GTC GTT GAC ACC TTG GG 3'	1
<b>FGB <i>BclI</i></b>	5' ACC TGG TTT TCT TGC CAC AAG 3' 5' AAT AGT TCT CAT ACC ACA GTG T 3'	Thomas et al. (1994)
<b>GPIIIa <i>TaqI</i></b>	5' TTT CTT GTC TTC TTG TGC CC 3' 5' TGT CTC CAA TCT TGA GTC CC 3'	2
<b>PAI-1 <i>HindIII</i></b>	5' AGC AAT CCA CCT GTC TCG GC 3' 5' TCC TGA CCT CAG GTG ATC CG 3'	3
CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ		
POLIMORFISME	CONTINGUT DE LA PCR	CICLES DE LA PCR
<b>FGA <i>TaqI</i></b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid. (volum total= 30 µl)	95°C 5' 95°C 1' 55°C 1' } x 35 <sup>4</sup> 72°C 1' 72°C 5'
<b>FGB <i>HindIII</i></b>		
<b>FGB <i>BclI</i></b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid. (volum total= 30 µl)	95°C 5' 95°C 1' 57°C 1' } x 35 72°C 1' 72°C 5'
<b>GPIIIa <i>TaqI</i></b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid. (volum total= 25 µl)	94°C 5' 94°C 30'' } x 35 60°C 30'' } 72°C 1' 72°C 5'
<b>PAI-1 <i>HindIII</i></b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid; 2.5% formamida. (volum total= 25 µl)	94°C 5' 94°C 30'' } x 35 66°C 30'' } 72°C 1' 72°C 5'

Taula III.6. Oligonucleòtids utilitzats i condicions d'amplificació per als RFLPs presents als gens *FGA*, *FGB*, *GPIIIa* i *PAI-1*.

<sup>1</sup> Oligonucleòtids dissenyats en base a la seqüència M64983 publicada a GenBank.

<sup>2</sup> Oligonucleòtids dissenyats en base a la seqüència M32674.1 publicada a GenBank.

<sup>3</sup> Oligonucleòtids dissenyats en base a la seqüència AF110527.1 publicada a GenBank.

<sup>4</sup> Aquests 2 polimorfismes van ser amplificats conjuntament en una PCR multiplex.

RFLP	CONTINGUT DIGESTIÓ	GEL	VOLTATGE / TEMPS	BANDES OBSERVADES
<b>FGA <i>TaqI</i></b>	- 1 <sup>er</sup> 2U <i>TaqI</i> ; 25µl PCR multiplex; H <sub>2</sub> O fins volum final 30µl. (O.N. 65 °C + oli mineral) <sup>1</sup>	Agarosa 1%	120 V / 1h	<b>T1</b> = 800 pb (digestió) <b>T2</b> = 900 pb (no digestió)
<b>FGB <i>HindIII</i></b>	- 2 <sup>on</sup> 2U <i>HindIII</i> ; 25µl PCR multiplex restants de digestió <i>TaqI</i> ; H <sub>2</sub> O fins volum final 30µl. (O.N. 37 °C) <sup>2</sup>	Agarosa 1.5%	130 V / 1h	<b>Hd1</b> = 194 i 266 pb (digestió) <b>Hd2</b> = 461 pb (no digestió)
<b>FGB <i>BclI</i></b>	2U <i>BclI</i> ; 25µl PCR; H <sub>2</sub> O fins volum final 30µl. (O.N. 50 °C + oli mineral)	Agarosa 1.5%	120 V / 1h	<b>B1</b> = 1400 i 1100 pb (digestió) <b>B2</b> = 2500 pb (no digestió)
<b>GPIIIa <i>TaqI</i></b>	2U <i>TaqI</i> ; 20µl PCR; H <sub>2</sub> O fins volum final 25µl. (O.N. 65 °C + oli mineral)	Agarosa 2%	120 V / 1h:15'	<b>T1</b> = 50 i 115 pb (digestió) <b>T2</b> = 165 pb (no digestió)
<b>PAI-1 <i>HindIII</i></b>	2U <i>HindIII</i> ; 20µl PCR; H <sub>2</sub> O fins volum final 25µl. (O.N. 37 °C)	Agarosa 2%	120 V / 45'	<b>Hd1</b> = 102 i 292 pb (digestió) <b>Hd2</b> = 394 pb (no digestió)

*Taula III.7. Condicions de digestió i migració electroforètica per als RFLPs presents als gens FGA, FGB, GPIIIa i PAI-1.*

<sup>1,2</sup> *Aquest ordre de digestió (primer amb TaqI i després amb HindIII) és obligatori donat que el fragment amplificat de FGA conté la diana polimòrfica TaqI i dianes HindIII, en canvi el fragment amplificat a FGB conté la diana polimòrfica HindIII però no conté dianes TaqI. El fet d'invertir aquest ordre de digestió impediria determinar el polimorfisme TaqI al gen FGA.*

Aquests polimorfismes van ésser analitzats en les mostres poblacionals i en la mostra de famílies nuclears amb CAI. En la figura III.4, es mostren fotografies de gels d'electroforesi per cadascun d'aquests polimorfismes.

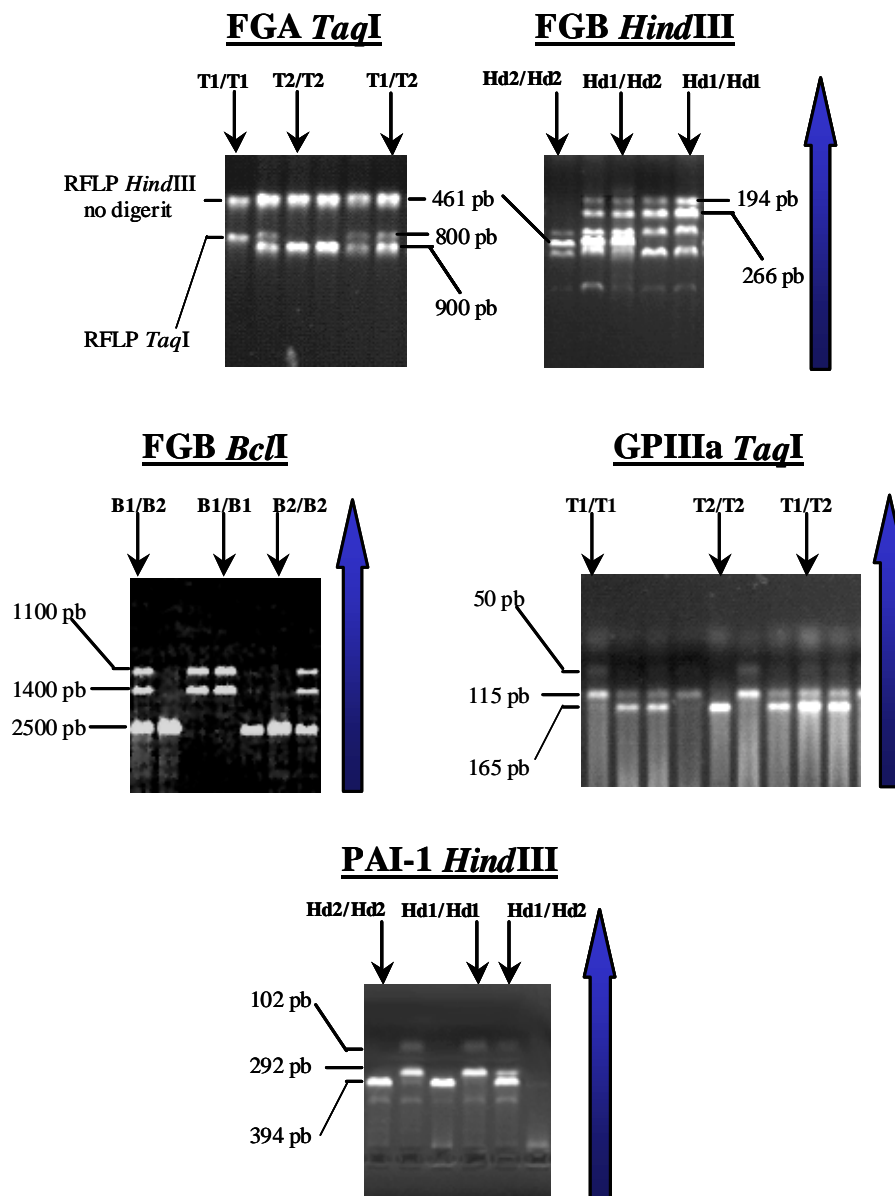


Figura III.4. Fotografies de gels d'electroforesi utilitzats en l'anàlisi dels RFLPs presents a FGA, FGB, GPIIIa i PAI-1. Les fletxes blaves indiquen el sentit de la migració. En cada gel, a la part superior d'alguns carrils s'indica el genotip de l'individu i al costat es mostra el tamany de les bandes observades.

### 2.3. MICROSATÈL·LITS DETECTATS MITJANÇANT ANALITZADOR DE FRAGMENTS

Dins d'aquest grup van ser analitzats els microsatèl·lits: GPIIIa (CT)<sub>n</sub>, PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub>, PLAT (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>, i PAI-1 (CA)<sub>n</sub>.

Donat que aquests marcadors són STRs (*Short Tandem Repeats*), on l'unitat bàsica de repetició és un dinucleòtid, l'anàlisi de la variabilitat generada per aquests polimorfismes requereix una gran precisió ja que en molts casos la diferència entre dos al·lels és només de 2 pb. Per tal de superar aquesta dificultat tècnica en el present treball es va decidir utilitzar amplificació per PCR amb oligonucleòtids marcats amb fluorescència amb una posterior detecció dels diferents al·lels a través d'un analitzador de fragments.

Els oligonucleòtids emprats en les amplificacions per PCR són descrits a la taula III.8. Només un oligonucleòtid de cada parella estava marcat (a 5') amb un fluorocrom.

Es va dissenyar una PCR multiplex que va permetre l'amplificació conjunta dels microsatèl·lits GPIIIa (CT)<sub>n</sub>, PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> i PAI-1 (CA)<sub>n</sub>, mentre que el microsatèl·lit PLAT (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> va ser amplificat per separat. Les condicions per a aquestes amplificacions són també mostrades a la taula III.8.

Un cop realitzades les PCRs, els productes d'amplificació van ser analitzats simultaneament en l'analitzador de fragments, preparant-se per a cada mostra individual una solució que contenia:

- 1 µl de dilució 1:10 en aigua del producte de la PCR multiplex GPIIIa (CT)<sub>n</sub>, PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> i PAI-1 (CA)<sub>n</sub>.
- 1 µl (sense diluir) del producte de la PCR que amplifica PLAT (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>
- 10.5 µl de formamida desionitzada.
- 0.5 µl de marcador de pes molecular *MapMarker*<sup>TM</sup> 70-400bp (*Bioventures Inc. U.S.A.*) marcat amb fluorocrom ROX (carboxi-X-rodamina).

A continuació, cada solució individual es sotmetia a 100 °C durant 5 minuts per tal de desnaturalitzar-ne l'ADN. Un cop consumit aquest temps les mostres eren dipositades immediatament en gel.



OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS EN LA PCR		
POLIMORFISME	SEQÜÈNCIA	REFERÈNCIA
<b>PLAT (CA)<sub>15</sub>(TC)<sub>10</sub></b>	PLAT1a <b>HEX</b> 5' GCC TGG ACA ACA TAG AGA AAA CC 3' PLAT1b 5' ACT TCA GGC ATG TGC CAC TG 3'	Sadler et al. (1991)
<b>PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>	PLAT5 <b>NED</b> 5' GAC AGC ACA TTC TCT TAG CAA 3' PLAT6 5' GTG ATG GAG TCA GAC CTT GTC 3'	Thomas i Drayna (1992)
<b>GPIIIa (CT)<sub>n</sub></b>	GPIIIa-1 <b>HEX</b> 5' AGC CAT TGC TCC TAG TGG AG 3' GPIIIa-2 5' GCT AAA TCA TCC TTA GCC TTC 3'	Stoffel i Bell (1992)
<b>PAI-1 (CA)<sub>n</sub></b>	PAI 1 <b>6-FAM</b> 5' ATT TGA ACC GGA TTC GGA GGC TGC 3' PAI 2 5' CCC CTG TTC ACT GCT CCC CTA TTC 3'	Dawson et al. (1991)
CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ		
POLIMORFISME	CONTINGUT DE LA PCR	CICLES DE LA PCR
<b>PLAT (CA)<sub>15</sub>(TC)<sub>10</sub></b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5.1 pmols PLAT1a/ PLAT1b; 1.2% Formamida. (volum total= 25 µl)	94°C 5' 94°C 1' 60°C 1' } x 30 72°C 1' 72°C 10'
<b>PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b> <b>GPIIIa (CT)<sub>n</sub></b> <b>PAI-1 (CA)<sub>n</sub></b>	250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1.8 pmols PLAT5/PLAT6; 3.3 pmols GPIIIa-1/GPIIIa-2; 0.6 pmol PAI-1 1/ PAI-1; 1.2% Formamida. (volum total= 25 µl)	94°C 5' 94°C 1' 60°C 1' } x 30 72°C 1' 72°C 10'

Taula III.8. Oligonucleòtids utilitzats i condicions d'amplificació per als microsatèl·lits presents als gens *PLAT*, *GPIIIa* i *PAI-1*. Els oligonucleòtids marcats s'indiquen amb el nom del fluorocrom emprat en el marcatge (*HEX* o 3, 6-hexaclorofluoresceïna; *NED* o 7', 8'-benzo-5'-fluoro-2', 4, 7-tricloro-5-carboxifluoresceïna; i *6-FAM* o 6-carboxifluoresceïna) en negreta i a 5' dels mateixos.

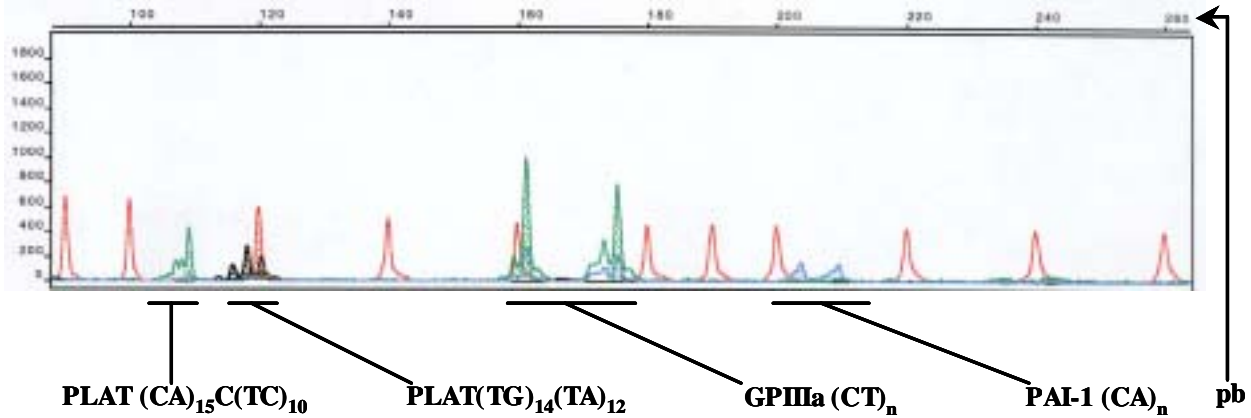
En l'anàlitzador de fragments les mostres eren sotmeses a electroforesi en capilars que en funció de l'aparell utilitzat, podien contenir el polímer POP-4<sup>TM</sup> o el polímer POP-6<sup>TM</sup> (*PE Applied Biosystems*). D'aquesta manera es separaven els al·lells que formen aquests polimorfismes. L'electroforesi era acompanyada per un sistema de lectura a través d'un làser que excitava els diferents fluorocroms utilitzats en el marcatge dels oligonucleòtids, i un filtre (anomenat D) mitjançant el qual es llegia la fluorescència després de cada fluorocrom (verda per HEX, blava per 6-FAM, groga per NED i vermella per ROX). De l'electroforesi i la lectura amb làser de la mateixa es despenien electroforogrames que es visualitzaven i analitzaven a través del programa *GeneScan<sup>®</sup> Analysis Software 3.5*. L'addició de marcador de pes molecular marcat amb fluorocrom ROX a cada mostra va permetre que aquest programa pogués determinar, per comparació, la grandària en pb dels pics corresponents a cada al·lel. En la figura III.5, es mostren fragments d'electroforogrames amb exemples de lectura d'alguns al·lells dels microsatèl·lits estudiats.

En la determinació de la variabilitat generada pels microsatèl·lits GPIIIa (CT)<sub>n</sub>, PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> i PAI-1 (CA)<sub>n</sub> es va utilitzar un analitzador de fragments *ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer*. Per altra banda, pel microsatèl·lit PLAT (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> es va utilitzar un analitzador de fragments *ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer*. Ambdós aparells pertanyen als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Donat que diferents analitzadors de fragments poden donar lectures diferents d'una mateixa mostra, mostres que ja havien estat genotipades amb l'*ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer* van ser també genotipades amb l'*ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer* per tal d'obviar les possibles diferències de lectura entre els analitzadors que en el nostre cas van resultar ser de 2 nucleòtids.

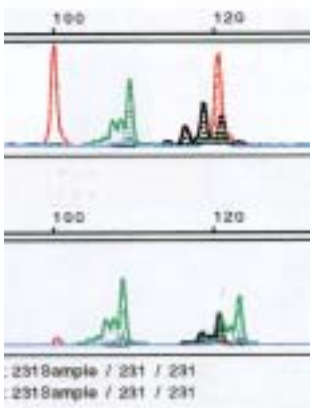
Aquests polimorfismes van ser només determinats en la mostra de famílies nuclears amb CAI donat l'elevat cost econòmic de la tècnica utilitzada.

*Figura III.5 (pàgina següent). Electroforogrames resultants de l'electroforesi per l'anàlisi dels microsatèl·lits presents a PLAT, GPIIIa i PAI-1. A la part superior es mostra un electroforograma on es veuen els pics produïts pels 4 microsatèl·lits estudiats. A la part inferior es mostren fragments d'electroforogrames corresponents a cada microsatèl·lit on es poden veure diferents al·lells que s'anomenen amb un número que indica la grandària dels mateixos en pb. Els pics vermells en tots els electroforogrames són produïts pel marcador de pes molecular.*

### Electroforogrames dels VNTRs



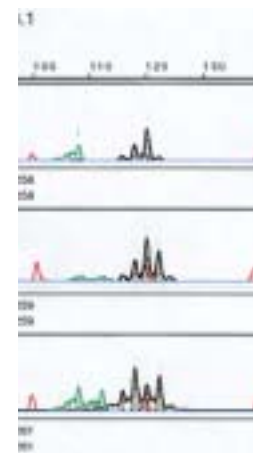
**PLAT (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> (color verd)**



**109 / 109**

**109 / 123**

**PLAT(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> (color negre)**

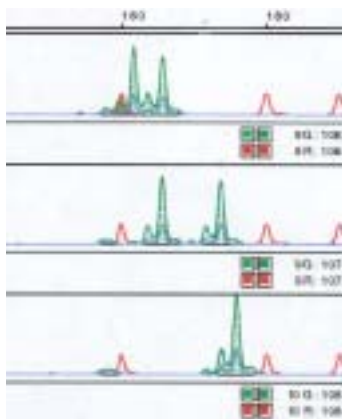


**120 / 120**

**120 / 122**

**118 / 122**

**GPIIIa (CT)<sub>n</sub>**

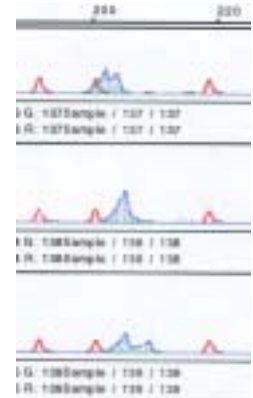


**162 / 166**

**166 / 174**

**176 / 176**

**PAI-1 (CA)<sub>n</sub>**



**201 / 203**

**205 / 205**

**205 / 209**

## 2.4. POLIMORFISME DE CANVI NUCLEOTÍDIC SIMPLE (SNP) DETECTAT PER SSCP

La variabilitat del polimorfisme GPIIb 3063C→T es va analitzar mitjançant la tècnica de SSCP (*Single Strand Chain Polymorphism*).

Els oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació de l'exó 30 del gen GPIIb que conté aquest polimorfisme van ser descrits per Ruan i col·laboradors (1998) i són els següents:

5' CCC AAA GCT TGG AGG CAA CT 3'

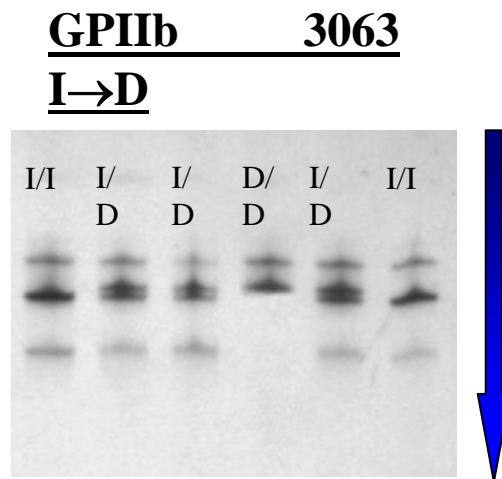
5' CAG CAA ATC ATC TGT ATA CCC T 3'

Els reactius, temperatures i temps emprats en la reacció d'amplificació van ser els següents:

250 ng ADN; 1U <i>Taq</i> polimerasa; 100 µM DNTPs; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 7.5 pmols de cada oligonucleòtid. (volum total= 25 µl)	98°C 30'' } 55°C 30'' } x 30 72°C 1' } 72°C 5'
--	---

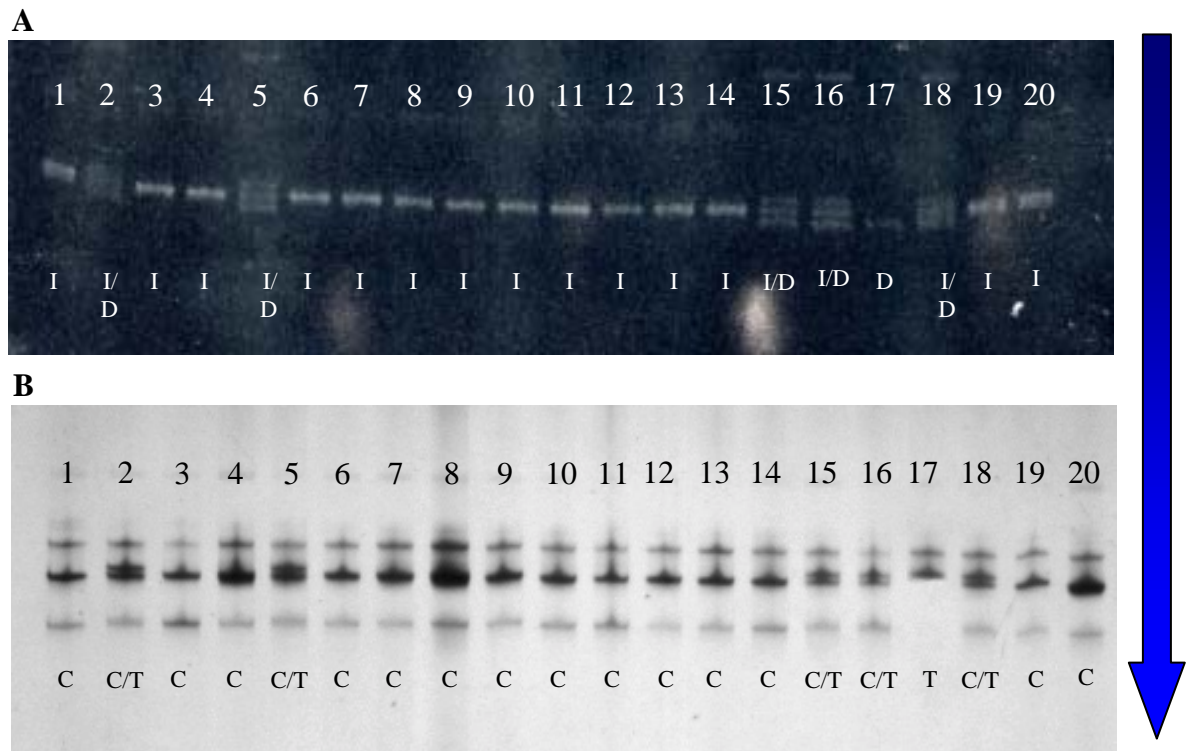
Després de l'amplificació, per cada individu, 5 µl de mostra eren barrejats amb 7 µl de solució stop (formamida 95% (v/v), 10 mM EDTA, blau de bromofenol 0.05% (p/v), xilè cianol 0.05% (p/v)). A continuació, la mescla era sotmesa a 100 °C durant 5 minuts i posteriorment posada en gel de forma immediata per tal de mantenir desnaturalitzat l'ADN.

Les mostres així preparades van ser carregades en gels *GeneGel Excel 12.5/24* (12.5% T, 2% C) (*Amersham Pharmacia Biotech AB*) que havien estat previament sotmesos a 400 V i 60 Vh. L'electroforesi es va realitzar en un sistema *GenePhor Electrophoresis Unit* (*Amersham Pharmacia Biotech AB*) a una temperatura constant de 5 °C i a un voltatge de 250 V i 620 Vh. Finalitzada la migració els gels eren tenyits en una solució de nitrat de plata mitjançant el kit *DNA Silver Staining Kit* (*Amersham Pharmacia Biotech AB*). En la figura III.6, es mostra la fotografia d'un gel on es poden apreciar els 2 al·lels (C i T) d'aquest polimorfisme.



*Figura III.6. Fotografia de gel d'anàlisi per SSCP del polimorfisme GPIIb 3063C→T. La fletxa blava indica el sentit de migració en l'electroforesi. A la part superior de cada carril s'indica el genotip de l'individu.*

En un estudi anterior (Ruan et al, 1998) va ser descoberta una associació al·lèlica total entre aquest polimorfisme i GPIIb 9 pb INS/DEL en una mostra de 56 individus caucasoides d'origen europeu, aquest dos marcadors es troben separats per 5 kilobases. Es va decidir comprovar si aquests dos polimorfismes realment aportaven la mateixa informació. Per a tal fi, es van triar a l'atzar 25 individus de la mostra de famílies nuclears en els que es van determinar els dos polimorfismes. Com es pot observar a la figura III.7, en el present estudi també es va observar aquesta associació al·lèlica completa, de la mateixa manera que en el mencionat estudi, els al·lells que es van mostrar associats van ser I amb C i D amb T. Per aquesta raó es va decidir descartar la determinació del polimorfisme GPIIb 3063C→T en les mostres a estudiar en favor de GPIIb 9bp INS/DEL de més fàcil i econòmica detecció.



*Figura III.7. Associació al·lèlica completa entre els marcadors 9 pb INS/DEL i 3063 C→T al gen GPIIb. A: Gel d'electroferesi per 9 pb INS/DEL. B: Gel d'anàlisi per SSCP de 3063C→T. En els gels A i B es mostren els mateixos individus numerats del 1 al 20 a la part superior del carril, a la part inferior del mateix s'hi mostra el genotip. Els homozigots hi són indicats com I (homozigot inserció 9 pb), D (homozigot deleció 9 pb), C (homozigot C posició 3063), i T (homozigot T posició 3063). La fletxa blava indica el sentit de migració en l'electroferesi.*

### **3. DETERMINACIONS DELS CARÀCTERS QUANTITATIUS EN SÈRUM**

Com ja s'ha vist en el punt 2.3 de la introducció, la probabilitat de manifestar clínicament la CAI està determinada pels nivells de molts caràcters quantitius intermedis, les distribucions dels quals estan al seu torn influenciades per la segregació de molts gens i per variables ambientals. Com també s'ha indicat anteriorment, els nivells plasmàtics dels productes proteïcs (o de les activitats dels mateixos) codificats per alguns dels gens triats com a candidats en el present treball (fibrinogen, factor VII, t-PA i PAI-1) han estat relacionats amb manifestacions clíniques de la CAI. D'altra banda, també ha estat exposada la dificultat per obtenir una mesura realment representativa d'aquests nivells plasmàtics. A aquesta dificultat es va unir el fet que a la recol·lecció de la majoria de les mostres utilitzades en aquest treball no fou factible seguir els requeriments específics per a aquestes anàlisis, fet que va desaconsellar la seva realització. Malgrat tot, sí que ha estat possible l'anàlisi de l'efecte dels gens estudiats sobre nivells lipídics plasmàtics, l'interès dels quals com a factors de risc per a la CAI ha estat ben establert, essent la primera vegada que s'investiga l'efecte de gens implicats en l'hemostasi (enlloc de gens implicats en el metabolisme lipídic) sobre aquests nivells plasmàtics. Aquest nou enfocament es basa en les correlacions (ja esmentades en l'apartat 4.1 de la introducció) entre els nivells plasmàtics dels productes d'alguns dels gens aquí estudiats i els nivells plasmàtics de determinats paràmetres lipídics. A aquest respecte, han estat utilitzades diverses mesures lipídiques analitzades previament a les mostres de famílies nuclears amb CAI que inclouen:

1. **Triglicèrids:** els seus nivells en sèrum han mostrat una correlació positiva amb els nivells de FVII:C (apartat A del punt 4.1 de la introducció) i de PAI-1 (apartat D del punt 4.1 de la introducció). La determinació dels nivells de triglicèrids en sèrum es va realitzar mitjançant el mètode enzimàtic TGO-PAP (laboratori *Roche*).

2. **Colesterol total, HDL colesterol i ApoB:** els nivells de LDL colesterol han estat correlacionats positivament amb els nivells de FVII:C (apartat A del punt 4.1 de la introducció), es van mesurar els nivells plasmàtics d'ApoB com a indicadors dels nivells de LDL colesterol ja que aquests dos valors es correlacionen en un 90%. La determinació dels nivells en sèrum de colesterol total i HDL colesterol es va realitzar mitjançant el mètode enzimàtic CHOD-PAP (laboratoris *Roche*). La determinació dels nivells sèrics d'ApoB es va dur a terme mitjançant mètodes turbidimètrics adaptats a l'analitzador *COBAS MIRA* fent servir anticossos específics dels laboratoris *Hoechst-Behring*.

3. **Lipoproteïna (a):** L'homologia estructural mostrada per la lipoproteïna (a) amb el plasminogen i el t-PA, especialment en les parts d'aquestes dues molècules que intervenen en la interacció amb la fibrina/ogen, ha portat a hipotetitzar una possible interferència en el procés de fibrinolisi per part d'aquest important factor de risc per la CAI (punt 4 de la introducció). En base a aquesta hipòtesi, en el present treball s'ha volgut investigar si els nivells en sèrum de lipoproteïna (a) estan influenciats per la variabilitat dels gens codificats per fibrinogen i t-PA. La quantificació de la lipoproteïna (a) en sèrum es va realitzar per un mètode turbidimètric adaptat a un analitzador *COBAS MIRA*, utilitzant anticossos específics procedents d'*Athlantic Antibodies, INCSTAR Corporation*.

Totes les determinacions quantitatives es van dur a terme al departament de Bioquímica de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, sota la direcció i supervisió de la Dra. Elena Casals, cap de la Unitat de Lípids.



## **4. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES**

### **4.1. ANÀLISI POBLACIONAL**

Donat el nivell d'observació al que es van detectar els polimorfismes, les freqüències genotípiques i al·lèliques per a cadascun d'ells van ésser determinades tant en les mostres poblacionals com en la mostra de famílies nuclears, mitjançant contacte genètic directe.

L'ajust a l'equilibri Hardy-Weinberg per part de les mostres per a cada polimorfisme es va comprovar mitjançant la realització del test  $\chi^2$  i a través d'un test de probabilitat anàleg al test exacte de Fisher, aquest darrer està especialment indicat en cas que el número de variants al·lèliques en un locus sigui molt elevat. En cas de mancança d'equilibri Hardy-Weinberg es van realitzar tests per a la detecció d'excés o defecte d'heterozigots. Tots aquests tests es van dur a terme mitjançant el programa GENEPOP 3.2a (Raymond i Rousset, 1995).

La determinació de les freqüències haplotípiques es va realitzar de dues maneres:

- a) Per contacte directe dels haplotips, aquest va ser el cas de la mostra de famílies nuclears, ja que fou possible la reconstrucció inequívoca de la major part dels haplotips dels que eren portadors els individus en base a la informació aportada per cada membre de la família.
- b) Per estimació de les freqüències haplotípiques mitjançant mètodes de màxima versemblança, aquest va ser el cas de les mostres poblacionals. Encara que existeixen certes controvèrsies sobre la consistència estadística d'aquest tipus d'estimacions, en general, s'accepta que aquesta és alta per a freqüències haplotípiques poblacionals amb valors superiors a 0.005, essent més discutible amb freqüències inferiors. En la present tesi, a partir de la mostra de famílies nuclears, s'ha pogut comprovar l'elevada consistència de les estimacions haplotípiques generades per màxima versemblança en comparació amb les obtingudes per contacte directe. A més, s'han utilitzat dos procediments diferents per tal de generar estimacions de màxima versemblança de les freqüències haplotípiques: un mitjançant l'algoritme EM (*Expectation Maximization*) implementat al programa ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al. 2000) i un altre utilitzant un mètode baiesià implementat al programa PHASE (Stephens et al. 2001). Només aquells haplotips amb

valors de freqüència estimada relativament elevats i, per tant, exents dels errors associats a les freqüències rares, han estat utilitzats en els posteriors càlculs d'estadístics poblacionals.

La diversitat intrapoblacional, tant per a marcadors individuals com per a haplotips, ha estat estimada mitjançant el càlcul de l'heterozigositat d'acord amb la fórmula:

$$\text{Het} = n(1 - \sum p_i^2) / (n-1)$$

on  $p_i$  és la freqüència d'un l'al·lel o haplotip determinat i n el número de cromosomes de la mostra. La variança de les estimacions de l'heterozigositat ha estat calculada mitjançant la fórmula de Nei (1987) implementada al programa ARLEQUIN 2.000.

L'heterogeneïtat entre les mostres poblacionals estudiades (diversitat interpoblacional) ha estat analitzada comparant les freqüències de cada marcador en parelles de poblacions i en tot el conjunt de grups analitzats. A partir de les freqüències genotípiques observades a cada marcador, s'ha realitzat una anàlisi utilitzant l'estadístic  $\chi^2$  per a una taula de contingència M x N amb (M-1)(N-1) graus de llibertat, on M és el número de poblacions, i N és el número d'al·lells. Les diferències interpoblacionals també han estat avaluades mitjançant test exacte de diferenciació. Aquest test és anàleg al test exacte de Fisher, però extès a una taula de contingència de 2X (número d'al·lells o haplotips), conjuntament amb un test exacte de diferenciació entre totes les poblacions estudiades agrupades per parelles (Raymond i Rousset, 1995; Goudet et al. 1996). Aquest test evita les incerteses associades a un número d'efectius baix en algunes caselles de la taula de comparació. Els valors de la probabilitat associats a cada comparació han estat estimats mitjançant 100000 passos de la cadena de Markov amb 1000 passos de dememorització. L'estudi de la diversitat interpoblacional total per a cada marcador estudiat es va realitzar mitjançant una anàlisi de la variança de les freqüències gèniques a través de l'estadístic  $F_{st}$  de Wright, calculat com a mitjana ponderada del  $F_{st}$  de tots els al·lells del locus (Nei, 1977 i Weir i Cockerham, 1984) en el conjunt de totes les mostres poblacionals estudiades per un costat i, per l'altre, en el conjunt de mostres de l'àrea mediterrània excloent la mostra d'Ahizi donada l'òbvia diferenciació d'aquesta respecte a les primeres.

El grau d'estructuració geogràfica de la variació genètica ha estat valorat mitjançant AMOVA (anàlisi molecular de la varianza). Per a tal fi, les mostres mediterrànies van ser agrupades de dues maneres diferents segons el seu origen geogràfic: per un costat una agrupació en tres regions representades per Península Ibèrica (Bascos i Alpujarras), Sardenya (Nuoro i Cabras) i Nord d'Àfrica (Àrabs i Berbers), i per altra banda, una agrupació en dos regions representades per la Mediterrània Nord (Bascos, Alpujarras, Nuoro i Cabras) i la Mediterrània Sud (Àrabs i Berbers). La mostra d'Ahizi va ser exclosa d'aquests dos tipus d'agrupació per les raons ja exposades al paràgraf anterior. L'AMOVA permet una anàlisi jerarquitzada del paràmetre  $F_{st}$ , (Wright, 1965) i una partició de la varianza freqüencial total en una component intrarregional ( $F_{sc}$ ) i una component interregional ( $F_{ct}$ ). La significació dels components de la varianza  $F_{st}$ , es va estimar mitjançant 16000 rèpliques de bootstrap a través del programa ARLEQUIN 2.000.

La diferenciació global entre poblacions per a diferents marcadors del mateix gen i per a tots els marcadors estudiats, es va analitzar mitjançant distàncies genètiques utilitzant el coeficient de Reynolds et al. (1983). Una representació de les relacions de distància genètica entre les mostres poblacionals va ser obtinguda mitjançant la construcció d'arbres neighbor-joining (Saitou y Nei, 1973), la robustesa dels quals va ser examinada a través del càlcul de 100 rèpliques de bootstrap. Per portar a terme aquestes anàlisis es va utilitzar el programa PHYLIP 3.6.

## **4.2. ANÀLISI EPIDEMIOLÒGICA**

Aquest tipus d'anàlisi es va dur a terme sobre la mostra de 101 famílies nuclears amb fills afectats per cardiopatia isquèmica. Un cop genotipats tots els individus, es va procedir a comprovar l'ajust mendelià dels mateixos. En 13 famílies, de les 101 sotmeses a estudi, es va observar una no correspondència genètica del fill afectat amb la resta de membres de la família, per aquesta raó van ésser eliminades de l'anàlisi.

## A. ESTUDI D'ASSOCIACIÓ MITJANÇANT EL TDT

Els tests de desequilibri de transmissió es van calcular mitjançant el programa TRANSMIT (Clayton, 1999a). Aquest programa inclou una opció per estimar les probabilitats dels resultats obtinguts mitjançant un test bootstrap. En aquest cas es va utilitzar aquesta opció amb una xifra de 10000 bootstraps per al càlcul de la significació dels tests. També es van realitzar alguns TDTs manualment (aquells on es va observar un desequilibri de la transmissió estadísticament significatiu en algun al·lel o haplotip) aplicant la fórmula exposada a l'apartat C del punt 2.5 de la introducció. En aquests tests, a més, es va calcular una aproximació del risc relatiu (RR) (Dobrusin et al. 2001) que implica el fet de ser portador de l'al·lel o l'haplotip en el que es va detectar l'esmentat desequilibri segons la fórmula:

$$RR = b / c$$

on b representa el número d'al·lells transmesos pels pares informatius als fills afectats i c el número d'al·lells no transmesos.

## B. ANÀLISI DELS PARÀMETRES SÈRICS QUANTITATIUS

L'estadística descriptiva i els càlculs de les mitjanes globals i per subclasses d'edat i sexe es van realitzar mitjançant el programa SPSS (Norusis, 1992).

Els tests de normalitat (Proves de Kolmogorov-Smirnov), regressions múltiples, correlacions i anàlisis de la variança amb introducció de covariables i variables independents es van dur a terme amb el programa SPSS.

La mitjana dels efectes gènics sobre els nivells lipídics plasmàtics analitzats es va determinar mitjançant anàlisi de regressió i a través de la mesura dels efectes al·lèlics (Hallman et al. 1994).

### 4.3. ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

La presència de desequilibri de lligament i la magnitud del mateix van ésser estudiades tant a nivell de les mostres poblacionals com a nivell de la mostra de famílies nuclears. En el cas de les mostres poblacionals l'estudi del desequilibri de lligament es va dur a terme amb la finalitat de poder fer inferències sobre les històries demogràfiques de les mateixes. El coneixement del desequilibri de lligament en el cas de les famílies nuclears és necessari per a una correcta interpretació dels resultats de l'estudi d'associació mitjançant TDT, ja que el grau d'associació d'una determinada variant al·lèlica o haplotípica amb la malaltia depèn de la magnitud del desequilibri de lligament entre aquestes variants i la veritable mutació causal, sempre i quan la variant al·lèlica o haplotípica associada no sigui la veritable mutació causal.

Per tal de mesurar el desequilibri de lligament dins de cada locus en les mostres poblacionals es va utilitzar el paràmetre  $\Delta$  (Black i Krafur, 1985) 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 número 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  $\Delta$  relativitzat ( $\Delta'$ ) al màxim valor possible d'aquest paràmetre ( $\Delta_{\max}$ ) en una mostra determinada. Aquest darrer es va calcular segons el següent criteri (Weir, 1996):

$$\text{si } \Delta_{ij} > 0, \Delta_{\max} = \text{mínim } (2(1-p_i)(p_j), 2(p_i)(1-p_j))$$

$$\text{si } \Delta_{ij} < 0, \Delta_{\max} = \text{mínim } (2p_i p_j, 2(1-p_i)(1-p_j))$$

essent el valor de  $\Delta'$  ( $\Delta$  relativa):

$$\Delta' = \Delta / \Delta_{\max}$$

Aquest paràmetre és el més escaient a l'hora de mesurar el desequilibri de lligament en mostres en les que es desconeixen les freqüències al·lèliques (o gamètiques) reals per tal de no basar el càlcul del desequilibri de lligament en estimacions d'aquestes freqüències. En el cas de locus amb més de dos al·lels, per cada parella de loci es va calcular la  $\Delta'$  seguint el model multial·lèlic (Eaves et al. 2000):

$$\Delta'_m = \sum_i \sum_j p_i p_j |\Delta'_{ij}|$$

En les mostres poblacionals també es va fer una anàlisi d'Ohta dels components de la variança del desequilibri de lligament (Ohta, 1982).

En el cas de la mostra de famílies nuclears, per tal de mesurar la magnitud del desequilibri de lligament es va utilitzar el paràmetre  $D'$  ( $D$  relativa) (Lewontin, 1964). Aixó va ser possible perquè en aquest cas sí es coneixien les freqüències haplotípiques reals ja que els haplotips dels individus d'aquesta mostra havien estat reconstruïts manualment de forma inequívoca. El paràmetre  $D'$  resulta de relativitzar el valor de  $D$  respecte al màxim valor possible d'aquest paràmetre ( $D_{\max}$ ) en una mostra determinada i és totalment comparable amb el valor de  $\Delta'$ .



## **PART 1. ESTUDI POBLACIONAL**

En aquest apartat s'exposen els resultats obtinguts en les 7 mostres poblacionals.

### **1.1 FACTOR DE COAGULACIÓ VII**

#### **A. VARIACIÓ AL·LÈLICA**

En la taula IV.1 s'exposa la distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels dos polimorfismes analitzats dins del gen FVII en les mostres estudiades. La representació gràfica d'aquestes freqüències al·lèliques es mostra a la figura IV.1.

En el marcador **-323 10 pb INS/DEL** s'observa que l'al·lel D és el més freqüent a totes les mostres amb uns valors que oscil·len entre 0.760 (Àrabs) i 0.972 (Bascos) en les poblacions mediterrànies, mentre que la freqüència a la mostra Sud-sahariana és notablement més baixa (0.574). Totes les poblacions analitzades van mostrar-se en equilibri Hardy-Weinberg (taula IV.1).

En el cas del polimorfisme **HVR4**, l'al·lel més freqüent va ser l'H6 amb freqüències que van oscil·lar entre 0.875 a Nuoro i el 0.632 als Bascos, incloent-se a dins d'aquest rang la freqüència mostrada per la població Sud-sahariana (0.769). Una particularitat d'aquest marcador fa referència al diferent número d'al·lells entre les mostres, donant-se els dos extrems al Nord d'Àfrica, on la mostra d'Àrabs va presentar un total de 4 al·lells, mentre que la mostra de Berbers només en va presentar 2. Dues de les poblacions analitzades no es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg: Nuoro i Ahizi (taula IV.1). En ambdues mostres es va observar una deficiència en el número d'heterozigots respecte al que s'hauria d'esperar sota equilibri essent els índexs de fixació ( $F_{is}$ ) 0.255 per a Ahizi i 0.443 per a Nuoro. Aquest marcador no va ser analitzat en la població de Cabras, ja que l'estat de les mostres d'ADN d'aquesta població no en va permetre una determinació òptima.



MARCADOR		BASC.	ALPU.	ARAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHIZ.
<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	<b>GENOTIPS:</b>							
	<b>I I</b>	-	0.041	0.052	0.017	0.074	0.102	0.165
	<b>I D</b>	0.057	0.237	0.375	0.256	0.277	0.250	0.521
	<b>D D</b>	0.943	0.722	0.573	0.727	0.649	0.648	0.314
	<b>N</b>	88	97	96	121	94	88	121
	<b>Het. (unb.)</b>	0.056	0.270	0.366	0.248	0.337	0.353	0.491
	<b>HW (p exacta)</b>	1	0.254	1	1	0.118	0.463	0.578
	<b>AL·LELS:</b>							
	<b>I</b>	0.028	0.160	0.240	0.145	0.213	0.227	0.426
	<b>D</b>	0.972	0.840	0.760	0.855	0.787	0.773	0.574
<b>HVR4</b>	<b>GENOTIPS:</b>							
	<b>H7H7</b>	0.154	0.105	0.120	0.037	-	0.031	0.096
	<b>H7H6</b>	0.428	0.379	0.398	0.407	-	0.125	0.240
	<b>H7H5</b>	-	0.021	-	-	-	-	-
	<b>H6H6</b>	0.418	0.474	0.458	0.556	-	0.813	0.635
	<b>H6H5</b>	-	0.021	0.012	-	-	-	0.029
	<b>H6H8</b>	-	-	0.012	-	-	-	-
	<b>H5H5</b>	-	-	-	-	-	0.031	-
	<b>N</b>	91	95	83	81	-	64	104
	<b>Het. (unb.)</b>	0.468	0.455	0.454	0.368	-	0.226	0.363
	<b>HW (p exacta)</b>	0.499	0.360	0.628	0.379	-	0.005★	0.023★
	<b>AL·LELS:</b>							
	<b>H7</b>	0.368	0.305	0.319	0.241	-	0.094	0.216
<b>H6</b>	0.632	0.674	0.669	0.759	-	0.875	0.769	
<b>H5</b>	-	0.021	0.006	-	-	0.031	0.014	
<b>H8</b>	-	-	0.006	-	-	-	-	

Taula IV.1. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII a les mostres estudiades. Het. (unb.): heterozigositat “unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. ★  $p < 0.05$ .

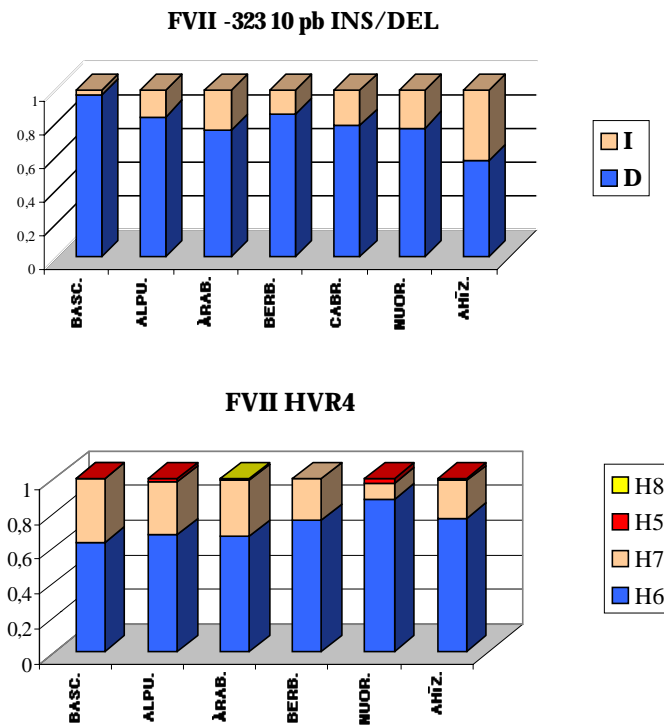


Figura IV.1. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII a les mostres estudiades.

**Diversitat intrapoblacional.** Els valors d'heterozigositat per a cada marcador i per a cadascuna de les mostres poblacionals són mostrats a la taula IV.1.

Al marcador **-323 10 pb INS/DEL**, les sis mostres mediterrànies van presentar valors d'heterozigositat que van oscil·lar entre 0.366 (Àrabs) i 0.056 (Bascos). Aquest últim valor és el més baix, amb diferència, d'entre totes les mostres poblacionals analitzades. La mostra d'Ahizi va mostrar la major heterozigositat (0.491), aquest valor és molt proper al màxim possible en un marcador bial·lèlic.

En el polimorfisme **HVR4**, les poblacions analitzades van mostrar, en general, valors de diversitat intrapoblacional més alts que en el cas de la inserció/deleció. Malgrat tot, els valors d'heterozigotat no arriben en cap cas al 0.5, valor que resulta baix per un marcador que pot arribar a presentar 4 al·lels diferents. Aquest fet es deu a l'elevada freqüència en totes les mostres dels al·lels H7 i H6, que implica que aquest polimorfisme es comporti gairebé com un marcador bial·lelic. Dins de les mostres mediterrànies els valors d'heterozigotat van oscil·lar entre 0.468 (Bascos) i 0.266 (Nuoro). La mostra d'Ahizi va presentar una diversitat dins d'aquest rang (0.363). En quant a la diversitat en el nombre d'al·lels, va resultar en certa manera sorprenent la gran diferència en aquest aspecte entre les mostres Nord-Africanes, ja que són molt properes geogràficament: els Àrabs van presentar 4 al·lels diferents (H7, H6, H5 i H8), mentre que els Berbers van presentar només 2 (H7 i H6). La resta de mostres van presentar tres al·lels (H7, H6 i H5), excepte els Bascos que només van presentar H7 i H6.

*Diversitat interpoblacional.* En les taules IV.2 i IV.3 s'exposen els resultats de la comparació entre poblacions, en funció a les freqüències al·lèliques dels dos marcadors estudiats, utilitzant el test de  $\chi^2$  i el test exacte de diferenciació.

En el cas del polimorfisme **-323 10 pb INS/DEL**, ambdós tests (taula IV.2) coincideixen en assenyalar les mostres d'Ahizi i de Bascos com les més diferenciades dins del conjunt ja que presenten diferències estadísticament significatives amb totes les altres poblacions. També s'observa heterogeneïtat entre les dues mostres marroquines, mentre que en la resta de comparacions no s'aprecien diferències significatives.

Per al polimorfisme **HVR4**, les comparacions efectuades (taula IV.3) indiquen a Nuoro com la població més diferenciada. Aquesta mostra, que posseeix la freqüència més alta de l'al·lel H6, presenta diferències significatives amb totes les altres poblacions comparades. Un cert grau de diferenciació és també observat en el cas de la població Sud-sahariana, contrastant amb la uniformitat de freqüències observades en aquest marcador a la resta de grups analitzats.

<b>-323 10 pb INS/DEL</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHÍZ.</b>
<b>BASC.</b>		18.137 0.00002 ★	34.302 0.00000 ★	15.904 0.00007 ★	28.516 0.00000 ★	31.212 0.00000 ★	83.900 0.00000 ★
<b>ALPU.</b>	0.00022 ★		3.847 0.04983 ★	0.193 0.66061	1.771 0.18332	2.710 0.09974	35.743 0.00000 ★
<b>ÀRAB.</b>	0.00000 ★	0.13210		6.359 0.01168 ★	0.390 0.53222	0.078 0.78043	16.435 0.00005 ★
<b>BERB.</b>	0.00079 ★	0.83991	0.04087 ★		3.411 0.06475	4.727 0.02969 ★	46.871 0.00000 ★
<b>CABR.</b>	0.00000 ★	0.56032	0.39351	0.26261		0.112 0.73838	21.597 0.00000 ★
<b>NUOR.</b>	0.00000 ★	0.49218	0.79316	0.21424	0.89527		17.811 0.00002 ★
<b>AHÍZ.</b>	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00410 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00152 ★	

Taula IV.2. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador -323 10 pb INS/DEL del gen FVII. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1 g, li}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.

<b>HVR4</b>						
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHÍZ.</b>
<b>BASC.</b>		5.174 2gll 0.07525	2.975 3gll 0.39553	6.524 1gll 0.01064 ★	33.955 2gll 0.00000 ★	13.010 2gll 0.00150 ★
<b>ALPU.</b>	0.47704		2.628 3gll 0.45253	5.630 2gll 0.05992	19.966 2gll 0.00005 ★	4.534 2gll 0.10360
<b>ÀRAB.</b>	0.81478	0.78387		4.698 3gll 0.19532	24.158 3gll 0.00002 ★	6.883 3gll 0.07572
<b>BERB.</b>	0.12038	0.13437	0.10447		15.029 2gll 0.00055 ★	2.587 2gll 0.27429
<b>NUOR.</b>	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00007 ★		9.192 2gll 0.01009 ★
<b>AHÍZ.</b>	0.00476 ★	0.09554	0.03361 ★	0.02035 ★	0.01529 ★	

Taula IV.3. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador HVR4 del gen FVII. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2$  juntament amb el seu número de graus de llibertat i amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.

Una anàlisi de la varianza de les freqüències al·lèliques en les poblacions analitzades indica un grau significatiu de variació per ambdós marcadors. El polimorfisme **-323 10 pb INS/DEL** va mostrar més diversitat dins del conjunt de totes les poblacions analitzades ( $F_{ST} = 0.084$ ,  $p < 0.0001$ ) que dins del grup de les 6 poblacions mediterrànies ( $F_{ST} = 0.037$ ,  $p < 0.0001$ ). Això era d'esperar donat l'alt grau de diferenciació mostrat per la població d'Ahizi. D'altra banda, el marcador **HVR4**, va presentar una diversitat en el total de les mostres analitzades ( $F_{ST} = 0.028$ ,  $p < 0.0001$ ) inferior a la detectada dins el grup de les mostres de l'àmbit mediterrani ( $F_{ST} = 0.034$ ,  $p < 0.0001$ ). Aquest fet s'explica per l'extrema diferenciació anteriorment indicada de la mostra sarda de Nuoro, i la relativa homogeneïtat de la sèrie Sud-sahariana dins del conjunt de les poblacions estudiades.

A la taula IV.4 es mostren els resultats de l'anàlisi de la diversitat gènica entre les mostres mediterrànies agrupades en funció del seu origen geogràfic (AMOVA). Per al marcador **-323 10 pb INS/DEL**, es va observar una diversitat gènica total ( $F_{ST}$ ) significativa en les dues agrupacions realitzades (I i II). En ambdós casos aquest paràmetre va ser condicionat pel valor de diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup ( $F_{SC}$ ) també significatiu en ambdues agrupacions. Donada la manca de diversitat gènica significativa entre grups de mostres ( $F_{CT}$ ) en els dos tipus d'agrupació, no es pot parlar d'una estructuració geogràfica en la distribució de les freqüències d'aquest polimorfisme dins de la Mediterrània Occidental. En el cas del marcador **HVR4** no es va poder fer l'agrupació de les mostres de Sardenya donat que aquesta només contindria la mostra de Nuoro, ja que no es va poder analitzar el polimorfisme a Cabras. La inclusió de mostres individuals com a agrupacions no és correcta en aquest tipus d'anàlisi. En l'agrupació II per a aquest polimorfisme es va observar una diversitat gènica total ( $F_{ST}$ ) significativa on la component més important va ser la diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup ( $F_{SC}$ ) en afegir, al grup de mostres de la Península Ibèrica de l'agrupació I, la mostra de Nuoro per a constituir el grup Mediterrània Nord de l'agrupació II. La no existència d'una diversitat gènica significativa entre grups de mostres ( $F_{CT}$ ) en les agrupacions I i II fa que en aquest polimorfisme tampoc no es pugui parlar d'una estructuració geogràfica en la distribució de les seves freqüències al·lèliques.

<b>-323 10 pb INS/DEL</b>				
<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>		<b>F<sub>ST</sub></b>	<b>F<sub>SC</sub></b>	<b>F<sub>CT</sub></b>
		<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.038 ★ p<0.0001	0.032 ★ 0.001	0.006 0.326
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.031 ★ p<0.0001	0.044 ★ p<0.0001	-0.014
<b>HVR4</b>				
<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>		<b>F<sub>ST</sub></b>	<b>F<sub>SC</sub></b>	<b>F<sub>CT</sub></b>
		<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)</b>	0.003 0.190	0.005 0.173	-0.002
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.026 ★ p<0.0001	0.046 ★ p<0.0001	-0.021

*Taula IV.4. Diversitat gènica en base als marcadors -323 10 pb INS/DEL i HVR4 entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic. F<sub>ST</sub>: diversitat gènica total. F<sub>SC</sub>: diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup. F<sub>CT</sub>: diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb p<0.05.*

**Comparació amb d'altres poblacions.** Els resultats obtinguts en les mostres estudiades en el present treball venen a complementar les poques dades poblacionals que existeixen a nivell mundial sobre la distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors **-323 10 pb INS/DEL** i **HVR4** del gen FVII, essent la primera vegada que aquests s'estudien en mostres de les procedències geogràfiques aquí analitzades. En les taules IV.5 i IV.6 es mostren les dades obtingudes a la present tesi conjuntament amb les que han pogut ser recollides a la bibliografia. Pel que fa al marcador **-323 10 pb INS/DEL**, s'observa que l'al·lel D és el més freqüent a totes les mostres (taula IV.5). Malgrat tot, s'aprecien certes diferències. La menor freqüència de l'al·lel D (0.574) s'observa a la mostra dels Ahizi. Amb freqüències lleugerament més altes d'aquest al·lel trobem els Afrocaribenys i els Inuit (0.671 i 0.680, respectivament). A continuació, les mostres de Gujuratis, Holanda, Italia, Regne Unit, Cabras, Nuoro, Berbers, Alpujarras i Àrabs presenten freqüències de D compreses entre 0.756 i 0.883. Finalment es destaca la mostra de Bascos per tenir la freqüència més alta de l'al·lel D (0.972). En el marcador **HVR4**, l'al·lel H6 és el més freqüent en les mostres analitzades en el present treball. Aquest fet no sempre s'observa a la bibliografia (taula IV.6). En el cas de la mostra Inuit l'al·lel més freqüent és l'H7

(0.621). La mostra de Gujuratis presenta freqüències similars per a aquest dos al·lels (0.444 per a H7 i 0.552 per a H6). La mostra de Nuoro presenta la major freqüència de l'al·lel H6 (0.875). La resta de mostres (tant les analitzades en la present tesi com les trobades en la bibliografia) presenten freqüències de l'al·lel H6 entre 0.632 (Bascos) i 0.769 (Ahizi). Pel que fa a la distribució dels al·lels rars d'aquest marcador entre totes les mostres exposades a la taula IV.6, l'al·lel H8 es presenta únicament a Dinamarca i a Àrabs amb freqüències 0.012 i 0.006 respectivament i l'al·lel H5 no es presenta a Berbers, Bascos ni Afrocaribenys, a la resta de mostres ho fa en freqüències sempre inferiors al 5%.

<b>-323 10 pb INS/DEL</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>I</b>	<b>D</b>	
<b>Inuit (Groenlàndia)</b>	133	0.320	0.680	de Maat et al. 1997
<b>Gujuratis (India)</b>	130	0.244	0.756	de Maat et al. 1997
<b>Afrocaribenys</b>	113	0.329	0.671	de Maat et al. 1997
<b>Caucasoides (Holanda.)</b>	182	0.139	0.861	de Maat et al. 1997
<b>Caucasoides (Italia)</b>	55	0.127	0.873	Dell'Acqua et al. 1997
<b>Caucasoides (U.K.)</b>	705	0.117	0.883	Humphries et al. 1996
<b>BASC.</b>	88	0.028	0.972	-
<b>ALPU.</b>	97	0.160	0.840	-
<b>ÀRAB.</b>	96	0.240	0.760	-
<b>BERB.</b>	121	0.145	0.855	-
<b>CABR.</b>	94	0.213	0.787	-
<b>NUOR.</b>	88	0.227	0.773	-
<b>AHĪZ.</b>	121	0.426	0.574	-

*Taula IV.5. Freqüències al·lèliques del polimorfisme -323 10 pb INS/DEL.*

<b>HVR4</b>						
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>				<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>H7</b>	<b>H6</b>	<b>H5</b>	<b>H8</b>	
<b>Caucasoides (Italia)</b>	225	0.356	0.638	0.007	-	Iacoviello et al. 1998
<b>Inuit (Groenlàndia)</b>	132	0.621	0.375	0.004	-	de Kniff et al. 1994
<b>Gujuratis (India)</b>	130	0.444	0.552	0.004	-	de Kniff et al. 1994
<b>Afrocaribenys</b>	110	0.227	0.723	-	-	de Kniff et al. 1994
<b>Caucasoides (U.K.)</b>	87	0.282	0.672	0.046	-	de Kniff et al. 1994
<b>Caucasoides (Dinamarca)</b>	42	0.274	0.690	0.024	0.012	de Kniff et al. 1994
<b>BASC.</b>	91	0.368	0.632	-	-	-
<b>ALPU.</b>	95	0.305	0.674	0.021	-	-
<b>ÀRAB.</b>	83	0.319	0.669	0.006	0.006	-
<b>BERB.</b>	81	0.241	0.759	-	-	-
<b>NUOR.</b>	64	0.094	0.875	0.031	-	-
<b>AHÏZ.</b>	104	0.216	0.769	0.014	-	-

*Taula IV.6. Freqüències al·lèliques del polimorfisme HVR4.*

De tota l'anàlisi feta en aquest apartat es pot dir que els dos marcadors estudiats dins del gen FVII resulten d'utilitat per a l'anàlisi de la diversitat poblacional dins de la zona mediterrània. Cal matitzar però, que l'ús del marcador **-323 10 pb INS/DEL** és més eficaç per detectar diversitat gènica entre poblacions en àrees geogràfiques més petites (dins dels grups de l'agrupació I de la taula IV.4) mentre que **HVR4** no seria prou sensible a un nivell geogràfic tan restringit però sí en regions geogràfiques més grans com queda demostrat en la detecció de diversitat gènica dins dels grups a l'agrupació II (taula IV.4). Per altra banda aquests 2 marcadors han mostrat distribucions de les seves freqüències al·lèliques especialment diferenciades en les mostres de Bascos (per **-323 10 pb INS/DEL**) i de Nuoro (per **HVR4**).



## B. VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

Les estimacions de màxima versemblança per a les freqüències de cada combinació haplotípica entre al·lels del marcador **-323 10 pb INS/DEL** i al·lels del marcador **HVR4** es mostren en la taula IV.7. A la figura IV.2, es mostra una representació gràfica d'aquestes freqüències haplotípiques.

A totes les mostres poblacionals analitzades l'haplotip més abundant va ser el D·H6, que es va presentar en un rang de freqüències entre 0.500 (Ahizi) i 0.703 (Berbers). El fet de que es trobi representat a totes les mostres i, a més, sigui el més freqüent podria indicar que es tracta de l'haplotip més antic de tots (Crandall i Templeton, 1993). Aquesta hipòtesi vindria a ser reforçada pels resultats obtinguts per Humphries et al. (1996) en estudis realitzats en primats no humans (grans simis) que suggereixen que l'al·lel D és la forma ancestral del marcador **-323 10 pb INS/DEL**.

D'altra banda, es va observar una variabilitat considerable en el nombre d'haplotips estimats entre les mostres. La mostra menys diversa en aquest aspecte va ser la dels Bascos amb només 3 haplotips, li va seguir la mostra de Berbers amb 4 haplotips i les mostres d'Alpujarras, Nuoro i Ahizi amb 5 haplotips cadascuna. La mostra més diversa va ser la dels Àrabs amb 6 haplotips.

Pel que respecta a la diversitat intrapoblacional estimada en base a aquestes freqüències haplotípiques (taula IV.7), les mostres de Berbers, Bascos i Nuoro van presentar els valors d'heterozigositat més baixos (0.463, 0.472 i 0.494, respectivament). Això es deu a que en aquestes mostres només un (Berbers) o dos haplotips (Bascos i Nuoro) concentren la major part del total de la freqüència i en el cas de la mostra de Bascos aquest efecte es veu incrementat per presentar només 3 haplotips diferents. Les altres tres mostres (Alpujarras, Àrabs i Ahizi) van presentar heterozigositats més elevades (0.556, 0.582, 0.664, respectivament). Això es deu a una major distribució de les freqüències entre els haplotips; en el cas dels Àrabs, també hi va contribuir el fet de presentar 6 haplotips diferents (major número estimat entre les mostres).

L'aplicació del test exacte de diferenciació entre poblacions en base a les freqüències haplotípiques estimades a les mostres estudiades (taula IV.8) va posar de manifest que Ahízi, Nuoro i Bascos presentaven una diferenciació significativa en totes les comparacions amb qualsevol altra població. Per a les mostres d'Ahízi i Nuoro la significació d'aquesta diferenciació va ser inferior a 0.0001 en tots els casos excepte per a la comparació entre elles ( $p = 0.00330$ ). En el cas dels Bascos, les úniques comparacions amb significació per sobre de 0.0001 van ser aquelles en les que eren enfrontats a Alpujarra ( $p = 0.00298$ ) i a Berbers ( $p = 0.00115$ ).

L'anàlisi de la diversitat gènica (taula IV.9) mostra, d'una forma molt similar al marcador **-323 10 pb INS/DEL**, que la major part de la diversitat gènica total és atribuïble a la diversitat intragrupal, tant en l'agrupació I com en la II. Malgrat tot, la manca de diversitat gènica entre grups de mostres ( $F_{CT}$ ) posa de manifest la no existència d'una estructuració geogràfica clara de la variabilitat haplotípica.

HAPLOTIP	BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	NUOR.	AHÍZ.
<b>I · H7</b>	0.027 ± 0.012	0.117 ± 0.021	0.187 ± 0.036	0.091 ± 0.024	-	0.148 ± 0.025
<b>I · H6</b>	-	0.050 ± 0.017	0.060 ± 0.022	0.053 ± 0.022	0.217 ± 0.039	0.270 ± 0.032
<b>I · H5</b>	-	-	-	-	0.008 ± 0.011	-
<b>I · H8</b>	-	-	0.006 ± 0.007	-	-	-
<b>D · H7</b>	0.317 ± 0.040	0.189 ± 0.028	0.142 ± 0.026	0.153 ± 0.032	0.092 ± 0.026	0.068 ± 0.020
<b>D · H6</b>	0.656 ± 0.042	0.623 ± 0.034	0.599 ± 0.038	0.703 ± 0.043	0.658 ± 0.045	0.500 ± 0.041
<b>D · H5</b>	-	0.021 ± 0.012	0.006 ± 0.007	-	0.025 ± 0.016	0.014 ± 0.009
<b>Heterozigositat</b>	0.472 ± 0.029	0.556 ± 0.035	0.582 ± 0.036	0.463 ± 0.043	0.494 ± 0.047	0.644 ± 0.023

*Taula IV.7. Distribució de les freqüències haplotípiques estimades per al gen FVII en les mostres analitzades.*

**FREQÜÈNCIES HAPLOTÍPIQUES AL GEN FVII**

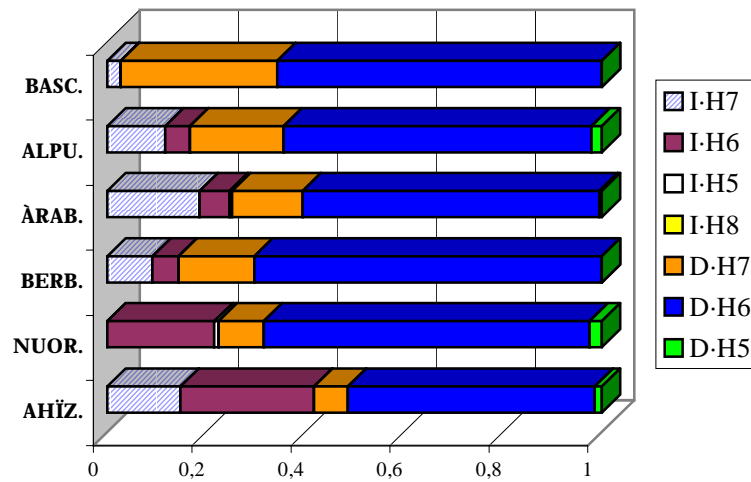


Figura IV.2. Freqüències haplotípiques estimades al gen FVII en les mostres analitzades.

Haplotips -323 10 bp INS/DEL · HVR4						
	BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	NUOR.	AHÏZ.
BASC.		0.00298 ★	0.00000 ★	0.00115 ★	0.00000 ★	0.00000 ★
ALPU.			0.22646	0.63766	0.00000 ★	0.00000 ★
ÀRAB.				0.15729	0.00000 ★	0.00000 ★
BERB.					0.00004 ★	0.00000 ★
NUOR.						0.00330 ★
AHÏZ.						

Taula IV.8. Diferenciació entre parells de poblacions basada en haplotips del gen FVII. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de significació (p) del test exacte de diferenciació entre poblacions. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.

<b>Haplotips -323 10 bp INS/DEL · HVR4</b>				
	<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>	<b>F<sub>ST</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>SC</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>CT</sub></b> <b>p</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)</b>	0.023 ★ 0.00031	0.023 ★ 0.00219	0.000
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.033 ★ p<0.0001	0.050 ★ p<0.0001	-0.018

Taula IV.9. Diversitat gènica en base a haplotips del gen FVII entre les mostres agrupades en funció del seu origen geogràfic.  $F_{ST}$ : diversitat gènica total.  $F_{SC}$ : diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup.  $F_{CT}$ : diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb  $p < 0.05$ .

### C. RELACIONS INTERPOBLACIONALS

La informació sobre les relacions interpoblacionals proporcionada conjuntament pels dos marcadors estudiats dins del gen FVII és mostrada en forma de distància de Reynolds a la taula IV.10.

En el total de les mostres analitzades, la màxima distància es va donar entre les poblacions d'Ahizi i Bascos (0.20781), mentre que la mínima es va donar entre Berbers i Alpujarras (0.00338). Dins del conjunt de les mostres mediterrànies, la màxima distància es va donar entre les mostres de Bascos i Nuoro (0.15714), i va destacar la gran proximitat que va mostrar Alpujarras amb Àrabs (0.00430) i Berbers (0.00338).

Una representació gràfica d'aquestes relacions de distància es mostra en forma d'arbre *neighbor-joining* a la figura IV.3. Les poblacions de Bascos, Ahizi i Nuoro es mostren com les més distants de la resta ja que ocupen els extrems de l'arbre. Entre mig d'aquestes tres mostres, trobem Àrabs, Berbers i Alpujarras que són relativament més properes entre elles, com ja s'ha apreciat a la matriu de distàncies de la taula IV.10.

	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHÏZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.02604	0.06660	0.03496	0.15714	0.20781
<b>ALPU.</b>			0.00430	0.00338	0.06115	0.08192
<b>ÀRAB.</b>				0.02152	0.06322	0.04059
<b>BERB.</b>					0.03494	0.09132
<b>NUOR.</b>						0.05931
<b>AHÏZ.</b>						

Taula IV.10. Matriu de distàncies de Reynolds per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII.

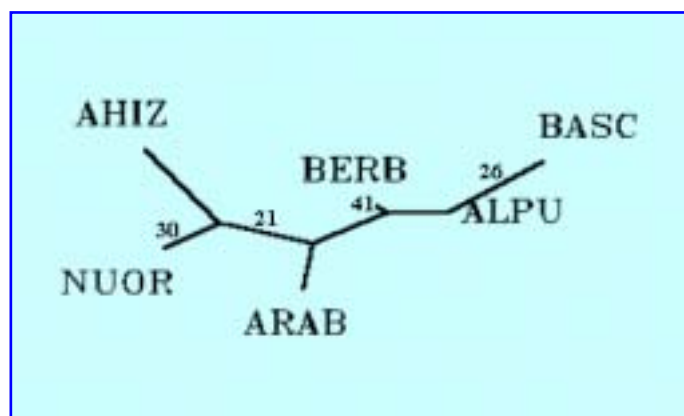


Figura IV.3. Arbre neighbor-joining per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII. Els valors de bootstrap es mostren sobre les branques corresponents.

## D. ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT

A la taula IV.11 es mostren els resultats de l'anàlisi del desequilibri de lligament entre els marcadors analitzats dins del gen FVII. No es va detectar desequilibri de lligament significatiu a les mostres de Bascos i Nuoro. La mostra amb un desequilibri de lligament de major magnitud va ser la d'Alpujarras ( $\Delta' = 0.335$ ), seguida de la mostra d'Àrabs ( $\Delta' = 0.295$ ) i la d'Ahizi ( $\Delta' = 0.240$ ). La mostra amb el menor desequilibri de lligament va ser la de Berbers ( $\Delta' = 0.224$ ).

Aquests resultats són consistents amb alguns estudis, centrats en altres marcadors, que han mostrat un menor grau de desequilibri de lligament a les poblacions d'origen africà respecte a les no africanes (Tishkoff et al. 1996b i 2000), aquest fet queda manifest en les mostres de Berbers i Ahizi.

		HVR4				
		$\Delta'$	$\chi^2$	g.ll.	(p)	$D'$
<b>BASC.</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	-	-	-	-	-
<b>ALPU.</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	0.355	19.39	2	0.0001	0.560
<b>ÀRAB.</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	0.295	18.19	3	0.0004	0.579
<b>BERB.</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	0.224	8.57	1	0.0034	0.489
<b>NUOR.</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	-	-	-	-	-
<b>AHÌZ.</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	0.240	15.83	2	0.0004	0.451

*Taula IV.11. Desequilibri de lligament dins del gen FVII a les mostres estudiades. Es mostren els parametres  $\Delta'$  i  $D'$  només en cas de desequilibri de lligament significatiu. Conjuntament a aquests parametres es mostra el valor de  $\chi^2$ , graus de llibertat i significació del test per a la desviació de la situació d'equilibri.*

L'anàlisi dels components de la varianza del desequilibri de lligament es mostra a la taula IV.12. Els resultats suggereixen que tant en el total de les mostres analitzades com en el conjunt de les mostres mediterrànies el desequilibri de lligament observat es deu a deriva genètica i no pas a un fenomen de selecció epistàtica, ja que en ambdós casos el valor de  $D^2_{ST}$  és més gran que  $D^2_{IS}$  i el valor  $D'^2_{IS}$  és superior a  $D'^2_{ST}$ .

En resum, l'anàlisi dels 2 marcadors del gen FVII indica un considerable grau de variació genètica tant entre les poblacions de la Mediterrània Occidental com entre aquestes i la sèrie Sud-sahariana. La distribució de la varianza poblacional del desequilibri de lligament entre els dos marcadors no revela un paper important de processos selectius en la variació genètica observada.

COMPONENTS DE LA VARIANÇA DEL DESEQUILIBRI DE LIGAMENT					
	COMPONENT INTRAPOBLACIONAL		COMPONENT INTERPOBLACIONAL		TOTAL
	$D^2_{IS}$	$D'^2_{IS}$	$D^2_{ST}$	$D'^2_{ST}$	
<b>POBLACIONS MEDITERRÀNIES</b>	0.01203	0.09979	0.02709	0.00355	0.10335
<b>TOTAL POBLACIONS ANLITZADES</b>	0.01279	0.12512	0.03325	0.00509	0.13022

Taula IV.12. Anàlisi dels components de la varianza del desequilibri de lligament en les poblacions analitzades en base al gen FVII.  $D^2_{IS}$ : varianza en les subpoblacions;  $D'^2_{IS}$ : varianza de la freqüència d'haplotips determinats en individus en subpoblacions;  $D^2_{ST}$ : varianza entre subpoblacions;  $D'^2_{ST}$ : varianza en la població total;  $D^2_{IT}$ : varianza total ( $D^2_{IS} + D^2_{ST}$ ).

## 1.2. FIBRINOGEN

### A. VARIACIÓ AL·LÈLICA

En la taula IV.13 es mostra la distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels tres marcadors analitzats dins dels gens FGB i FGA. A la figura IV.4 es mostra una representació gràfica de les esmentades freqüències al·lèliques.

En el polimorfisme **FGB Hind III**, l'al·lel Hd1 (digestió positiva) és el més freqüent entre totes les poblacions analitzades amb valors que a les mostres mediterrànies oscil·len entre 0.689 (Àrabs) i 0.822 (Nuoro). La mostra Sud-Sahariana presenta una freqüència d'aquest al·lel lleugerament per sobre d'aquest rang (0.880). La mostra d'Àrabs no es va ajustar a l'equilibri Hardy-Weinberg (taula IV.13), mostrant un excés d'heterozigots respecte al que s'esperaria en condicions d'equilibri ( $F_{is} = -0.309$ ).

En el marcador **FGB Bcl I**, l'al·lel més freqüent entre totes les mostres analitzades és el B2 (absència de digestió) amb valors que oscil·len, dins de les mostres mediterrànies, entre 0.748 (Berbers) i 0.908 (Nuoro). En la mostra d'Ahizi aquest al·lel mostra un valor per sobre d'aquest rang (0.983). Totes les poblacions analitzades es van ajustar a l'equilibri Hardy-Weinberg.

Al polimorfisme **FGA Taq I**, les poblacions mediterrànies mostren com a al·lel més freqüent el T2 (absència de digestió), assolint valors compresos entre 0.773 (Berbers) i 0.849 (Bascos). En la mostra d'Ahizi, els dos al·lells possibles per a aquest *locus* són gairebé equifreqüents presentant-se T2 amb un valor molt per sota del rang abans esmentat (0.508). De la mateixa manera que a **FGB Hind III**, en aquest cas la mostra d'Àrabs tampoc es va ajustar a l'equilibri Hardy-Weinberg (taula IV.13), amb defecte d'heterozigots respecte del que s'esperaria en condicions d'equilibri ( $F_{is} = 0.299$ ).



MARCADOR		BASC.	ALPU.	ARAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHIZ.
<b>FGB</b> <i>Hind III</i>	<b>GENOTIPS:</b>							
	Hd1Hd1	0.644	0.600	0.408	0.492	0.598	0.678	0.785
	Hd1Hd2	0.323	0.360	0.561	0.410	0.359	0.289	0.190
	Hd2Hd2	0.033	0.040	0.031	0.098	0.043	0.033	0.025
	N	90	100	98	122	92	90	121
	Het. (unb.)	0.315	0.345	0.431	0.424	0.348	0.294	0.212
	HW (p exacta)	1	0.775	0.002★	0.830	1	1	0.373
	<b>AL-LELS:</b>							
Hd1	0.806	0.780	0.689	0.697	0.777	0.822	0.880	
Hd2	0.194	0.220	0.311	0.303	0.223	0.178	0.120	
<b>FGB</b> <i>Bcl I</i>	<b>GENOTIPS:</b>							
	B1B1	0.012	-	0.037	0.091	-	-	-
	B1B2	0.294	0.327	0.300	0.322	0.244	0.185	0.033
	B2B2	0.694	0.673	0.663	0.587	0.756	0.815	0.967
	N	85	98	80	121	41	65	121
	Het. (unb.)	0.269	0.270	0.307	0.379	0.217	0.169	0.033
	HW (p exacta)	0.682	0.065	1	0.144	1	1	1
	<b>AL-LELS:</b>							
B1	0.159	0.163	0.188	0.252	0.122	0.092	0.017	
B2	0.841	0.837	0.813	0.748	0.878	0.908	0.983	
<b>FGA</b> <i>Taq I</i>	<b>GENOTIPS:</b>							
	T1T1	0.012	0.06	0.097	0.074	0.053	-	0.262
	T1T2	0.279	0.30	0.237	0.306	0.305	0.307	0.459
	T2T2	0.709	0.64	0.666	0.620	0.642	0.693	0.279
	N	86	100	93	121	95	88	122
	Het. (unb.)	0.258	0.333	0.339	0.353	0.328	0.261	0.500
	HW (p exacta)	0.681	0.364	0.021★	0.192	0.531	0.205	0.369
	<b>AL-LELS:</b>							
T1	0.151	0.210	0.215	0.227	0.205	0.153	0.492	
T2	0.849	0.790	0.785	0.773	0.795	0.847	0.508	

Taula IV.13. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes analitzats en els gens FGB i FGA a les mostres estudiades. Het. (unb.): heterozigositat "unbiased estimate". HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. ★  $p < 0.05$ .

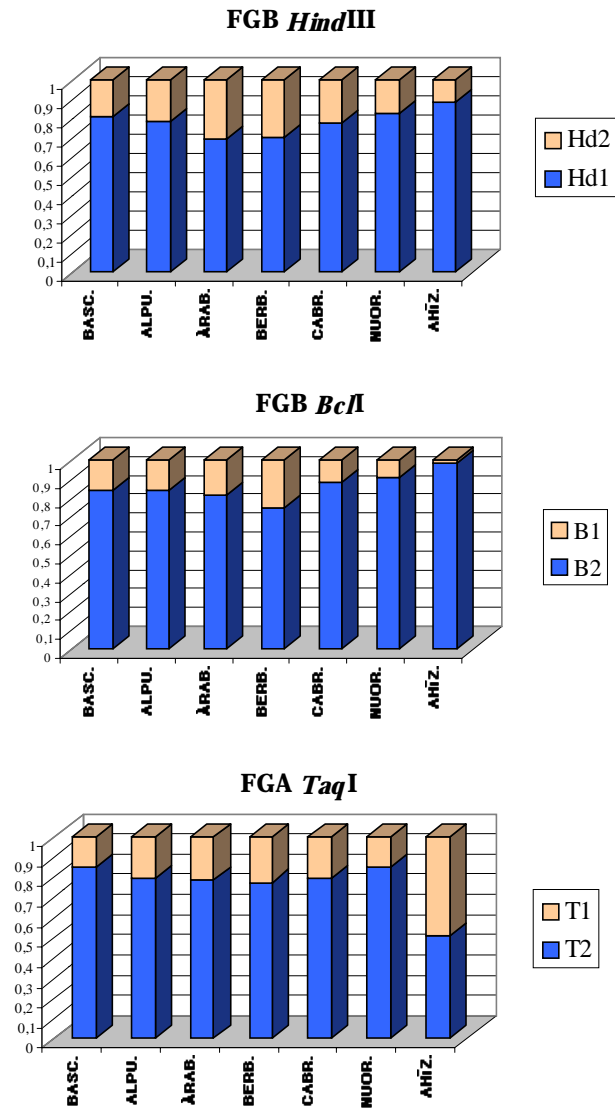


Figura IV.4. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors FGB *Hind*III, FGB *Bcl*II i FGA *Taq*I a les mostres estudiades.

**Diversitat intrapoblacional.** Els valors d'heterozigositat per a cada polimorfisme en cadascuna de les poblacions analitzades són mostrats a la taula IV.13.

En el marcador **FGB Hind III**, els valors d'heterozigocitat dins de les poblacions de l'àmbit mediterrani van oscil·lar entre 0.294 (Nuoro) i 0.431 (Àrabs). La mostra d'Ahizi va mostrar una diversitat inferior a aquest rang (0.212).

El polimorfisme **FGB Bcl I** va presentar, en general, una diversitat inferior als altres dos marcadors analitzats en el cluster del fibrinogen, mostrant valors d'heterozigositat compresos entre 0.169 (Nuoro) i 0.379 (Berbers) en les poblacions mediterrànies. La mostra Sud-Sahariana va presentar una diversitat molt per sota d'aquests valors (0.033).

El marcador **FGA Taq I** va presentar, en les mostres mediterrànies, una diversitat amb valors que van oscil·lar entre 0.258 (Bascos) i 0.353 (Berbers). La població d'Ahizi va mostrar la màxima diversitat possible per a un marcador bial·lèlic (0.500), desmarcant-se de l'esmentat rang.

**Diversitat interpoblacional.** En les taules IV.14, IV.15 i IV.16 es mostren els resultats de les comparacions entre les poblacions analitzades en base a les freqüències al·lèliques dels tres marcadors estudiats utilitzant el test de  $\chi^2$  i el test exacte de diferenciació.

En el marcador **FGB Hind III**, les comparacions efectuades (taula IV.14) assenyalen a la població d'Ahizi com la més diferenciada, ja que presenta diferències significatives amb la resta de mostres excepte amb Nuoro. També s'observa certa homogeneïtat entre les dues mostres marroquines, amb freqüències de l'al·lel Hd1 relativament baixes, que les diferencien conjuntament de la resta de poblacions a excepció de Cabras.

En el polimorfisme **FGB Bcl I**, els dos tests coincideixen plenament en mostrar a Ahizi com la població més diferenciada (taula IV.15), amb diferències significatives amb totes les altres poblacions. Els tests assenyalen també com a significativament diferenciada la mostra de Berbers, que presenta una freqüència de l'al·lel B1 relativament alta, encara que no mostra diferenciació respecte a la mostra d'Àrabs.

En el marcador **FGA Taq I**, d'acord amb els resultats obtinguts en els dos tests, Ahizi es mostra clarament com la població més diferenciada de la resta (taula IV.16), amb nivells de significació sempre inferiors a 0.0001 en totes les comparacions.

<b>FGB Hind III</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHİZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.376 0.53991	6.730 0.00948 ★	6.424 0.01126 ★	0.444 0.50535	0.165 0.68455	4.466 0.03457 ★
<b>ALPU.</b>	0.82060		4.228 0.03977 ★	3.906 0.04810 ★	0.004 0.94683	1.056 0.30423	7.968 0.00476 ★
<b>ÀRAB.</b>	0.04132 ★	0.06564		0.032 0.85744	3.777 0.05197	8.976 0.00274 ★	24.297 0.00000 ★
<b>BERB.</b>	0.02900 ★	0.09947	0.02973 ★		3.455 0.06305	8.701 0.00318 ★	24.480 0.00000 ★
<b>CABR.</b>	0.60010	0.65499	0.55411	0.35699		1.152 0.28319	8.074 0.00449 ★
<b>NUOR.</b>	0.81335	0.85117	0.03176 ★	0.14915	0.50608		2.803 0.09411
<b>AHİZ.</b>	0.04499 ★	0.01204 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00665 ★	0.07522	

*Taula IV.14. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador HindIII del gen FGB. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1 g,li}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.*

<b>FGB Bcl I</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHİZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.013 0.90825	0.474 0.49100	5.168 0.02300 ★	0.600 0.43844	2.882 0.08959	29.057 0.00000 ★
<b>ALPU.</b>	0.67867		0.360 0.54866	5.106 0.02384 ★	0.769 0.38040	3.371 0.06637	30.910 0.00000 ★
<b>ÀRAB.</b>	0.59672	0.18878		2.293 0.12998	1.688 0.19382	5.248 0.02198 ★	36.365 0.00000 ★
<b>BERB.</b>	0.04383 ★	0.00221 ★	0.38628		6.060 0.01383 ★	13.685 0.00022 ★	57.739 0.00000 ★
<b>CABR.</b>	0.69146	0.41778	0.34383	0.04341 ★		0.475 0.49065	16.465 0.00005 ★
<b>NUOR.</b>	0.19773	0.10290	0.07329	0.00275 ★	0.63019		11.799 0.00059 ★
<b>AHİZ.</b>	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00049 ★	0.00031 ★	

Taula IV.15. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador Bcl I del gen FGB. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1, g, ii}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.

<b>FGA Taq I</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHİZ.</b>
<b>BASC.</b>		2.143 0.14322	2.426 0.11934	3.701 0.05439	1.794 0.18049	0.003 0.95348	51.391 0.00000 ★
<b>ALPU.</b>	0.23034		0.015 0.90341	0.191 0.66231	0.013 0.90822	2.001 0.15720	37.664 0.00000 ★
<b>ÀRAB.</b>	0.04375 ★	0.61765		0.091 0.76301	0.054 0.81574	2.278 0.13119	34.599 0.00000 ★
<b>BERB.</b>	0.10185	0.89739	0.69008		0.303 0.58211	3.525 0.06043	36.897 0.00000 ★
<b>CABR.</b>	0.07495	0.47344	0.75782	0.42740		1.662 0.19732	37.781 0.00000 ★
<b>NUOR.</b>	0.83172	0.16537	0.02173 ★	0.08526	0.02459 ★		51.466 0.00000 ★
<b>AHİZ.</b>	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	

Una anàlisi de la varianza de les freqüències al·lèliques indica un grau de variació significatiu per als tres marcadors només quan es considera el total de les mostres analitzades ( $F_{ST}= 0.022$ ,  $p < 0.0001$  per a **FGB Hind III**;  $F_{ST}= 0.054$ ,  $p < 0.0001$  per a **FGB Bcl I**; i  $F_{ST}= 0.086$ ,  $p < 0.0001$  per a **FGA Taq I**), aquest resultat està essencialment condicionat per l'elevada diferenciació mostrada per la mostra Sud-sahariana respecte a la relativa homogeneïtat de les mostres mediterrànies. Quan es repeteix aquesta anàlisi a nivell de les 6 mostres mediterrànies, només s'observa una variació significativa en el polimorfisme **FGB Bcl I** ( $F_{ST}= 0.015$ ,  $p = 0.0047$ ), aquest fet està condicionat per la diferenciació significativa de la mostra de Berbers en aquest marcador.

A la taula IV.17 es mostren els resultats de l'anàlisi de la diversitat gènica entre les 6 mostres mediterrànies agrupades en funció del seu origen geogràfic (AMOVA). Només en cas del marcador **FGB Bcl I**, d'acord a l'exposat a l'anterior paràgraf, es mostra un valor significatiu de  $F_{ST}$ , tant en l'agrupació I com en la II, no estant condicionat aquest paràmetre per un valor significatiu de diversitat gènica entre mostres del mateix grup ( $F_{SC}$ ) ni entre grups de mostres ( $F_{CT}$ ). Malgrat tot, la variació intergrup al és sempre més alta que la intragrupal indicant una certa estructuració de la variació freqüencial a les poblacions mediterrànies. La variació entre la Península Ibèrica, Sardenya i el Nord d'Àfrica és sempre més gran que la que existeix entre les poblacions de cada subdivisió.

*Taula IV.16 (pàgina anterior). Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador TaqI del gen FGA. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1, g, li}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.*

<b>FGB <i>Hind</i> III</b>				
AGRUPACIONS POBLACIONALS		$F_{ST}$ P	$F_{SC}$ p	$F_{CT}$ p
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.008 0.06299	-0.004	0.0122 0.07105
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.013 0.06349	-0.004	0.017 0.56812
<b>FGB <i>Bcl</i> I</b>				
AGRUPACIONS POBLACIONALS		$F_{ST}$ P	$F_{SC}$ P	$F_{CT}$ p
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.020 ★ 0.00431	-0.001	0.021 0.06387
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.024 ★ 0.00450	0.002 0.22458	0.023 0.06812
<b>FGA <i>Taq</i> I</b>				
AGRUPACIONS POBLACIONALS		$F_{ST}$ P	$F_{SC}$ P	$F_{CT}$ p
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.002 0.38939	-0.002	0.004 0.19366
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.004 0.39176	-0.003	0.007 0.26454

Taula IV.17. Diversitat gènica en base als marcadors FGB *Hind* III, FGB *Bcl* I, i FGA *Taq* I entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.  $F_{ST}$ : diversitat gènica total.  $F_{SC}$ : diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup.  $F_{CT}$ : diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb  $p < 0.05$ .

**Comparació amb altres poblacions.** Per tal de contrastar els resultats obtinguts en la present tesi, les freqüències al·lèliques dels marcadors del clúster gènic del fibrinogen presentades per les mostres analitzades, es mostren a les taules IV.18, IV.19 i IV.20 juntament amb les que s'han pogut recopilar d'altres poblacions en la bibliografia. En el polimorfisme **FGB *Hind* III** (taula IV.18), l'al·lel més freqüent en totes les mostres és el Hd1, encara que existeix una gran diferència entre la freqüència més alta del mencionat al·lel (0.980) als Quechua i les més baixes que es concentren al Nord d'Àfrica (0.689 per a Àrabs i 0.697 per a Berbers). Les mostres de Japó, Ahizi, Na-dene, Nuoro, Regne Unit i Bascos presenten freqüències de l'al·lel Hd1 que oscil·len entre 0.883 i 0.806. Finalment amb freqüències de Hd1 de 0.780 i 0.777 trobem les mostres d'Alpujarras i Cabras, respectivament. En el cas del polimorfisme **FGB *Bcl* I**, l'al·lel B2 és el més freqüent en totes les poblacions mostrades a la taula IV.19. Aquest es presenta en un rang entre 0.983 (Ahizi) i 0.720 (Itàlia). En la part alta d'aquest rang de freqüències trobem les mostres de

Nuoro, Inuits, Cabras, Japó, Regne Unit, Bascos, Alpujarras, França, Noruega i Àrabs, amb valors de B2 compresos entre 0.908 i 0.813. Amb una freqüència més baixa del mencionat al·lel (0.748) trobem la mostra de Berbers. El marcador **FGA Taq I** (taula IV.20) va mostrar com a al·lel més freqüent T2. Cal destacar però, que les mostres d'Inuits i d'Ahízi presenten la particularitat de que els dos al·lells possibles per a aquest *locus* són gairabé equifreqüents, presentant T2 valors de 0.530 i 0.508, respectivament. La resta de mostres presenten freqüències de l'esmentat al·lel que fluctuen entre 0.849 (Bascos) i 0.730 (Regne Unit).

Totes les anàlisis dutes a terme en aquest apartat permeten dir que encara que els tres *loci* estudiats dins el cluster del fibrinogen distingeixen clarament la mostra Sud-Sahariana del conjunt de mostres mediterrànies, tenen una utilitat limitada a l'hora d'analitzar la diversitat poblacional entre aquestes últimes. Malgrat tot, en el marcador **FGB Bcl I** es mostra un valor  $F_{ST}$  significatiu dins del grup de poblacions mediterrànies (taula IV.17) determinat per la diferenciació de la mostra Berber que queda palesa en el test de  $\chi^2$  i el test exacte de diferenciació (taula IV.15). Per altra banda, el polimorfisme **FGB Hind III** permet detectar certa diferenciació de les dues mostres marroquines (taula IV.14), encara que no tan intensa com la detectada per als Berbers a **FGB Bcl I**.

<b>FGB Hind III</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>Hd1</b>	<b>Hd2</b>	
<b>Quechua (Perú)</b>	60	0.980	0.020	Rupert et al. 1999
<b>Na-dene (U.S.A. i Canadà).</b>	50	0.840	0.160	Rupert et al. 1999
<b>Mongoloïdes (Japó)</b>	147	0.883	0.117	Iso et al. 1995
<b>Caucasoides (U.K.)</b>	298	0.810	0.190	Thomas et al. 1994
<b>BASC.</b>	90	0.806	0.194	-
<b>ALPU.</b>	100	0.780	0.220	-
<b>ÀRAB.</b>	98	0.689	0.311	-
<b>BERB.</b>	122	0.697	0.303	-
<b>CABR.</b>	92	0.777	0.223	-
<b>NUOR.</b>	90	0.822	0.178	-
<b>AHÍZ.</b>	121	0.880	0.120	-

Taula IV.18. Freqüències al·lèliques del polimorfisme FGB HindIII.



<b>FGB Bcl I</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>B1</b>	<b>B2</b>	
<b>Caucasoides (Italia)</b>	173	0.280	0.720	Zito et al. 1997
<b>Caucasoides (França)</b>	500	0.171	0.829	Behague et al. 1996
<b>Mongoloïdes (Japó)</b>	147	0.133	0.867	Iso et al. 1995
<b>Inuits. (Groenlàndia)</b>	126	0.120	0.880	de Maat et al. 1995
<b>Caucasoides (U.K.)</b>	298	0.150	0.850	Thomas et al. 1994
<b>Caucasoides (Noruega)</b>	118	0.174	0.826	Berg i Kierulf 1989
<b>BASC.</b>	85	0.159	0.841	-
<b>ALPU.</b>	98	0.163	0.837	-
<b>ÀRAB.</b>	80	0.188	0.813	-
<b>BERB.</b>	121	0.252	0.748	-
<b>CABR.</b>	41	0.122	0.878	-
<b>NUOR.</b>	65	0.092	0.908	-
<b>AHÏZ.</b>	121	0.017	0.983	-

Taula IV.19. Freqüències al·lèliques del polimorfisme FGB BclI.

<b>FGA Taq I</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>T1</b>	<b>T2</b>	
<b>Cucasoides (França)</b>	500	0.236	0.764	Behague et al. 1996
<b>Inuits. (Groenlàndia)</b>	121	0.470	0.530	de Maat et al. 1995
<b>Caucasoides (U.K.)</b>	298	0.270	0.730	Thomas et al. 1994
<b>Caucasoides (Noruega)</b>	118	0.266	0.734	Berg i Kierulf 1989
<b>BASC.</b>	86	0.151	0.849	-
<b>ALPU.</b>	100	0.210	0.790	-
<b>ÀRAB.</b>	93	0.215	0.785	-
<b>BERB.</b>	121	0.227	0.773	-
<b>CABR.</b>	95	0.205	0.795	-
<b>NUOR.</b>	88	0.153	0.847	-
<b>AHÏZ.</b>	122	0.492	0.508	-

Taula IV.20. Freqüències al·lèliques del polimorfisme FGA TaqI.

## B. VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

A la taula IV.21 es mostren les freqüències de les combinacions haplotípiques, formades en base als al·lels dels tres *loci* analitzats en el cluster gènic del fibrinogen, estimades per màxima versemblança en les poblacions estudiades. En la figura IV.5 es mostra una representació gràfica de la distribució d'aquestes freqüències.

L'haplotip més freqüent en totes les mostres va ser el Hd1·B2·T2, amb valors que van oscil·lar entre 0.657 (Bascos) i 0.478 (Berbers) dins de les 6 poblacions mediterrànies. La mostra d'Ahizi va mostrar una freqüència d'aquest haplotip per sota d'aquest rang (0.455), encara que molt propera a la mostrada pels Berbers. El fet de que aquest haplotip centri al voltant d'un 50% de la freqüència haplotípica total a totes les mostres analitzades podria indicar que es tracta del de més gran antiguitat entre les poblacions estudiades dins del *cluster* gènic del fibrinogen (Crandall i Templeton, 1993).

Es va observar variabilitat entre les mostres en el número d'haplotips estimats. En aquest sentit, les mostres més diverses van ser Berbers, Cabras i Nuoro amb 7 haplotips cadascuna. A continuació, les mostres d'Alpujarras, Àrabs i Ahizi van mostrar un total de 6 haplotips. Finalment, la mostra menys diversa va ser la de Bascos que només va presentar 4 haplotips.

Pel que fa a la diversitat intrapoblacional en base a les freqüències haplotípiques (taula IV.21), la mostra de Berbers va presentar la major heterozigositat (0.780). A continuació, les mostres d'Àrabs i Alpujarras, donat que presenten un haplotip menys que els Berbers, van mostrar un menor grau de diversitat (0.753 i 0.701, respectivament). Finalment, les mostres de Cabras, Bascos, Ahizi i Nuoro van presentar heterozigositats compreses entre 0.683 i 0.617. Aquest rang de valors resulta baix per a les mostres sardes, ja que posseeixen juntament amb als Berbers el màxim nombre d'haplotips, però presenten una major freqüència de Hd1·B2·T2, fet que els resta diversitat. Una situació similar es dona a la mostra d'Ahizi que, tot i presentar un haplotip més que els Bascos, té una heterozigositat més petita donat que els haplotips Hd1·B2·T1 i Hd1·B2·T2 concentren quasi el 90% de la freqüència.

HAPLOTIP	BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHÍZ.
Hd1 · B1 · T1	-	-	-	0.004 ± 0.005	0.024 ± 0.024	0.019 ± 0.013	-
Hd1 · B1 · T2	-	0.005 ± 0.005	0.022 ± 0.015	0.018 ± 0.010	0.059 ± 0.035	0.038 ± 0.020	0.005 ± 0.005
Hd1 · B2 · T1	0.150 ± 0.032	0.197 ± 0.030	0.195 ± 0.032	0.192 ± 0.028	0.132 ± 0.048	0.106 ± 0.034	0.419 ± 0.034
Hd1 · B2 · T2	0.657 ± 0.041	0.579 ± 0.037	0.511 ± 0.044	0.478 ± 0.035	0.541 ± 0.068	0.629 ± 0.047	0.455 ± 0.032
Hd2 · B1 · T2	0.162 ± 0.032	0.158 ± 0.024	0.172 ± 0.032	0.232 ± 0.028	0.038 ± 0.025	0.044 ± 0.021	0.012 ± 0.008
Hd2 · B2 · T1	-	0.007 ± 0.009	0.038 ± 0.019	0.028 ± 0.012	0.039 ± 0.027	0.033 ± 0.023	0.076 ± 0.019
Hd2 · B2 · T2	0.031 ± 0.014	0.054 ± 0.029	0.062 ± 0.021	0.048 ± 0.015	0.167 ± 0.046	0.131 ± 0.032	0.033 ± 0.015
Heterozigositat	0.660 ± 0.030	0.701 ± 0.023	0.753 ± 0.020	0.780 ± 0.013	0.683 ± 0.040	0.617 ± 0.040	0.623 ± 0.017

Taula IV.21. Distribució de les freqüències haplotípiques estimades per al cluster gènic del fibrinogen en les mostres analitzades.

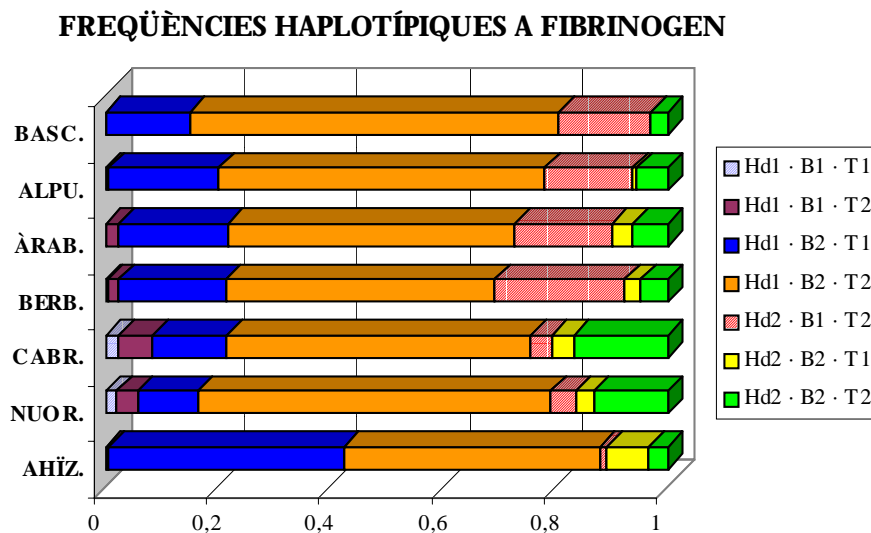


Figura IV.5. Freqüències haplotípiques al cluster gènic del fibrinogen.

A la taula IV.22 es mostren els resultats del test exacte de diferenciació entre poblacions en base a les freqüències haplotípiques estimades. De la mateixa manera que en el test exacte de diferenciació aplicat individualment per a cadascun dels tres *loci*, la mostra més diferenciada de la resta va ser la d'Ahizi, amb valors de significació inferiors a 0.0001 en totes les comparacions. També es va observar una diferenciació considerable en la mostra de Nuoro, aquesta població va mostrar diferències significatives ( $p < 0.0007$ ) en totes les comparacions excepte en la que es va enfrontar a Cabras. També van mostrar un cert grau de diferenciació les mostres de Cabras i Berbers amb 4 comparacions significatives cadascuna.

L'anàlisi de la diversitat haplotípica entre les mostres mediterrànies en funció del seu origen geogràfic (AMOVA) es mostra a la taula IV.23. Tant en l'agrupació I com en la II es va observar una diversitat gènica total ( $F_{ST}$ ) significativa. Malgrat tot, només en l'agrupació I aquest valor va ser condicionat per la diversitat gènica entre grups de mostres ( $F_{CT}$ ), evidenciant l'existència d'una estructuració geogràfica en la distribució de les freqüències haplotípiques entre la Península Ibèrica, Marroc i Sardenya. Aquesta estructuració no es va mostrar en dividir les mostres en Mediterrània Nord i Mediterrània Sud (agrupació II).

Cal destacar com a conclusió, que a nivell haplotípic es detecta un grau de diversitat interpoblacional entre les mostres mediterrànies que a nivell dels *loci* individuals només s'observa al marcador **FGB Bcl I**. A més, s'aprecia estructuració geogràfica en la distribució de les freqüències haplotípiques. Aquests resultats indiquen que, en l'anàlisi de la diversitat poblacional dins de la zona mediterrània, els tres marcadors estudiats dins del *cluster* gènic del fibrinogen resulten més informatius en forma d'haplotip que considerats individualment.

<b>Haplotips <i>Hind</i> III · <i>Bcl</i> I · <i>Taq</i> I</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHÍZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.23555	0.00127 ★	0.09361	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★
<b>ALPU.</b>			0.10912	0.00516 ★	0.00034 ★	0.00009 ★	0.00000 ★
<b>ÀRAB.</b>				0.05742	0.09408	0.00067 ★	0.00000 ★
<b>BERB.</b>					0.00132 ★	0.00000 ★	0.00000 ★
<b>CABR.</b>						0.61664	0.00000 ★
<b>NUOR.</b>							0.00000 ★
<b>AHÍZ.</b>							

Taula IV.22. Diferenciació entre parells de poblacions basada en haplotips del cluster gènic del fibrinogen. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de significació (p) del test exacte de diferenciació entre poblacions. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.

<b>Haplotips <i>Hind</i> III · <i>Bcl</i> I · <i>Taq</i> I</b>				
<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>		<b>F<sub>ST</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>SC</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>CT</sub></b> <b>p</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.010 ★ 0.01650	-0.002	0.012 ★ 0.00319
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.013 ★ 0.01687	-0.002	0.016 0.06693

Taula IV.23. Diversitat gènica en base a haplotips del cluster gènic del fibrinogen entre les mostres agrupades en funció del seu origen geogràfic. F<sub>ST</sub>: diversitat gènica total. F<sub>SC</sub>: diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup. F<sub>CT</sub>: diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb p<0.05.

### C. RELACIONS INTERPOBLACIONALS

A la taula IV.24 es mostra la informació, en forma de distàncies de Reynolds, sobre les relacions entre les poblacions estudiades proporcionada conjuntament pels tres marcadors analitzats dins del *cluster* gènic del fibrinogen.

Dins del conjunt de totes les poblacions estudiades la distància més gran es va registrar entre les poblacions de Bascos i Ahizi (0.1660) mentre que la distància més petita es va donar entre les mostres de Cabras i Alpujarras (0.0019). Dins de l'àmbit mediterrani, la distància més gran es va donar entre les poblacions de Nuoro i Berbers (0.0476).

A la figura IV.6 es mostra una representació gràfica d'aquestes relacions de distància en forma d'arbre *neighbor-joining*. Destaca la mostra Sud-Sahariana com la més distant, amb molta diferència, respecte totes les altres poblacions, la branca que la separa de la resta de l'arbre presenta una consistència considerable, amb un valor de bootstrap del 69 %. Les mostres de Bascos, Nuoro i Berbers ocupen també extrems de l'arbre, mentre que Cabras, Alpujarras i Àrabs ocupen una posició central.

	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHİZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.0047	0.0191	0.0258	0.0059	0.0061	0.1660
<b>ALPU.</b>			0.0088	0.0142	0.0019	0.0119	0.1261
<b>ÀRAB.</b>				0.0039	0.0123	0.0331	0.1272
<b>BERB.</b>					0.0228	0.0476	0.1559
<b>CABR.</b>						0.0070	0.1308
<b>NUOR.</b>							0.1509
<b>AHİZ.</b>							

Taula IV.24. Matriu de distàncies de Reynolds per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes FGB Hind III, FGB Bcl I i FGA Taq I.

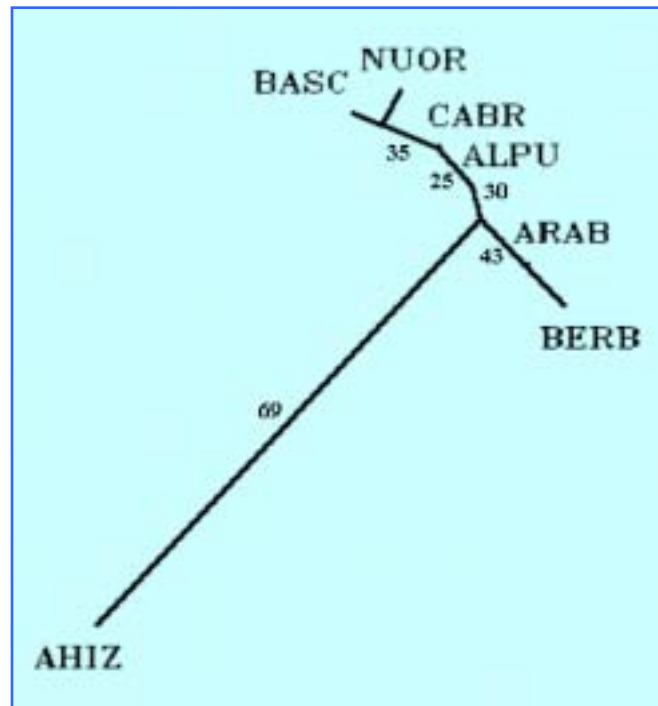


Figura IV.6. Arbre neighbor-joining per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes *FGB Hind III*, *FGB Bcl I* i *FGA Taq I*. Els valors de bootstrap es mostren sobre les branques corresponents.

#### D. ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

En la taula IV.25 s'exposen els resultats de l'anàlisi del desequilibri de lligament entre els marcadors ***FGB Hind III***, ***FGB Bcl I*** i ***FGA Taq I***.

El màxim desequilibri de lligament entre els polimorfismes ***FGB Hind III*** i ***FGB Bcl I*** va ser mostrat pels Berbers ( $\Delta' = 0.459$ ), seguits per Bascos ( $\Delta' = 0.440$ ), Alpujarras ( $\Delta' = 0.404$ ) i Àrabs ( $\Delta' = 0.365$ ). La mostra d'Ahizi va mostrar el menor desequilibri de lligament significatiu ( $\Delta' = 0.285$ ). Cap de les dues mostres sardes va presentar desequilibri de lligament significatiu entre aquests dos marcadors.

El desequilibri de lligament entre els polimorfismes **FGB Hind III** i **FGA Taq I** només va ser significatiu en Bascos ( $\Delta' = 0.630$ ) i Berbers ( $\Delta' = 0.443$ ). Aquesta manca de desequilibri de lligament, que en general s'observa, era d'esperar donat que es tracta de marcadors situats en gens diferents i a una distància de 20.5 kb. Per aquesta raó, resulta sorprenent l'elevat desequilibri de lligament mostrat per Bascos i Berbers, que en el cas dels primers representa un grau de lligament superior a l'observat en la parella de *loci* de FGB (**Hind III** i **Bcl I**), força més propers (9.5 kb).

Per a la parella de marcadors **FGB Bcl I** i **FGA Taq I** (separats per 11.5 kb), només tres poblacions van mostrar un desequilibri de lligament significatiu, aquestes van ser: Bascos ( $\Delta' = 0.633$ ), Berbers ( $\Delta' = 0.604$ ) i Àrabs ( $\Delta' = 0.490$ ).

L'elevat desequilibri de lligament entre els marcadors situats dins del gen FGB i la davallada de la magnitud del mateix entre els gens FGB i FGA ja havia estat observada per Thomas i col·laboradors (1994) en una mostra de 302 individus caucasoides procedents del Regne Unit. En la present tesi només les mostres d'Alpujarras i d'Ahizi segueixen estrictament aquest patró. En el cas de Bascos i Berbers no es detecta aquesta davallada del desequilibri de lligament entre FGB i FGA. La mostra d'Àrabs, encara que mostra pèrdua de desequilibri de lligament entre FGB i FGA quan aquest s'analitza entre els marcadors **Hind III** i **Taq I**, sorprenentment presenta elevat desequilibri de lligament entre aquests dos gens quan s'utilitza el marcador **Bcl I** de FGB. Finalment, les dues mostres sardes no van mostrar desequilibri de lligament dins de la regió cromosòmica analitzada.

En la taula IV.26 es mostren els resultats de l'anàlisi dels components de la variància poblacional del desequilibri de lligament. Dins de les mostres mediterrànies, en la parella **Hind III - Bcl I** s'observa desequilibri de lligament causat per selecció epistàtica ( $D^2_{IS} > D^2_{ST}$  i  $D'^2_{IS} < D'^2_{ST}$ ); en la parella **Hind III - Taq I** es mostra desequilibri no sistemàtic originat per deriva genètica ( $D^2_{IS} < D^2_{ST}$  i  $D'^2_{IS} > D'^2_{ST}$ ); i en el cas de la parella **Bcl I - Taq I** es dona un desequilibri sistemàtic desigual ( $D^2_{IS} > D^2_{ST}$  i  $D'^2_{IS} > D'^2_{ST}$ ), és a dir, hi ha selecció de determinats haplotips només en algunes de les mostres. La mateixa anàlisi aplicada al total de les poblacions estudiades mostra en la parella **Hind III - Bcl I** un desequilibri sistemàtic desigual ( $D^2_{IS} > D^2_{ST}$  i  $D'^2_{IS} > D'^2_{ST}$ ). L'addició de la mostra Sud-sahariana al conjunt de les mediterrànies fa que la selecció perdi pes en front a la deriva com a força condicionant de les freqüències dels haplotips formats per aquests dos



marcadors. En la parella **Hind III - Taq I** es manté el desequilibri no sistemàtic causat per deriva genètica ( $D^2_{IS} < D^2_{ST}$  i  $D'^2_{IS} > D'^2_{ST}$ ). Finalment, en la parella **Bcl I - Taq I**, l'addició de la mostra Sud-sahariana en l'anàlisi fa que s'observi desequilibri de lligament no sistemàtic causat per deriva genètica ( $D^2_{IS} < D^2_{ST}$  i  $D'^2_{IS} > D'^2_{ST}$ ).

Els tres marcadors estudiats dins del *cluster* gènic del fibrinogen mostren, en general, una baixa diversitat entre les mostres de la Mediterrània Occidental quan es consideren de forma individual. D'altra banda, s'observa una gran diferenciació de la sèrie Sud-sahariana respecte de les mostres mediterrànies per a aquests tres *loci*. L'anàlisi de les components de la variança del desequilibri de lligament dóna indicis de l'existència de processos selectius actuant sobre la distribució de freqüències dels haplotips formats pels marcadors **Hind III** i **Bcl I** del gen FGB.

		<b>Bcl I</b>					<b>Taq I</b>				
		$\Delta'$	$\chi^2$	g.ll.	(p)	D'	$\Delta'$	$\chi^2$	g.ll.	(p)	D'
<b>BASC.</b>	<b>Hind III</b>	0.440	49.44	1	0.0001	1	0.630	5.77	1	0.0163	0.966
<b>ALPU.</b>	<b>Hind III</b>	0.404	44.34	1	0.0001	0.961	-	-	-	-	-
<b>ÀRAB.</b>	<b>Hind III</b>	0.365	22.93	1	0.001	0.884	-	-	-	-	-
<b>BERB.</b>	<b>Hind III</b>	0.459	78.59	1	0.0001	0.840	0.443	12.07	1	0.0005	0.636
<b>CABR.</b>	<b>Hind III</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NUOR.</b>	<b>Hind III</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AHĪZ.</b>	<b>Hind III</b>	0.285	5.03	1	0.0249	0.599	-	-	-	-	-
		<b>Taq I</b>									
		$\Delta'$	$\chi^2$	g.ll.	(p)	D'					
<b>BASC.</b>	<b>Bcl I</b>	0.633	4.26	1	0.0391	0.958					
<b>ALPU.</b>	<b>Bcl I</b>	-	-	-	-	-					
<b>ÀRAB.</b>	<b>Bcl I</b>	0.490	4.31	1	0.0379	1					
<b>BERB.</b>	<b>Bcl I</b>	0.604	17.34	1	0.0001	0.895					
<b>CABR.</b>	<b>Bcl I</b>	-	-	-	-	-					
<b>NUOR.</b>	<b>Bcl I</b>	-	-	-	-	-					
<b>AHĪZ.</b>	<b>Bcl I</b>	-	-	-	-	-					

COMPONENTS DE LA VARIANÇA DEL DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT						
LOCI COMPARATS	COMPONENT INTRAPOBLACIONAL		COMPONENT INTERPOBLACIONAL		TOTAL	
	$D^2_{IS}$	$D'^2_{IS}$	$D^2_{ST}$	$D'^2_{ST}$	$D^2_{IT}$	
POBLACIONS MEDITERRÀNIES	<b>Hind III i Bcl I</b>	0.04826	0.02311	0.00873	0.04073	0.06384
	<b>Hind III i Taq I</b>	0.00487	0.02587	0.00564	0.00297	0.02884
	<b>Bcl I i Taq I</b>	0.00686	0.03421	0.00592	0.00414	0.03835
TOTAL POBLACIONS ANLITZADES	<b>Hind III i Bcl I</b>	0.03870	0.05245	0.01586	0.03157	0.08402
	<b>Hind III i Taq I</b>	0.00438	0.08543	0.02051	0.00338	0.08882
	<b>Bcl I i Taq I</b>	0.00553	0.11895	0.02338	0.00734	0.12629

Taula IV.26. Anàlisi dels components de la varianza del desequilibri de lligament en les poblacions analitzades en base als gens FGB i FGA.  $D^2_{IS}$ : varianza en les subpoblacions;  $D'^2_{IS}$ : varianza de la freqüència d'haplotips determinats en individus en subpoblacions;  $D^2_{ST}$ : varianza entre subpoblacions;  $D'^2_{ST}$ : varianza en la població total;  $D^2_{IT}$ : varianza total ( $D^2_{IS} + D'^2_{ST}$ ).

Taula IV.25.(pàgina anterior). Desequilibri de lligament dins del cluster gènic del fibrinogen a les mostres estudiades. Es mostren els paràmetres  $\Delta'$  i  $D'$  només en cas de desequilibri de lligament significatiu. Conjuntament a aquests paràmetres es mostra el valor de  $\chi^2$ , graus de llibertat i significació del test per a la desviació de la situació d'equilibri.

### 1.3. RECEPTOR PLAQUETARI DEL FIBRINOGEN, GLUCOPROTEÏNA IIb/IIIa

#### A. VARIACIÓ AL·LÈLICA

En la taula IV.27 s'exposen les freqüències al·lèliques i genotípiques dels dos marcadors analitzats dins dels gens GPIIIa i GPIIb en les poblacions estudiades. La distribució de les esmentades freqüències al·lèliques es representa gràficament en la figura IV.7.

En el marcador **GPIIIa Taq I**, l'al·lel més freqüent en totes les mostres estudiades va ser el T2 (absència de digestió). Aquest al·lel va mostrar freqüències que van oscil·lar entre 0.624 (Berbers) i 0.835 (Cabras) dins de les 6 poblacions mediterrànies. Els Ahizi van presentar una freqüència de T2 per sobre d'aquest rang (0.917). Les mostres de Bascos, Àrabs, Berbers i Nuoro no es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg (taula IV.27), en totes es va detectar un excés d'heterozigots amb valors de  $F_{is}$  de -0.277, -0.283, -0.391, i -0.465, respectivament.

El polimorfisme **GPIIb 9 pb INS/DEL** va mostrar l'al·lel I com el més freqüent, presentant valors que en les poblacions mediterrànies van oscil·lar entre 0.560 (Bascos) i 0.774 (Cabras). La mostra d'Ahizi va presentar una freqüència de la inserció dins de l'esmentat rang (0.713). En aquest cas, totes les mostres es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg (taula IV.27).

MARCADOR		BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHÍZ.
<b>GPIIIa TaqI</b>	<b>GENOTIPS:</b>							
	<b>T1T1</b>	0.023	0.061	0.015	0.050	0.010	-	0.008
	<b>T1T2</b>	0.518	0.398	0.500	0.652	0.309	0.63	0.150
	<b>T2T2</b>	0.459	0.541	0.485	0.298	0.681	0.37	0.842
	<b>N</b>	85	98	66	121	94	93	120
	<b>Het. (unb.)</b>	0.408	0.387	0.393	0.471	0.277	0.436	0.153
	<b>HW (p exacta)</b>	0.014★	1	0.048★	0.000★	0.452	0.000★	0.578
	<b>AL-LELS:</b>							
	<b>T1</b>	0.282	0.260	0.265	0.376	0.165	0.317	0.083
	<b>T2</b>	0.718	0.740	0.735	0.624	0.835	0.683	0.917
<b>GPIIb 9 pb INS/DEL</b>	<b>GENOTIPS:</b>							
	<b>I I</b>	0.330	0.5	0.427	0.336	0.600	0.560	0.500
	<b>I D</b>	0.461	0.4	0.490	0.529	0.347	0.396	0.426
	<b>D D</b>	0.209	0.1	0.083	0.135	0.053	0.044	0.074
	<b>N</b>	91	100	96	119	95	91	122
	<b>Het. (unb.)</b>	0.495	0.422	0.443	0.482	0.352	0.369	0.411
	<b>HW (p exacta)</b>	0.530	0.637	0.358	0.339	1	0.575	0.825
	<b>AL-LELS:</b>							
	<b>I</b>	0.560	0.700	0.672	0.601	0.774	0.758	0.713
	<b>D</b>	0.440	0.300	0.328	0.399	0.226	0.242	0.287

Taula IV.27. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes GPIIIa TaqI i GPIIb 9 pb INS/DEL a les mostres estudiades. Het. (unb.): heterozigositat “unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l’equilibri Hardy-Weinberg. ★  $p < 0.05$ .

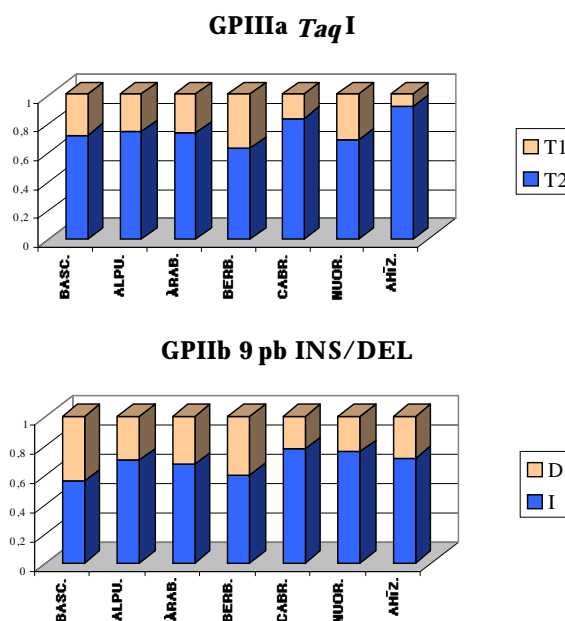


Figura IV.7. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors GPIIIa Taq I i GPIIb 9 pb INS/DEL a les mostres estudiades.

**Diversitat intrapoblacional.** En la taula IV.27 es mostren els valors d'heterozigositat dels dos *loci* estudiats per cadascuna de les poblacions analitzades.

El polimorfisme **GPIIIa Taq I** va presentar valors de diversitat que van oscil·lar entre 0.277 (Cabras) i 0.471 (Berbers) en les mostres mediterrànies. L'heterozigositat mostrada pels Ahizi es va trobar força per sota d'aquest rang (0.153) ja que és la mostra amb una major freqüència de l'al·lel T2.

El marcador **GPIIb 9 pb INS/DEL** va presentar valors d'heterozigositat entre 0.352 (Cabras) 0.495 (Bascos) dins de les 6 poblacions mediterrànies, aquest darrer valor és molt proper a la màxima diversitat possible per a un marcador bial·lelic. La mostra Sudsahariana també va mostrar una elevada heterozigositat (0.411) entrant dins de l'esmentat rang.

**Diversitat interpoblacional.** En les taules IV.28 i IV.29 s'exposen els resultats de la comparació entre les poblacions estudiades en base a les freqüències al·leliques dels dos marcadors analitzats en els gens GPIIIa i GPIIb utilitzant el test de  $\chi^2$  i el test exacte de diferenciació.

En el polimorfisme **GPIIIa Taq I** (taula IV.28), l'elevada freqüència de l'al·lel T2 a Ahizi i Cabras fa que els dos tests coincideixin en mostrar-les com les poblacions més diferenciades, ja que ambdues van mostrar diferenciació significativa amb qualsevol altre població. En el cas de la primera els valors de p dels dos tests van ser inferiors 0.0001, excepte en la comparació amb Cabras. També s'observa cert grau de diferenciació de la mostra de Berbers condicionat per posseir una freqüència de l'al·lel T1 més elevada. Cal resaltar l'elevada diferenciació entre les dues mostres sardes que es manifesta a través de valors de p molt baixos en els dos tests.

En el marcador **GPIIb 9 pb INS/DEL** (taula IV.29), els dos tests coincideixen en mostrar com a població més diferenciada els Bascos que es diferencien significativament de la resta de mostres excepte dels Berbers i, només en el cas del test  $\chi^2$ , dels Àrabs. La segona població més diferenciada van ser els Berbers que van presentar diferenciació significativa amb totes les mostres excepte amb Bascos i Àrabs en ambdós tests. La raó de la diferenciació de Bascos i Berbers es troba en la seva relativament alta freqüència de l'al·lel D.

<b>GPIIIa Taq I</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHİZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.226 0.63425	0.110 0.73977	3.920 ★ 0.04772	7.162 ★ 0.00745	0.513 0.47376	28.491 ★ 0.00000
<b>ALPU.</b>	0.17944		0.010 0.92041	6.631 ★ 0.01002	5.190 ★ 0.02271	1.512 0.21880	24.758 ★ 0.00000
<b>ÀRAB.</b>	0.88846	0.25315		4.701 ★ 0.03015	4.761 ★ 0.02910	1.005 0.31618	22.345 ★ 0.00000
<b>BERB.</b>	0.09993	0.00032 ★	0.03769 ★		23.210 ★ 0.00000	1.599 0.20606	58.240 ★ 0.00000
<b>CABR.</b>	0.00657 ★	0.04710 ★	0.02784 ★	0.00000 ★		11.870 ★ 0.00057	6.681 ★ 0.00674
<b>NUOR.</b>	0.12102	0.00033 ★	0.10004	0.10372	0.00000 ★		37.943 ★ 0.00000
<b>AHİZ.</b>	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.00000 ★	0.01146 ★	0.00000 ★	

*Taula IV.28. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador GPIIIa Taq I. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1 g,ii}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.*

GPIIb 9 pb INS/DEL							
	BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHĪZ.
BASC.		7.994 ★ 0.00469	4.913 ★ 0.02666	0.639 0.40528	19.099 ★ 0.00001	15.852 ★ 0.00007	10.651 ★ 0.00110
ALPU.	0.01114 ★		0.360 0.54858	4.673 ★ 0.03063	2.722 0.09898	1.631 0.20151	0.091 0.76256
ÀRAB.	0.15851	0.38570		2.307 0.12879	4.937 ★ 0.02629	3.512 0.06471	0.862 0.35318
BERB.	0.44193	0.03349 ★	0.56666		14.448 ★ 0.00014	11.540 ★ 0.00068	6.746 ★ 0.00940
CABR.	0.00009 ★	0.35274	0.03860 ★	0.00040 ★		0.124 0.72503	2.035 0.15372
NUOR.	0.00022 ★	0.43730	0.13473	0.00223 ★	0.72010		1.083 0.29800
AHĪZ.	0.00552 ★	0.82722	0.52852	0.03234 ★	0.26242	0.52545	

Taula IV.29. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador GPIIb 9 pb INS/DEL. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1 g,li}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.

Una anàlisi de la variança de les freqüències al·lèliques en les poblacions analitzades indica un grau significatiu de variació per als dos marcadors. El marcador **GPIIIa Taq I** va mostrar menys diversitat dins de la Mediterrània Occidental ( $F_{st} = 0.0204$ ,  $p < 0.0001$ ) que en el total de les poblacions analitzades ( $F_{st} = 0.053$ ,  $p < 0.0001$ ), aquest resultat ve condicionat per l'extrema diferenciació de la sèrie Sud-sahariana. Oposadament, el polimorfisme **GPIIb 9 pb INS/DEL** mostra un major grau de diversitat dins de les 6 mostres mediterrànies ( $F_{st} = 0.030$ ,  $p < 0.0001$ ) que en el total de les poblacions analitzades ( $F_{st} = 0.024$ ,  $p < 0.0001$ ). Això era d'esperar ja que, en aquest cas, Ahizi mostra molt poca diferenciació enfront a Bascos i Berbers.

En la taula IV.30 s'exposa una anàlisi de la diversitat gènica en les mostres mediterrànies agrupades en funció del seu origen geogràfic (AMOVA). En el cas del polimorfisme **GPIIIa Taq I** l'agrupació I no va encaixar amb una estructuració geogràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques ja que només va resultar significativa la diversitat entre mostres dins del mateix grup ( $F_{SC}$ ). En l'agrupació II també es va mostrar una diversitat intragrupal significativa. A més, es van observar certs indicis d'estructuració geogràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques entre el Nord i el Sud de la Mediterrània ja que el paràmetre  $F_{CT}$  va resultar significatiu encara que de petita magnitud. El marcador **GPIIb 9 pb INS/DEL** també va mostrar una diversitat gènica total significativa en les dues agrupacions ( $p < 0.0001$ ), observant-se també valors significatius de diversitat dins dels grups i entre els grups en ambdues. Cal matitzar, però, que la més clara evidència d'estructuració geogràfica de les freqüències al·lèliques es va donar entre la Península Ibèrica, Sardenya i Marroc (agrupació I) on el paràmetre  $F_{CT}$  va superar la meitat del valor de la diversitat total.

<b>GPIIIa Taq I</b>				
	<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>	<b><math>F_{ST}</math> p</b>	<b><math>F_{SC}</math> p</b>	<b><math>F_{CT}</math> p</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.020 ★ p<0.0001	0.023 ★ 0.00012	-0.003
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.023 ★ p<0.0001	0.017 ★ 0.00037	0.006 ★ p<0.0001
<b>GPIIb 9 pb INS/DEL</b>				
	<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>	<b><math>F_{ST}</math> p</b>	<b><math>F_{SC}</math> p</b>	<b><math>F_{CT}</math> p</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.034 ★ p<0.0001	0.016 ★ 0.00925	0.018 ★ p<0.0001
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.031 ★ p<0.0001	0.030 ★ p<0.0001	0.001 ★ p<0.0001

Taula IV.30. Diversitat gènica en base als marcadors **GPIIIa Taq I** i **GPIIb 9 pb INS/DEL** entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.  $F_{ST}$ : diversitat gènica total.  $F_{SC}$ : diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup.  $F_{CT}$ : diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb  $p < 0.05$ .



**Comparació amb altres poblacions.** Amb la finalitat de contrastar les freqüències al·lèliques obtingudes en les poblacions analitzades, aquestes són mostrades conjuntament amb dades que han estat recollides de la bibliografia a les taules IV.31 i IV.32. Degut a l'escassetat de dades sobre el marcador **GPIIIa Taq I** en la bibliografia, només ha estat possible recollir informació d'una mostra de xinesos amb un nombre d'individus molt petit (taula IV.31). Aquesta mostra es destaca per presentar una elevada freqüència de l'al·lel T1, al contrari del que succeeix en les mostres analitzades en la present tesi, mostrant-se els dos al·lells possibles gairebé equifreqüents. De la mateixa manera, en el cas del polimorfisme **GPIIb 9 pb INS/DEL**, només ha estat possible recopilar informació de dues mostres d'origen europeu (taula IV.32). En totes les poblacions la inserció va ser l'al·lel més freqüent, mostrant valors que van oscil·lar entre 0.774 (Cabras) i 0.560 (Bascos). En la part alta d'aquest rang, amb freqüències de l'al·lel I que van desde 0.758 a 0.700, trobem Nuoro, una mostra d'individus d'arreu d'Europa, Ahizi, i una mostra de francesos amb la mateixa distribució de freqüències que la mostra d'Alpujarras. En la part baixa de l'esmentat rang trobem les mostres d'Àrabs i Berbers amb freqüències de l'al·lel I 0.672 i 0.601 respectivament.

Les anàlisis dutes a terme en aquest apartat mostren la utilitat en l'estudi de la variabilitat genètica a la Mediterrània Occidental dels dos *loci* analitzats, ja que presenten un grau de diversitat considerable entre les sis mostres procedents d'aquesta regió, que fins i tot permet distingir una estructuració geogràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques, especialment per al marcador **GPIIb 9 pb INS/DEL**. La sèrie Sud-saharina, només queda clarament diferenciada de les mostres mediterrànies en base a les freqüències al·lèliques del polimorfisme **GPIIIa Taq I**.

<b>GPIIIa Taq I</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>T1</b>	<b>T2</b>	
<b>Mongoloïdes (Xina)</b>	20	0.540	0.460	Ruan et al 1993
<b>BASC.</b>	85	0.282	0.718	-
<b>ALPU.</b>	98	0.260	0.740	-
<b>ÀRAB.</b>	66	0.265	0.735	-
<b>BERB.</b>	121	0.376	0.624	-
<b>CABR.</b>	94	0.165	0.835	-
<b>NUOR.</b>	93	0.317	0.683	-
<b>AHÍZ.</b>	120	0.083	0.917	-

Taula IV.31. Freqüències al·lèliques del polimorfisme GPIIIa Taq I.

<b>GPIIb 9 pb INS/DEL</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>I</b>	<b>D</b>	
<b>Caucasoides (Europa)</b>	47	0.740	0.260	Ruan et al. 1998
<b>Caucasoides (França)</b>	30	0.700	0.300	Peyruchaud et al. 1995
<b>BASC.</b>	91	0.560	0.440	-
<b>ALPU.</b>	100	0.700	0.300	-
<b>ÀRAB.</b>	96	0.672	0.328	-
<b>BERB.</b>	119	0.601	0.399	-
<b>CABR.</b>	95	0.774	0.226	-
<b>NUOR.</b>	91	0.758	0.242	-
<b>AHÍZ.</b>	122	0.713	0.287	-

Taula IV.32. Freqüències al·lèliques del polimorfisme GPIIb 9 pb INS/DEL.

## B. VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

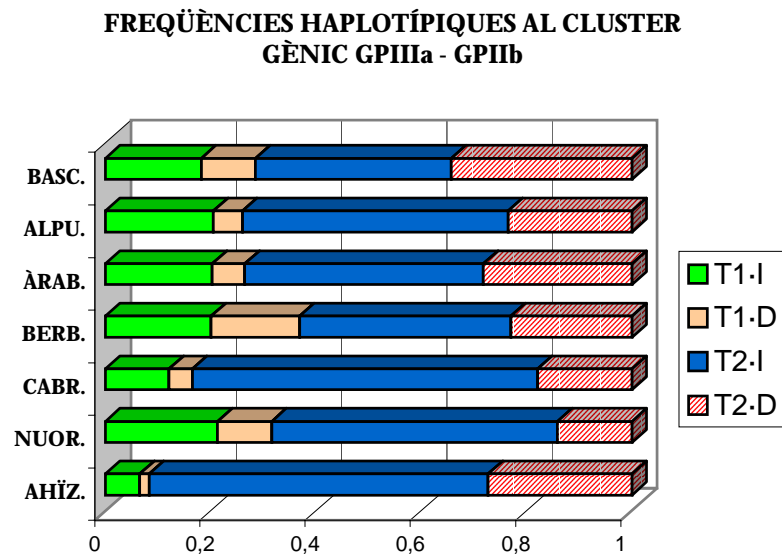
Les freqüències estimades per màxima versemblança dels haplotips formats per les combinacions d'al·lels dels polimorfismes analitzats en els gens GPIIIa i GPIIb es mostren a la taula IV.33. Una representació gràfica de la distribució d'aquestes freqüències en les 7 mostres poblacionals estudiades es mostra en la figura IV.8.

En totes les poblacions l'haplotip més freqüent va ser el T2-I. Aquest es va presentar amb valors que van oscil·lar entre 0.372 (Bascos) i 0.656 (Cabras) en les 6 poblacions mediterrànies. La mostra d'Ahizi va mostrar una freqüència d'aquest haplotip dins de la part alta de l'esmentat rang de variació (0.644).

No es va observar diversitat pel que fa al nombre d'haplotips estimats i totes les mostres analitzades en van presentar 4. La diversitat intrapoblacional en base a les freqüències haplotípiques es presenta a la taula IV.33. Els Berbers van mostrar la màxima heterozigositat (0.710), a continuació les mostres de Bascos, Àrabs, Nuoro i Alpujarras van mostrar valors de diversitat compresos entre 0.690 i 0.652. Cabras i Ahizi van mostrar les heterozigositats més baixes (0.546 i 0.515 respectivament), fet que es deu a que presenten una elevada freqüència de l'haplotip T2-I que els resta diversitat.

HAPLOTIP	BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHIZ.
<b>T1 · I</b>	0.182 ± 0.033	0.205 ± 0.030	0.203 ± 0.047	0.201 ± 0.028	0.121 ± 0.028	0.213 ± 0.037	0.065 ± 0.019
<b>T1 · D</b>	0.103 ± 0.025	0.055 ± 0.021	0.062 ± 0.030	0.168 ± 0.028	0.044 ± 0.019	0.103 ± 0.028	0.018 ± 0.012
<b>T2 · I</b>	0.372 ± 0.036	0.505 ± 0.037	0.453 ± 0.050	0.401 ± 0.032	0.656 ± 0.036	0.543 ± 0.040	0.644 ± 0.034
<b>T2 · D</b>	0.343 ± 0.038	0.235 ± 0.037	0.282 ± 0.047	0.230 ± 0.029	0.179 ± 0.027	0.141 ± 0.027	0.273 ± 0.031
<b>Heterozigositat</b>	0.690 ± 0.014	0.652 ± 0.018	0.674 ± 0.017	0.710 ± 0.009	0.546 ± 0.031	0.654 ± 0.016	0.515 ± 0.026

Taula IV.33. Distribució de les freqüències haplotípiques estimades per als gens GPIIIa i GPIIb en les mostres analitzades.



*Figura IV.8. Freqüències haplotípiques estimades al cluster gènic GPIIIa - GPIIb.*

El test exacte de diferenciació basat en les freqüències haplotípiques estimades (taula IV.34) mostra a Ahizi com la població més diferenciada de la resta ja que presenta diferenciació significativa en totes les comparacions, amb un nivell de significació inferior a 0.0001 en la majoria de casos. Les mostres sardes també van presentar un grau de diferenciació considerable ja que van presentar diferenciació significativa en 5 de les 6 comparacions.

L'anàlisi de les components de la variança de les freqüències haplotípiques en les poblacions mediterrànies agrupades segons el seu origen geogràfic (taula IV.35) revela una diversitat gènica total ( $F_{ST}$ ) significativa tant en l'agrupació I com en la II. En ambdós casos, la component de la variança amb major pes va ser la diversitat gènica intragrupal ( $F_{SC}$ ) que, a més, va resultar significativa. Al contrari del que va mostrar el mateix tipus d'anàlisi en els marcadors considerats individualment, especialment en el cas de GPIIb 9 pb INS/DEL (taula IV.30), no es mostra una clara estructuració geogràfica en la distribució de les freqüències haplotípiques en cap de les dues agrupacions.

En general, en l'estudi de la diversitat interpoblacional dins de la zona de la Mediterrània Occidental, les freqüències al·lèliques dels marcadors estudiats en els gens GPIIb i GPIIIa considerats de forma individual resulten més informatives que les freqüències dels haplotips formats per combinacions dels seus al·lèls. Cal resaltar però, la considerable informativitat de les freqüències haplotípiques dins del marc de la Península Ibèrica, Sardenya o el Nord d'Àfrica.

<b>Haplotips GPIIIa Taq I · GPIIb 9 pb INS/DEL</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHĪZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.07575	0.39726	0.20683	0.00001 ★	0.00202 ★	0.00000 ★
<b>ALPU.</b>			0.35035	0.00092 ★	0.19759	0.02360 ★	0.00014 ★
<b>ÀRAB.</b>				0.19082	0.00693 ★	0.06226	0.00000 ★
<b>BERB.</b>					0.00000 ★	0.01798 ★	0.00000 ★
<b>CABR.</b>						0.00090 ★	0.02264 ★
<b>NUOR.</b>							0.00000 ★
<b>AHĪZ.</b>							

*Taula IV.34. Diferenciació entre parells de poblacions basada en haplotips del cluster gènic GPIIIa - GPIIb. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de significació (p) del test exacte de diferenciació entre poblacions. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.*

<b>Haplotips GPIIIa Taq I - GPIIb 9 pb INS/DEL</b>				
<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>		<b>F<sub>ST</sub> P</b>	<b>F<sub>SC</sub> p</b>	<b>F<sub>CT</sub> P</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.027 ★ p<0.0001	0.019 ★ 0.00012	0.008 0.26997
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.027 ★ p<0.0001	0.024 ★ p<0.0001	0.003 0.20347

Taula IV.35. Diversitat gènica en base a haplotips del cluster gènic GPIIIa - GPIIb entre les mostres agrupades en funció del seu origen geogràfic.  $F_{ST}$ : diversitat gènica total.  $F_{SC}$ : diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup.  $F_{CT}$ : diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb  $p < 0.05$ .

### C. RELACIONS INTERPOBLACIONALS

En la taula IV.36 es mostra la informació sobre relacions interpoblacionals proporcionada conjuntament pels dos polimorfismes estudiats dins del *cluster* gènic de les integrines plaquetàries en forma de matriu de distàncies de Reynolds. Tant la distància màxima com la mínima en el total de les poblacions es van donar entre mostres de la Mediterrània Occidental, essent la primera 0.0864 entre Cabras i Berbers, i 0.0010 la segona, entre Àrabs i Alpujarras mostrant-se així molt properes.

En la representació gràfica d'aquestes relacions interpoblacionals en forma d'arbre *neighbor-joining* (figura IV.9) es mostren Bascos i Cabras especialment, però també Ahizi i Berbers com les poblacions que ocupen les branques més extremes de l'arbre. En el centre de l'arbre es concentren Alpujarras, Àrabs i Nuoro mostrant una relativa proximitat.

	BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHİZ.
BASC.		0.0230	0.0146	0.0113	0.0724	0.0455	0.0821
ALPU.			0.0010	0.0258	0.0199	0.0082	0.0063
ÀRAB.				0.0191	0.0273	0.0122	0.0220
BERB.					0.0864	0.0312	0.0049
CABR.						0.0317	0.0092
NUOR.							0.0249
AHİZ.							

Taula IV.36. Matriu de distàncies de Reynolds per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes GPIIIa Taq I i GPIIb 9 pb INS/DEL.

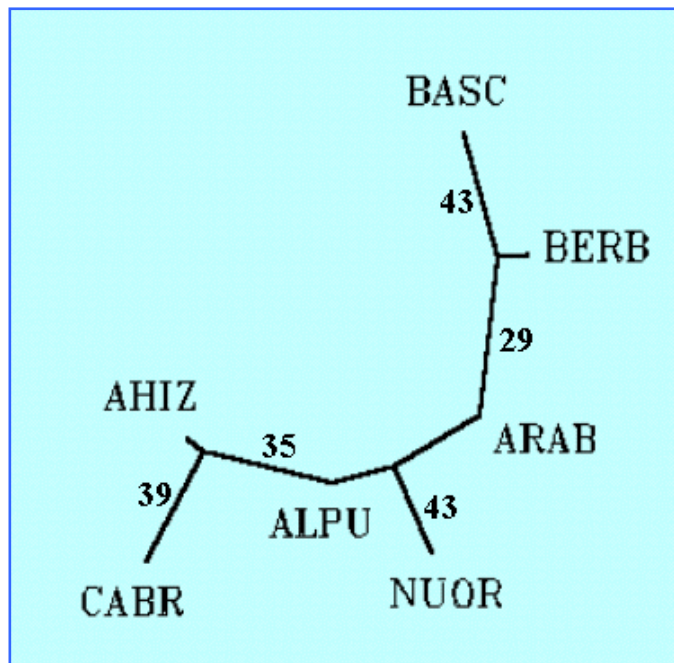


Figura IV.9. Arbre neighbor-joining per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes GPIIIa Taq I i GPIIb 9 pb INS/DEL. Els valors de bootstrap es mostren sobre les branques corresponents.

## D. ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE L·LIGAMENT

El desequilibri de lligament entre els *loci* **GPIIIa Taq I** i **GPIIb 9 pb INS/DEL** no va resultar significatiu en cap de les 7 poblacions estudiades (taula IV.37). Aquest resultat era d'esperar donada la gran distància que separa aquests dos marcadors (unes 250 kilobases).

		GPIIb 9 pb INS/DEL				
		$\Delta'$	$\chi^2$	g.ll.	(p)	$D'$
<b>BASC.</b>	<b>GPIIIa Taq I</b>	-	0.49	1	0.4824	-
<b>ALPU.</b>	<b>GPIIIa Taq I</b>	-	0.88	1	0.3482	-
<b>ARAB.</b>	<b>GPIIIa Taq I</b>	-	1.04	1	0.3070	-
<b>BERB.</b>	<b>GPIIIa Taq I</b>	-	0.29	1	0.5911	-
<b>CABR.</b>	<b>GPIIIa Taq I</b>	-	0.15	1	0.6984	-
<b>NUOR.</b>	<b>GPIIIa Taq I</b>	-	0.32	1	0.5695	-
<b>AHÍZ.</b>	<b>GPIIIa Taq I</b>	-	0.37	1	0.5414	-

Taula IV.37. Desequilibri de lligament entre els marcadors **GPIIIa TaqI** i **GPIIb 9 pb INS/DEL** a les mostres estudiades. Els paràmetres  $\Delta'$  i  $D'$  no van indicar desequilibri de lligament significatiu. Es mostra el valor de  $\chi^2$ , els graus de llibertat i la significació del test per a la desviació de la situació d'equilibri.



## 1.4. POLIMORFISMES ANALITZATS ALS GENS PLAT I PAI-1

### A. VARIACIÓ AL·LÈLICA

En la taula IV.38 s'exposen les freqüències al·lèliques i genotípiques dels marcadors **PLAT TPA25** i **PAI-1 Hind III** en les 7 poblacions estudiades. En la figura IV.10 es mostra una representació gràfica de les esmentades freqüències al·lèliques.

Per al marcador **PLAT TPA25**, l'al·lel I va ser el més freqüent en les dues mostres de la Península Ibèrica, mentre que a Àrabs, Berbers, Cabras, Nuoro i Ahizi ho va ser l'al·lel D. Dins de les poblacions de l'àrea mediterrània l'al·lel I es va presentar en un rang de freqüències que va oscil·lar entre 0.370 (Nuoro) i 0.588 (Bascos). La sèrie Sud-sahariana va mostrar un valor sensiblement per sota de l'esmentat rang (0.286). Tres mostres no es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg (taula IV.38): els Bascos, amb defecte d'heterozigots ( $F_{is} = 0.231$ ), i Cabras i Nuoro amb excés d'heterozigots amb valors de  $F_{is}$  de -0.757 i -0.493, respectivament.

El polimorfisme **PAI-1 Hind III** va mostrar com a al·lel més freqüent el Hd1 (digestió positiva) que dins de les 6 mostres de la Mediterrània Occidental va prendre valors que van oscil·lar entre 0.654 (Bascos) i 0.500 (Cabras). Ahizi va presentar una freqüència de l'al·lel Hd1 dins d'aquest rang (0.619). Les set mostres analitzades es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg (taula IV.38).

MARCADOR		BASC.	ALPU.	ARAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHIZ.
PLAT TPA25	<b>GENOTIPS:</b>							
	I I	0.402	0.296	0.276	0.272	-	0.022	0.059
	I D	0.373	0.459	0.428	0.427	0.862	0.695	0.454
	D D	0.225	0.245	0.296	0.301	0.138	0.283	0.487
	N	92	98	98	136	94	92	119
	Het. (unb.)	0.487	0.500	0.500	0.500	0.493	0.469	0.410
	HW (p exacta)	0.024★	0.424	0.161	0.088	0.000★	0.000★	0.268
<b>AL-LELS:</b>								
I	0.588	0.526	0.490	0.485	0.431	0.370	0.286	
D	0.412	0.474	0.510	0.515	0.569	0.630	0.714	
PAI-1 Hind III	<b>GENOTIPS:</b>							
	Hd1 Hd1	0.436	0.364	0.361	0.367	0.237	0.272	0.377
	Hd1 Hd2	0.436	0.464	0.519	0.441	0.526	0.511	0.484
	Hd2 Hd2	0.128	0.172	0.120	0.192	0.237	0.217	0.139
	N	78	99	83	120	93	92	122
	Het. (unb.)	0.456	0.484	0.474	0.487	0.500	0.500	0.474
	HW (p exacta)	0.803	0.834	0.485	0.348	0.681	1	0.850
<b>AL-LELS:</b>								
Hd1	0.654	0.596	0.620	0.587	0.500	0.527	0.619	
Hd2	0.346	0.404	0.380	0.412	0.500	0.473	0.381	

Taula IV.38. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes PLAT TPA25 i PAI-1 Hind III a les mostres estudiades. Het. (unb.): heterozigotitat “unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l’equilibri Hardy-Weinberg. ★  $p < 0.05$ .

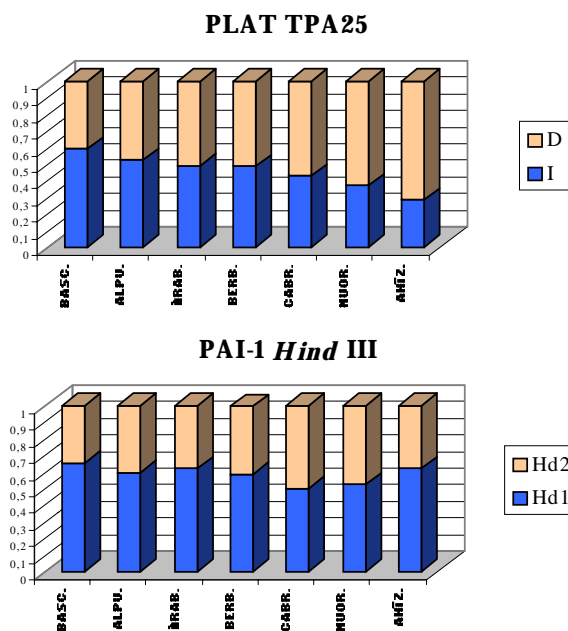


Figura IV.10. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors PLAT TPA25 i PAI-1 Hind III a les mostres estudiades.

**Diversitat intrapoblacional.** En el polimorfisme **PLAT TPA25** totes les poblacions estudiades van presentar valors elevats d'heterozigositat (taula IV.38). Dins de les mostres mediterrànies Alpujarras, Àrabs i Berbers van presentar el màxim valor possible d'heterozigositat per a un marcador bial·lèlic (0.500) i Nuoro va presentar la menor diversitat (0.469). La mostra d'Ahizi va presentar una heterozigositat per sota d'aquest rang (0.410).

En el marcador **PAI-1 Hind III** també es van donar valors d'heterozigositat força elevats (taula IV.38). Dins de les 6 mostres de la Mediterrània Occidental, Cabras i Nuoro van presentar la màxima diversitat possible (0.500) mentre que els Bascos van presentar el valor més baix dins de l'esmentada àrea geogràfica (0.456). Ahizi va presentar una heterozigositat dins d'aquest rang de variació (0.474).

**Diversitat interpoblacional.** En les taules IV.39 i IV.40 es mostren els resultats de les comparacions entre les poblacions estudiades en base a les freqüències al·lèliques dels polimorfismes analitzats en els gens PLAT i PAI-1 utilitzant el test de  $\chi^2$  i el test exacte de diferenciació.

En el marcador **PLAT TPA25** (taula IV.39), Ahizi i Nuoro van ser les poblacions més clarament diferenciades mostrant en el test exacte de diferenciació comparacions significatives amb el total de les mostres. Aquesta diferenciació ve condicionada per la relativament baixa freqüència de la inserció en aquestes poblacions. S'observa també certa diferenciació de les mostres de Bascos, condicionada per ser la mostra amb una freqüència més elevada de la inserció, i de Cabras, condicionada per la seva sorprenent manca d'individus homozigots I I.

Per al *locus* **PAI-1 Hind III** (taula IV.40) només s'intueix cert grau de diferenciació en el cas de Cabras que mostra comparacions significatives amb Ahizi i Bascos en ambdós tests. Aquest fet es deu a que Cabras presenta una distribució equifreqüent per als dos al·lèls d'aquest polimorfisme i Ahizi i Bascos són les mostres que més s'allunyen d'aquesta situació conjuntament amb Àrabs, població amb la qual Cabras també presenta diferenciació significativa encara que només en el test  $\chi^2$ .

Una anàlisi de la variança de les freqüències al·lèliques indica per al marcador **PLAT TPA25** un major grau de variació en el total de les poblacions analitzades ( $F_{st} = 0.038$ ,  $p < 0.0001$ ) que dins de les 6 mostres mediterrànies ( $F_{st} = 0.016$ ,  $p = 0.00012$ ) com era d'esperar en base a la diferenciació mostrada per Ahizi. En el cas del polimorfisme **PAI-1 Hind III**, s'observa un grau de variació molt petit tant en les mostres mediterrànies ( $F_{st} = 0.007$ ,  $p = 0.04018$ ) com en el total de les mostres ( $F_{st} = 0.006$ ,  $p = 0.03868$ ) que, a més, es troba proper al límit de la significació. Aquest resultat concorda amb l'escassa diversitat interpoblacional detectada per a aquest marcador en la taula IV.40.

PLAT TPA25							
	BASC.	ALPU.	ÀRAB.	BERB.	CABR.	NUOR.	AHİZ.
BASC.		1.594 0.20672	3.900 0.04830★	4.958 0.02597★	9.700 0.00184★	18.521 0.00002★	41.129 0.00000★
ALPU.	0.29174		0.500 0.47945	0.737 0.39036	3.445 0.06343	9.325 0.00226★	25.885 0.00000★
ÀRAB.	0.15022	0.7419		0.009 0.92336	1.342 0.24671	5.592 0.01804★	19.042 0.00001★
BERB.	0.09268	0.64858	1.0000		1.325 0.24965	5.970 0.01455★	21.211 0.00000★
CABR.	0.00000★	0.00000★	0.00000★	0.00000★		1.455 0.22779	9.728 0.00182★
NUOR.	0.00000★	0.00000★	0.00000★	0.00000★	0.00983★		3.341 0.06759
AHİZ.	0.00000★	0.00000★	0.00003★	0.00003★	0.00000★	0.00140★	

Taula IV.39. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador PLAT TPA25. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1 g,ii}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.

<b>PAI-1 Hind III</b>							
	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHİZ.</b>
<b>BASC.</b>		1.243 0.26492	0.387 0.53388	1.755 0.18521	8.194 0.00420★	5.581 0.01816★	0.501 0.47892
<b>ALPU.</b>	0.55276		0.228 0.63328	0.032 0.85781	3.567 0.05892	1.834 0.17566	0.240 0.62388
<b>ÀRAB.</b>	0.58432	0.60545		0.445 0.50466	5.160 0.02312★	3.102 0.7817	0.001 0.97358
<b>BERB.</b>	0.4290800	0.90946	0.33843		3.241 0.07183	1.539 0.21473	0.497 0.48086
<b>CABR.</b>	0.01294★	0.14961	0.06026	0.13001		0.273 0.60105	6.074 0.01372★
<b>NUOR.</b>	0.06573	0.39078	0.19051	0.37415	0.85792		3.618 0.05716
<b>AHİZ.</b>	0.70595	0.81169	0.88552	0.55875	0.04426★	0.16133	

*Taula IV.40. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador PAI-1 Hind III. Per sobre de la diagonal es mostren els valors de l'estadístic  $\chi^2_{1 g,li}$  amb la seva significació  $p$  a la part inferior. Per sota de la diagonal es mostren els valors de significació ( $p$ ) del test exacte de diferenciació. Les diferenciacions estadísticament significatives es marquen amb el símbol ★.*

Una anàlisi de la diversitat gènica en les 6 poblacions mediterrànies agrupades en funció del seu origen geogràfic (taula IV.41) va revelar que en el marcador **PLAT TPA25** la diversitat gènica total ( $F_{ST}$ ) coincideix plenament amb l'existent entre els grups de mostres ( $F_{CT}$ ) de l'agrupació I. En l'agrupació II, la unió de les mostres sardes amb les de la Península Ibèrica provoca que la diversitat intragrupal esdevingui significativa i que centri el major pes de la diversitat total. Aquests resultats evidencien l'existència d'una estructuració geogràfica en la distribució de les freqüències al·lèliques d'aquest polimorfisme entre la Península Ibèrica, Sardenya i el Nord d'Àfrica. En el cas del polimorfisme **PAI-1 Hind III**, encara que també presenta una diversitat gènica total significativa en les dues agrupacions, aquesta és de petita magnitud. En l'agrupació I la component intergrupala de la diversitat va tenir més pes que la intragrupal, encara que no va ser significativa. En el cas de l'agrupació II el paràmetre  $F_{SC}$  va ser el que va prendre més rellevança resultant significatiu. Aquests resultats indiquen cert grau d'estructuració geogràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques d'aquest marcador entre la Península Ibèrica, Sardenya i el Nord d'Àfrica.

<b>PLAT TPA25</b>				
<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>		<b>F<sub>ST</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>SC</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>CT</sub></b> <b>p</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.021 ★ 0.0003	0.000 0.339	0.021 ★ p<0.0001
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.012 ★ 0.0004	0.022 ★ p<0.0001	-0.010
<b>PAI-1 Hind III</b>				
<b>AGRUPACIONS POBLACIONALS</b>		<b>F<sub>ST</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>SC</sub></b> <b>p</b>	<b>F<sub>CT</sub></b> <b>p</b>
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.009 ★ 0.039	-0.002	0.011 0.064
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.006 ★ 0.037	0.009 ★ 0.034	-0.003

*Taula IV.41. Diversitat gènica en base als marcadors PLAT TPA25 i PAI-1 Hind III entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic. F<sub>ST</sub>: diversitat gènica total. F<sub>SC</sub>: diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup. F<sub>CT</sub>: diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb p<0.05.*

**Comparació amb altres poblacions.** En la taula IV.42 es mostren les freqüències de la inserció *Alu* **TPA25** obtingudes per Tishkoff i col·laboradors (2000) en un ampli conjunt de mostres d'arreu del món juntament amb les obtingudes en la present tesi. Totes elles es mostren ordenades en ordre creixent de freqüència de l'al·lel I. La freqüència més baixa de l'inserció correspon als Naisioi de Melanesia (0.070) mentre que els Ticuna de l'Amazònia presenten la més elevada (0.910). Totes les mostres analitzades en el present treball van presentar valors compresos dins d'aquest rang. Ahizi mostra una freqüència de I (0.286) similar a d'altres poblacions de l'Àfrica Sud-sahariana com Bamileke, Bantus de Sudàfrica i Herero. La resta de mostres analitzades presenten freqüències de la inserció compreses entre 0.370 (Nuoro) i 0.588 (Bascos). Dins d'aquest rang apareix una mostra europea recopilada en la bibliografia (Danesos). Amb la mateixa finalitat, contextualitzar els resultats obtinguts en el present treball, en la taula IV.43 es mostren les freqüències al·lèliques del marcador **PAI-1 Hind III** en les poblacions analitzades conjuntament amb les d'altres 3 recopilades en la bibliografia. La freqüència més baixa de l'al·lel Hd1

correspon als Irlandesos (0.368), mentre que la més elevada correspon als Bascos (0.654). En les mostres analitzades, els valors per a aquest al·lel són iguals o superiors a 0.500, entre les mostres recollides en la bibliografia només Suècia, amb un valor de 0.537, compleix aquesta condició.

Finalment, de totes les anàlisis realitzades en els 2 marcadors estudiats es pot concloure que **PLAT TPA25** resulta més informatiu com a indicador de diversitat poblacional entre les mostres estudiades ja que a més de distingir la sèrie Sud-sahariana de les 6 mostres mediterrànies, permet detectar variabilitat entre aquestes últimes. Per contra, el marcador **PAI Hind III** mostra una major homogeneïtat entre el total de les poblacions estudiades.

<b>PLAT TPA25</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFRÈNCIA</b>
		<b>I</b>	<b>D</b>	
<b>Naisioi (Melanèsia)</b>	22	0.070	0.930	Tishkoff et al. 2000
<b>Papua Nova Guinea</b>	93	0.160	0.840	Tishkoff et al. 2000
<b>Va/Sekele !Kung San (Namíbia)</b>	30	0.180	0.820	Tishkoff et al. 2000
<b>Biaka (Rep. Centrafricana)</b>	69	0.220	0.780	Tishkoff et al. 2000
<b>Mbuti (Rep. del Congo)</b>	39	0.260	0.740	Tishkoff et al. 2000
<b>Kwengo (Namíbia)</b>	37	0.270	0.730	Tishkoff et al. 2000
<b>Jueus d' Etiòpia</b>	60	0.270	0.730	Tishkoff et al. 2000
<b>Atayal (Taiwan)</b>	42	0.270	0.730	Tishkoff et al. 2000
<b>AHÍZ.</b>	119	0.286	0.714	-
<b>Bamileke (Camerun)</b>	31	0.290	0.710	Tishkoff et al. 2000
<b>Bantu parlant (Sudàfrica)</b>	42	0.290	0.710	Tishkoff et al. 2000
<b>Herero (Namíbia)</b>	42	0.310	0.690	Tishkoff et al. 2000
<b>Zu/Wasi !Kung San (Namíbia)</b>	29	0.340	0.660	Tishkoff et al. 2000
<b>Jueus del Yemen</b>	41	0.350	0.650	Tishkoff et al. 2000
<b>NUOR.</b>	92	0.370	0.630	-
<b>Ewondo (Camerun)</b>	34	0.380	0.620	Tishkoff et al. 2000
<b>CABR.</b>	94	0.431	0.569	-
<b>Wolof (Senegal)</b>	61	0.440	0.560	Tishkoff et al. 2000
<b>Xinesos</b>	51	0.460	0.540	Tishkoff et al. 2000
<b>Somalis</b>	29	0.470	0.530	Tishkoff et al. 2000
<b>BERB.</b>	136	0.485	0.515	-
<b>ÀRAB.</b>	98	0.490	0.510	-
<b>Danesos</b>	51	0.500	0.500	Tishkoff et al. 2000
<b>Suruis (Rondònia, Brasil)</b>	44	0.500	0.500	Tishkoff et al. 2000
<b>Ami (Taiwan)</b>	40	0.520	0.480	Tishkoff et al. 2000
<b>ALPU.</b>	98	0.526	0.474	-
<b>Yakuts (Sibèria)</b>	51	0.530	0.470	Tishkoff et al. 2000
<b>Druze (Israel)</b>	71	0.540	0.460	Tishkoff et al. 2000
<b>Micronesis</b>	29	0.550	0.450	Tishkoff et al. 2000
<b>Japonesos</b>	50	0.560	0.440	Tishkoff et al. 2000
<b>BASC.</b>	92	0.588	0.412	-
<b>Cheyenne (Oklahoma)</b>	55	0.590	0.410	Tishkoff et al. 2000
<b>Maya (Yucatan, Mèxic)</b>	51	0.630	0.370	Tishkoff et al. 2000
<b>Finesos</b>	34	0.650	0.350	Tishkoff et al. 2000
<b>Karitiana (Rondònia, Brasil)</b>	55	0.650	0.350	Tishkoff et al. 2000
<b>Ticuna (Amazònia, Brasil)</b>	67	0.910	0.090	Tishkoff et al. 2000

Taula IV.42. Freqüències al·lèliques del polimorfisme PLAT TPA25.



<b>PAI-1 <i>Hind</i> III</b>				
<b>POBLACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>AL·LELS:</b>		<b>REFERÈNCIA</b>
		<b>Hd1</b>	<b>Hd2</b>	
<b>Suècia</b>	68	0.537	0.463	Dawson et al. 1991
<b>Caucasoides (Nordamèrica)</b>	43	0.420	0.580	Klinger et al. 1987
<b>Irlandesos</b>	423	0.368	0.632	Lee et al. 1999
<b>BASC.</b>	78	0.654	0.346	-
<b>ALPU.</b>	99	0.596	0.404	-
<b>ÀRAB.</b>	83	0.620	0.380	-
<b>BERB.</b>	120	0.587	0.412	-
<b>CABR.</b>	93	0.500	0.500	-
<b>NUOR.</b>	92	0.527	0.473	-
<b>AHÏZ.</b>	122	0.619	0.381	-

*Taula IV.43. Freqüències al·lèliques del polimorfisme PAI-1 Hind III.*

## 1.5. DISCUSSIÓ SOBRE ELS RESULTATS POBLACIONALS

Per tal de sumaritzar tota la informació obtinguda en l'apartat relatiu a l'estudi poblacional, es va procedir a analitzar les relacions entre les poblacions estudiades en base al total dels polimorfismes analitzats. Donat que no va ser possible la determinació del polimorfisme **FVII HVR4** a la mostra de Cabras, i per tal d'aprofitar la màxima informació possible, es van construir 2 matrius de distàncies de Reynolds (taules IV.44 i IV.45), en una d'elles es va incloure la informació proporcionada conjuntament pels 9 polimorfismes analitzats en les poblacions sense incloure la mostra de Cabras (taula IV.44), mentre que en l'altra es va utilitzar el total de les 7 poblacions estudiades però sense incloure la informació proporcionada pel marcador **FVII HVR4** per a cap d'elles (taula IV.45). Els valors de les distàncies de Reynolds entre les mostres poblacionals van ser molt similars a les dues matrius. En el total de les 7 poblacions analitzades la distància més gran es va donar entre les mostres d'Ahízi i de Bascos (0.1328 taula IV.44; 0.1444 taula IV.45) mentre que la més petita es va detectar entre Àrabs i Alpujarras (0.0051 taula IV.44; 0.0057 taula IV.45). Dins de les poblacions de la Mediterrània Occidental les mostres més distants entre si van ser Bascos i Nuoro (0.0646 taula IV.44; 0.0507 taula IV.45), distància que va ser molt similar a la detectada entre Bascos i Cabras (0.0503 taula IV.45).

	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHÍZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.0154 ± 0.0072	0.0252 ± 0.0107	0.0232 ± 0.0045	0.0646 ± 0.0180	0.1328 ± 0.0499
<b>ALPU.</b>			0.0051 ± 0.00197	0.0128 ± 0.0040	0.0277 ± 0.0118	0.0794 ± 0.0278
<b>ÀRAB.</b>				0.0104 ± 0.0028	0.0318 ± 0.0134	0.0727 ± 0.0231
<b>BERB.</b>					0.0333 ± 0.0093	0.1008 ± 0.0312
<b>NUOR.</b>						0.0332 ± 0.0332
<b>AHÍZ.</b>						

Taula IV.44. Matriu de distàncies de Reynolds ( $\pm$  error de la distància) en base a tots els polimorfismes analitzats en totes les poblacions estudiades excepte Cabras.

	<b>BASC.</b>	<b>ALPU.</b>	<b>ÀRAB.</b>	<b>BERB.</b>	<b>CABR.</b>	<b>NUOR.</b>	<b>AHİZ.</b>
<b>BASC.</b>		0.0168 ± 0.0069	0.0284 ± 0.0121	0.0212 ± 0.0046	0.0503 ± 0.0096	0.0507 ± 0.0219	0.1444 ± 0.0539
<b>ALPU.</b>			0.0057 ± 0.0028	0.0126 ± 0.0048	0.0126 ± 0.0033	0.0169 ± 0.0126	0.0872 ± 0.0308
<b>ÀRAB.</b>				0.0096 ± 0.0032	0.0166 ± 0.0051	0.0206 ± 0.0117	0.0789 ± 0.0253
<b>BERB.</b>					0.0355 ± 0.0121	0.0309 ± 0.0235	0.1115 ± 0.0347
<b>CABR.</b>						0.0117 ± 0.0120	0.0661 ± 0.0257
<b>NUOR.</b>							0.0789 ± 0.0370
<b>AHİZ.</b>							

*Taula IV.45. Matriu de distàncies de Reynolds ( $\pm$  error de la distància) en el total de les poblacions estudiades en base a tots els polimorfismes analitzats excepte per a FVII HVR4.*

En base a les 2 matrius de distàncies, ja comentades, van ser construïts dos arbres *neighbor-joining* (figures IV.11 A i IV.12 A). A més es van fer dues representacions de les anàlisis per components principals corresponents a cadascun dels arbres (figures IV.11 B i IV.12 B).

Com era d'esperar, els dos arbres són molt similars pel que fa a forma i distribució de les mostres poblacionals en les seves branques. Ambdós arbres van mostrar una gran robustesa amb valors de *bootstrap* força elevats per a les seves branques, especialment en el que no es va incloure la mostra de Cabras (figura IV.11 A). Bascos, Nuoro i Ahizi van ser les poblacions que van ocupar els extrems dels arbres, especialment la darrera, que es va mostrar clarament separada de la resta. Destaca l'agrupació entre les mostres d'Àrabs i Alpujarras en la part central d'ambdós arbres i la mostra de Berbers també mostra cert grau d'agrupació amb aquestes encara que amb tendència a ocupar una branca més allunyada. La incorporació de les dades relatives a la mostra de Cabras (figura IV.12 A), fa que aquesta es situï a prop de Nuoro i a més condiciona que aquesta última no ocupi una posició tan extrema en comparació amb l'arbre de la figura IV.11 A.

Respecte a les anàlisis per components principals, en ambdós casos, les dos primeres components van explicar un elevat percentatge de la diversitat total (85.21%, figura IV.11 B; 83.26%, figura IV.12 B). S'observa que les mostres poblacionals presenten una distribució en l'espai similar a la mostrada en els arbres. Sobre la primera component, les mostres d'Ahizi i Bascos ocupen les posicions més extremes en ambdues representacions. Quan s'utilitza la informació proporcionada per tots els polimorfismes sense utilitzar la mostra de Cabras (figura IV.11 B), les mostres d'Àrabs i Alpujarras són les més properes i la mostra de Berbers es situa a prop d'aquestes dues. La inclusió de la mostra de Cabras, sense utilitzar la informació proporcionada per FVII HVR4 (figura IV.12 B), dóna lloc a una representació en la que Ahizi es separa de tres agrupacions de mostres: Cabras i Nuoro; Àrabs i Alpujarras; i Berbers i Bascos.

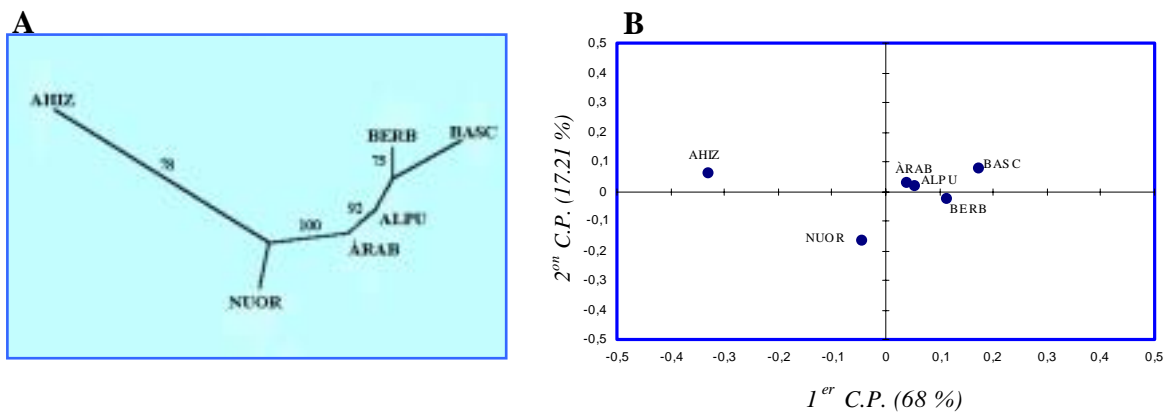


Figura IV.11. Representació gràfica de les relacions genètiques entre les poblacions estudiades, excepte Cabras, en base a tots els polimorfismes analitzats. **A:** Arbre neighbor-joining, els valors de bootstrap es mostren sobre les branques corresponents. **B:** Representació de l'anàlisi per components principals.

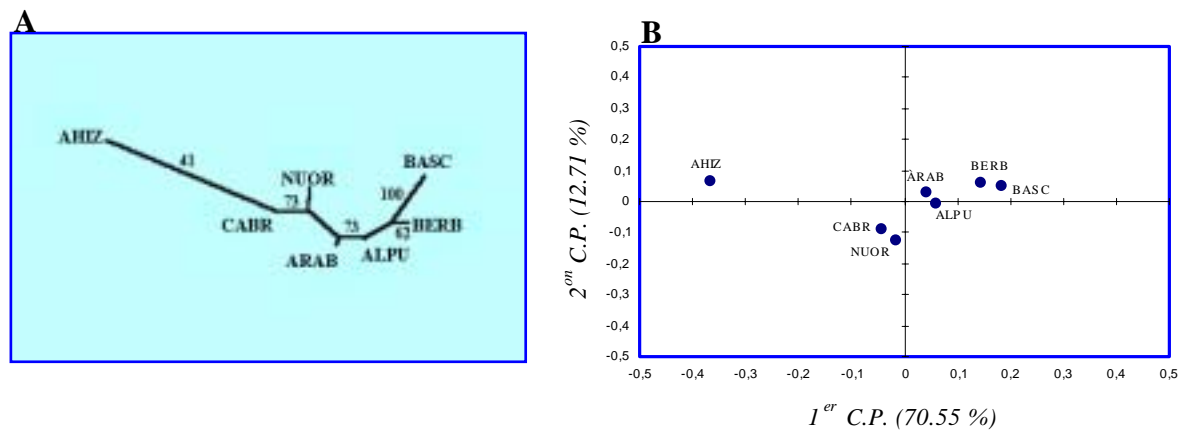


Figura IV.12. Representació gràfica de les relacions genètiques entre totes les poblacions estudiades en base a tots els polimorfismes analitzats excepte per a FVII HVR4. **A:** Arbre neighbor-joining; els valors de bootstrap es mostren sobre les branques corresponents. **B:** Representació de l'anàlisi per components principals.

Els 9 polimorfismes analitzats han resultat de gran utilitat a l'hora d'avaluar la diversitat interpoblacional en les 7 mostres estudiades. Aquest fet és clarament manifest en el cas d'Ahizi. Aquesta mostra va mostrar valors extrems pel que fa a freqüències al·lèliques en 6 (FVII -323 10 pb INS/DEL, FGB *HindIII* i *BclI*, FGA *TaqI*, GPIIIa *TaqI* i PLAT TPA25) dels 9 loci analitzats, en els que va condicionar un valor de  $F_{ST}$  en el total de les poblacions superior al mostrat quan es van considerar únicament les poblacions de la Mediterrània Occidental per a estimar aquest paràmetre. Aquest resultat era esperable per la gran distància geogràfica que separa aquesta mostra de la resta de les poblacions estudiades i per la seva pertinença a un grup humà d'origen diferent al de les mostres mediterrànies.

De la mateixa manera, els marcadors analitzats també han mostrat ser de gran utilitat en l'evaluació de la diversitat interpoblacional dins de la Mediterrània Occidental. Dins d'aquesta regió, va ser més evident l'estructuració geogràfica de les freqüències gèniques en l'agrupació I (entre la Península Ibèrica, el Nord d'Àfrica i Sardenya) que en

l'agrupació II on les poblacions es separaven en Nord (Península Ibèrica i Sardenya) i Sud (Nord d'Àfrica). Es van donar indicis de l'existència d'una estructuració geogràfica de la diversitat genètica d'acord amb l'agrupació I en els marcadors **FGB BclII** i **PAI-1 HindIII** que es va manifestar clarament, mitjançant valors de  $F_{CT}$  significatius, en els marcadors **GPIIb 9 pb INS/DEL** i **PLAT TPA 25**, així com en els haplotips del *cluster* genètic del fibrinogen. D'altra banda, només van existir indicis d'estructuració geogràfica de les freqüències genètiques d'acord amb l'agrupació II en el cas del marcador **GPIIIa TaqI**. Per tal de complementar aquestes dades, es va realitzar l'anàlisi molecular de la varianza (AMOVA) en les sis poblacions de la Mediterrània Occidental utilitzant la informació proporcionada conjuntament pels 9 marcadors analitzats en elles. Apart de les agrupacions I i II utilitzades al llarg de totes les anàlisis poblacionals realitzades, es va testar una tercera agrupació, anomenada III, en la que es van agrupar les 2 mostres de la Península Ibèrica amb les 2 mostres marroquines separant-les de les 2 mostres sardes (taula IV.46). Com ja s'havia mostrat en la majoria dels AMOVAs realitzats en cadascun dels gens o *clusters* genètics analitzats, es va mostrar una estructuració geogràfica de la diversitat genètica dels marcadors estudiats d'acord amb l'agrupació I, on el total de la diversitat genètica ( $F_{ST} = 0.0202$ ,  $p = 0.00019$ ) va ser explicada per la diversitat genètica entre els grups ( $F_{CT} = 0.0209$ ,  $p < 0.0001$ ). No obstant, en l'agrupació II, en la que s'analiza una separació Nord-Sud, el total de la diversitat genètica ( $F_{ST} = 0.0118$ ,  $p = 0.00050$ ) va ser explicat per la diversitat genètica entre mostres dins de les agrupacions ( $F_{SC} = 0.0215$ ,  $p = 0.00012$ ), concretament entre les mostres de la Península Ibèrica i les mostres sardes. A més, l'estructuració de la diversitat genètica també es va adaptar en gran mesura amb l'agrupació III, en la que s'analiza una separació Est-Oest, on la diversitat genètica total ( $F_{ST} = 0.0284$ ,  $p = 0.00062$ ) va ésser explicada gairebé totalment per la diversitat genètica entre grups de mostres ( $F_{CT} = 0.0253$ ,  $p < 0.0001$ ). En base a aquests resultats, es pot afirmar que existeix un grau considerable d'homogeneïtat genètica entre les mostres de la Península Ibèrica i les mostres marroquines en els 9 marcadors analitzats. Aquest fet indicaria que l'estret de Gibraltar no ha representat una barrera infranquejable per al flux genètic entre el Nord d'Àfrica i la Península Ibèrica en temps passats. En canvi, les mateixes anàlisis han mostrat que la insularitat de les mostres sardes ha condicionat certa peculiaritat genètica de les mateixes que deixa entreveure l'existència d'un aïllament d'aquestes mostres respecte a les altres, ja siguin peninsulars o marroquines.

AGRUPACIONS POBLACIONALS		$F_{ST}$ P	$F_{SC}$ P	$F_{CT}$ P
<b>I</b>	<b>(BASC. ALPU.)(ÀRAB. BERB.)(CABR. NUOR.)</b>	0.0202 ★ 0.00019	-0.00069	0.0209 ★ p<0.0001
<b>II</b>	<b>(BASC. ALPU. CABR. NUOR.) (ÀRAB. BERB.)</b>	0.0118 ★ 0.00050	0.0215 ★ 0.00012	-0.0099
<b>III</b>	<b>(BASC. ALPU. ÀRAB. BERB.) (CABR. NUOR.)</b>	0.0284 ★ 0.00062	0.0032 0.13611	0.0253 ★ p<0.0001

Taula IV.46. Diversitat gènica en base als 9 marcadors entre les 6 mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.  $F_{ST}$ : diversitat gènica total.  $F_{SC}$ : diversitat gènica entre mostres dins del mateix grup.  $F_{CT}$ : diversitat gènica entre grups de mostres. El símbol ★ indica els valors amb  $p < 0.05$ .

Dins de la Península Ibèrica, cal destacar la gran diferenciació mostrada per la mostra de Bascos que va presentar valors extrems en la distribució de les freqüències al·lèliques respecte a la resta de poblacions analitzades, incloent la mostra d'Ahizi, en 6 (**FVII -323 10 pb INS/DEL, FVII HVR4, FGA *TaqI*, GPIIb 9 pb INS/DEL, PLAT TPA25 i PAI-1 *HindIII***) dels 9 marcadors analitzats. Aquest fet queda clarament reflectit en la col·locació d'aquesta mostra a l'extrem dels arbres mostrats a les figures IV.11 i IV.12. Aquest resultat confirma certa peculiaritat genètica de la població basca dins del marc de les poblacions mediterrànies detectada en molts estudis basats en dades craniomètriques (Lalueza et al. 1996), marcadors clàssics (Aguirre et al. 1991, Manzano et al. 1996), marcadors d'ADN autosòmics (Comas et al. 1998), ADN mitocondrial (Richards et al. 1996) i cromosoma Y (Scozzari et al. 1997; Lucotte i Hazaout, 1996). Aquesta peculiaritat ha estat interpretada moltes vegades com una conseqüència de l'origen mesolític de la població basca no influïda genèticament per l'expansió demogràfica del neolític (Cavalli-Sforza et al. 1994), encara que en contraposició a aquesta hipòtesi també s'ha argumentat una colonització neolítica de la regió basca (Calderon et al. 1998) seguida de l'efecte de l'aïllament i la deriva genètica sobre aquesta població.

En el cas de la mostra d'Alpujarras cal destacar cert grau de proximitat genètica amb la mostra d'Àrabs respecte a la qual va mostrar valors molt baixos de distància de Reynolds en el gen FVII (0.0043), en el cluster gènic de les integrines (0.0010) i en la matriu de distàncies construïda utilitzant la informació proporcionada pels 9 marcadors analitzats (0.0051)(taula IV.44), així com amb la mostra de Berbers respecte a la qual va mostrar distàncies de Reynolds de 0.00338 en el gen FVII, i de 0.0126 en la matriu de distàncies que inclou la informació dels 9 marcadors analitzats. Aquests resultats permetrien confirmar una gran proximitat genètica entre la mostra d'Alpujarras i la mostra marroquina d'Àrabs que ja havia estat detectada anteriorment (Kandil, 1999) tant a nivell de polimorfismes clàssics com d'ADN i que podria ser el resultat del contacte històric que va implicar l'ocupació musulmana del regne de Granada durant més de 7 segles. Malgrat tot, existeixen treballs basats en l'estudi de marcadors clàssics, de polimorfismes autosòmics o del cromosoma Y (Simoni et al. 1999, Comas et al. 2000, Bosch et al. 2001) en els que es detecta una forta discontinuïtat genètica entre les poblacions de la Península Ibèrica i l'Àfrica Nord-Occidental, reconeixent-se un escàs flux genètic a través de l'estret de Gibraltar. Els resultats obtinguts en el present treball estarien en contraposició a un flux gènic limitat a través de l'estret de Gibraltar, com a mínim a nivell de les mostres d'Àrabs i Alpujarras aquí analitzades. La mostra d'Àrabs va destacar per posseir valors extrems en les freqüències al·lèliques per al polimorfisme **FGB HindIII** respecte el total de les mostres estudiades i per al marcador **FVII -323 10 pb INS/DEL** entre les poblacions mediterrànies, mentre que la mostra de Berbers ho va fer per a **FGB BclI** i **GPIIIa TaqI** en el total de les mostres analitzades i per a **FGA TaqI** entre les mostres mediterrànies. Aquestes dues mostres també van mostrar un valor baix de distància de Reynolds (0.0104) entre elles en la matriu construïda en base a la informació proporcionada pels 9 marcadors analitzats (taula IV.44) que indicaria certa proximitat genètica entre elles. Aquest fet es contraposaria a un origen diferent per a la població àrab i berber del Marroc i recolçaria la hipòtesi de l'existència d'un fort component berber en la població àrab d'aquest país fruit de l'adquisició de la cultura àrab per part de la població berber originària d'aquesta regió geogràfica al llarg de les generacions, donant lloc a població actualment considerada com a àrab. Aquesta afinitat entre la població àrab i berber al Marroc ha estat anteriorment detectada en base a polimorfismes clàssics i d'ADN (Harich 2002).



Pel que respecta a les mostres sardes, aquestes van mostrar-se ben diferenciades de la resta de mostres mediterrànies. Nuoro va mostrar valors extrems de freqüències al·lèliques per al marcador **FVII HVR4** respecte a la resta de mostres i per als marcadors **FGB HindIII**, **FGB BclI** i **TPA25** respecte a les mostres mediterrànies, mentre que Cabras ho va fer per a **GPIIb 9 pb IND/DEL** i **PAI-1 HindIII** respecte a la resta de mostres i per a **GPIIIa TaqI** respecte a les mostres mediterrànies. A pesar de localitzar-se en dos entorns ben diferenciats dins de l'illa de Sardenya, aquestes dues mostres no presenten diferències remarcables entre elles a nivell dels marcadors analitzats. Aquest fet es pot apreciar pel valor de la distància de Reynolds (0.0117) entre elles en la matriu en que s'inclouen les dues (taula IV.45), de menor magnitud que la distància que separa, per exemple, les dues mostres de la Península Ibèrica (0.0168), i per la seva col·locació una al costat de l'altra en l'arbre i en la representació de l'anàlisi de components principals que inclouen aquestes dues mostres (figura IV.12).

## **PART 2. ESTUDI EPIDEMIOLÒGIC**

En aquest apartat s'exposen els resultats obtinguts en les mostres de 101 famílies nuclears amb fills afectats de CAI.

### **2.1. DADES AL·LÈLIQUES, HAPLOTÍPIQUES I DE DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT**

#### **A. VARIACIÓ AL·LÈLICA**

En les figures de la IV.13 a la IV.20 s'exposen les freqüències al·lèliques i la representació gràfica de les mateixes dels 13 marcadors analitzats a les famílies nuclears. Aquesta mostra ha estat subdividida en 3 grups que comprenen: el total dels individus, els progenitors, i els fills afectats de cardiopatia isquèmica.

En el gen FVII (figura IV.13) s'observa un predomini de l'al·lel D en front de l'al·lel I per al marcador **-323 10 pb INS/DEL** com ja s'havia observat en les mostres poblacionals. La deleció es va presentar amb una freqüència de 0.816 en el total de les famílies i de 0.821 i 0.812 en pares i fills afectats, respectivament. Aquests valors són més propers als mostrats per la mostra d'Alpujarras (0.840) que als mostrats pels Bascos que ja s'havien destacat de les altres mostres poblacionals pel seu elevat valor de l'al·lel D (0.972). Els valors d'heterozigositat (0.295 en pares i 0.307 en fills afectats) es van trobar per sobre dels observats a les mostres de la Península Ibèrica. Tant els pares com els fills afectats van mostrar-se en equilibri Hardy-Weinberg.

Per al marcador **HVR4** (figura IV.13) es va observar un predomini de l'al·lel H6 amb una freqüència de 0.655 en el total d'individus, i amb un valor de 0.639 tant en els fills afectats com en els progenitors. Aquests valors es troben dins del rang observat en les mostres poblacionals peninsulars (0.632 a Bascos i 0.674 a Alpujarras). Com en el cas de la mostra d'Alpujarras, es va presentar l'al·lel H5, encara que amb una freqüència molt baixa (0.005 en pares i fills afectats). L'heterozigositat per a aquest marcador també va ser lleugerament superior en els fills afectats (0.467) que en els pares (0.457) trobant-se aquest parametre dins del rang mostrat per les mostres peninsulars analitzades. La mostra de progenitors així com la de fills afectats van adaptar-se a l'equilibri Hardy-Weinberg.

FVII				
MARCADOR		TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
-323 10 pb INS/DEL	<b>GENOTIPS:</b>			
	I I	0.020	0.021	0.030
	I D	0.328	0.317	0.317
	D D	0.652	0.662	0.653
	N	302	145	101
	Het. (unb.)	0.301	0.295	0.307
	HW (p exacta)	-	0.570	1
	<b>AL·LELS:</b>			
	I	0.184	0.179	0.188
	D	0.816	0.821	0.812
HVR4	<b>GENOTIPS:</b>			
	H7H7	0.133	0.133	0.158
	H7H6	0.400	0.399	0.386
	H7H5	0.010	0.007	0.010
	H6H6	0.454	0.454	0.446
	H6H5	0.003	0.007	-
	N	300	143	101
	Het. (unb.)	0.457	0.457	0.467
	HW (p exacta)	-	0.265	0.129
	<b>AL·LELS:</b>			
H7	0.338	0.336	0.356	
H6	0.655	0.639	0.639	
H5	0.007	0.005	0.005	

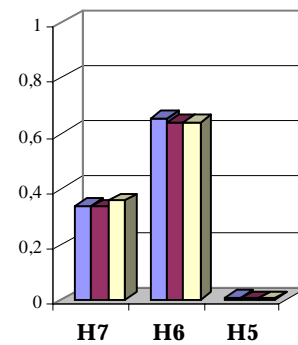
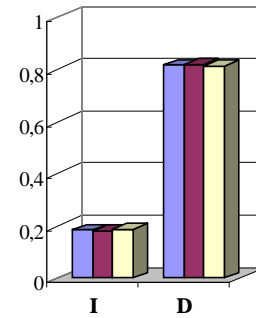


Figura IV.13. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes analitzats en el gen FVII a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Het. (unb.): heterozigositat “ unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques dels dos marcadors estudiats.

Dins del *cluster* gènic del fibrinogen (figura IV.14), el *locus* **FGB Hind III** va mostrar com a al·lel més freqüent el Hd1 (0.816 en el total d'individus), com ja s'havia observat a les mostres poblacionals peninsulars. Cal destacar que el valor assolit per aquest al·lel en el grup de fills afectats (0.832) supera al mostrat pels pares (0.793), Bascos (0.806) i Alpujarras (0.780). Com a conseqüència d'aquest fet, l'heterozigositat del grup de fills afectats va ser la més petita (0.281) entre les mencionades mostres. El grup de pares, en canvi, va mostrar una diversitat de 0.329, estant aquest valor dins del rang observat en les mostres analitzades en la Península Ibèrica. Tant els fills afectats com els progenitors van adaptar-se a l'equilibri Hardy-Weinberg.

Per al marcador **FGB Bcl I** (figura IV.14), l'al·lel més freqüent va ser el B2 amb un valor de 0.863 en el total dels individus. Els fills afectats van mostrar una freqüència d'aquest al·lel (0.864) lleugerament superior a la presentada pel grup de pares (0.846) i també per sobre dels valors mostrats per Bascos (0.841) i Alpujarras (0.837). Aquest fet fa que el grup de fills afectats presenti una heterozigositat de menor magnitud que el grup de pares (0.237 i 0.262, respectivament). Aquests valors es troben per sota del rang observat en les 2 mostres peninsulars estudiades en el present treball. Tant el grup de fills afectats com el grup de progenitors es van mostrar en equilibri Hardy-Weinberg per a aquest polimorfisme.

En el marcador **FGA Taq I** (figura IV.15), l'al·lel més freqüent va ser el T2, amb un valor de 0.788 en el total dels individus. El grup de fills afectats va presentar una freqüència més baixa d'aquest al·lel (0.777) que el grup de pares (0.803) i les poblacions peninsulars (0.849 a Bascos i 0.790 a Alpujarras). Aquest fet va incidir en l'heterozigositat que en el grup de fills malalts va ser de 0.348. Aquest valor va ser superior al mostrat pels pares (0.317), que es van trobar dins del rang establert per les dues poblacions peninsulars per a aquest paràmetre. No es va observar desviació de l'equilibri Hardy-Weinberg en els progenitors ni tampoc en els fills.

FIBRINOGEN				
MARCADOR		TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
FGB <i>Hind</i> III	GENOTIPS:			
	Hd1Hd1	0.675	0.628	0.712
	Hd1Hd2	0.282	0.331	0.238
	Hd2Hd2	0.043	0.041	0.050
	N	302	145	101
	Het. (unb.)	0.301	0.329	0.281
	HW (p exacta)	-	1	0.148
AL-LELS:				
Hd1	0.816	0.793	0.832	
Hd2	0.184	0.207	0.168	
FGB <i>Bcl</i> I	GENOTIPS:			
	B1B1	0.031	0.041	0.023
	B1B2	0.212	0.228	0.227
	B2B2	0.757	0.731	0.750
	N	260	123	88
	Het. (unb.)	0.236	0.262	0.237
	HW (p exacta)	-	0.163	0.655
AL-LELS:				
B1	0.137	0.154	0.136	
B2	0.863	0.846	0.864	
FGA <i>Taq</i> I	GENOTIPS:			
	T1T1	0.060	0.055	0.069
	T1T2	0.305	0.283	0.307
	T2T2	0.635	0.662	0.624
	N	302	154	101
	Het. (unb.)	0.335	0.317	0.348
	HW (p exacta)	-	0.195	0.254
AL-LELS:				
T1	0.212	0.197	0.223	
T2	0.788	0.803	0.777	

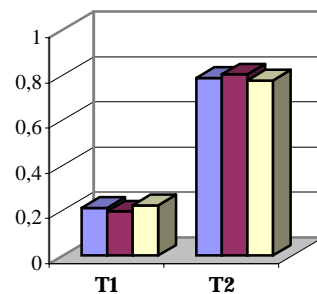
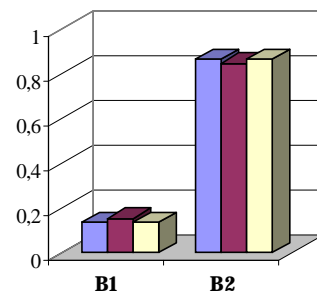
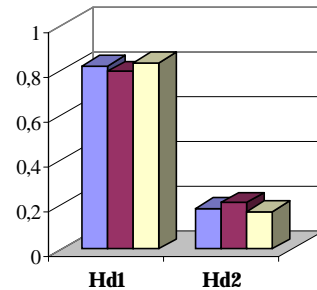


Figura IV.14. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes analitzats en el cluster gènic del fibrinogen a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Het. (unb.): heterozigositat “ unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques dels tres marcadors estudiats.

En referència al gen de la integrina plaquetària **GPIIIa**, en la distribució de les freqüències al·lèliques del STR (CT)<sub>n</sub> es van detectar 14 al·lells diferents en el total dels individus que van cobrir un interval comprés entre 158 pb i 196 pb (figura IV.15). Aquest rang amplia el presentat per Stoffel i Bell (1992) que va cobrir un rang comprés entre 166 pb i 184 pb en una mostra de 57 caucasoides amb una heterozigositat de 0.610. Dels 14 al·lells detectats, 12 es van presentar en els progenitors i 11 en els fills afectats i, per aquesta raó, els darrers presenten una heterozigositat (0.643) inferior a la dels primers (0.715). En general, cada al·lel es diferencia del immediatament anterior o posterior en una sola repetició (2 pb), encara que existeixen salts de 4 pb (entre 158 i 162, i entre 170 i 174) i fins i tot de 6 pb (entre 182 i 188, i entre 190 i 196) que es concentren entre els al·lells de major tamany. S'observa una distribució bimodal de les freqüències al·lèliques, fenomen que es dona amb freqüència en els microsatèl·lits, tant en el total dels individus com en els pares i els fills afectats amb el pic de major freqüència situat en l'al·lel 178 (0.448 a pares i 0.426 a fills afectats) i amb el segon pic situat a l'al·lel 166, de menor freqüència (0.253 a pares i 0.242 a fills). Tant el grup de pares com el grup de fills afectats es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg.

En el marcador **GPIIIa Taq I** (figura IV.16), l'al·lel més freqüent en el total dels individus va ser el T2 (0.599), presentant un valor més baix en els fills afectats (0.589) que en els pares (0.624). Aquests valors resulten força baixos en comparació als observats a Bascos i Alpujarras amb freqüències del mencionat al·lel de 0.718 i 0.740, respectivament. El fet de que les freqüències d'ambdós al·lells siguin més properes a 0.5 en la mostra de famílies nuclears fa que en aquesta els valors de diversitat siguin superiors (0.471 a pares i 0.487 a fills afectats) als mostrats per les poblacions analitzades en la Península Ibérica. El grup de fills afectats no es va adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg, mostrant un defecte significatiu d'heterozigots respecte al que s'esperaria sota situació d'equilibri ( $F_{is} = 0.243$ ;  $p = 0.0145$ ).

El polimorfisme **GPIIb 9 pb INS/DEL** (figura IV.16), va mostrar l'al·lel I com el més freqüent en el total dels individus (0.674), amb valors de 0.669 per als pares i 0.693 per als fills afectats. Aquestes freqüències es troben dins del rang determinat per les poblacions peninsulars analitzades (0.560 a Bascos i 0.700 a Alpujarras). De la mateixa manera que aquestes últimes, tant progenitors com fills afectats van presentar valors d'heterozigositat elevats (0.444 i 0.428, respectivament). Novament, el grup de fills afectats no es va adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg amb un defecte significatiu d'heterozigots respecte al que s'esperaria en condicions d'equilibri ( $F_{is} = 0.255$ ,  $p = 0.0103$ ).

<b>GPIIIa (CT)<sub>n</sub></b>			
	<b>TOTAL</b>	<b>PARES</b>	<b>FILLS (CAI)</b>
<b>N</b>	301	144	101
<b>Het. (unb.)</b>	0.720	0.715	0.643
<b>HW (p ex.)</b>	-	0.058	0.137
<b>AL·LELS (pb):</b>			
<b>158</b>	0.002 ±0.002	-	0.005 ±0.005
<b>162</b>	0.003 ±0.002	0.003 ±0.003	0.005 ±0.005
<b>164</b>	0.003 ±0.002	0.003 ±0.003	0.005 ±0.005
<b>166</b>	0.256 ±0.017	0.253 ±0.025	0.242 ±0.032
<b>168</b>	0.003 ±0.002	0.007 ±0.004	-
<b>170</b>	0.035 ±0.007	0.028 ±0.010	0.035 ±0.013
<b>174</b>	0.028 ±0.006	0.028 ±0.010	0.035 ±0.012
<b>176</b>	0.055 ±0.010	0.049 ±0.011	0.054 ±0.014
<b>178</b>	0.428 ±0.022	0.448 ±0.028	0.426 ±0.034
<b>180</b>	0.163 ±0.015	0.158 ±0.020	0.178 ±0.028
<b>182</b>	0.017 ±0.005	0.017 ±0.007	0.010 ±0.007
<b>188</b>	0.003 ±0.002	0.003 ±0.003	0.005 ±0.005
<b>190</b>	0.002 ±0.002	-	-
<b>196</b>	0.002 ±0.002	0.003 ±0.004	-

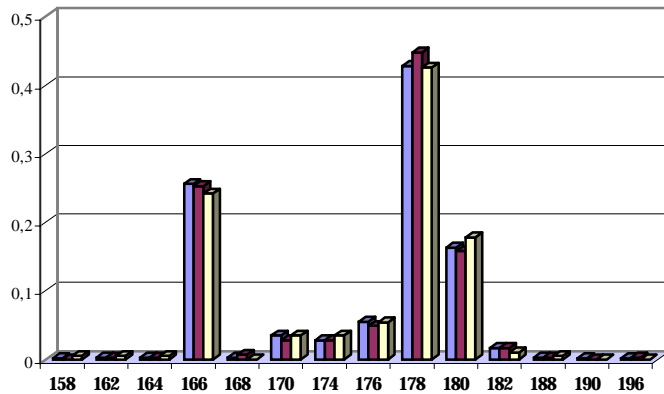


Figura IV.15. Distribució de les freqüències al·lèliques del STR GPIIIa (CT)<sub>n</sub> a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Els al·lèls s'anomenen en funció de la seva grandària en pb. Het. (unb.): heterozigositat “ unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les esmentades freqüències al·lèliques.

INTEGRINES PLAQUETÀRIES				
MARCADOR		TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
GPIIIa <i>TaqI</i>	<b>GENOTIPS:</b>			
	T1T1	0.199	0.159	0.228
	T1T2	0.404	0.434	0.366
	T2T2	0.397	0.407	0.406
	N	302	145	101
	Het. (unb.)	0.481	0.471	0.487
	HW (p exacta)	-	0.379	0.014★
	<b>AL·LELS:</b>			
T1	0.401	0.376	0.411	
T2	0.599	0.624	0.589	
GPIIb 9 pb INS/DEL	<b>GENOTIPS:</b>			
	I I	0.474	0.434	0.535
	I D	0.400	0.469	0.317
	D D	0.126	0.097	0.149
	N	302	145	101
	Het. (unb.)	0.440	0.444	0.428
	HW (p exacta)	-	0.575	0.018★
	<b>AL·LELS:</b>			
I	0.674	0.669	0.693	
D	0.326	0.331	0.307	

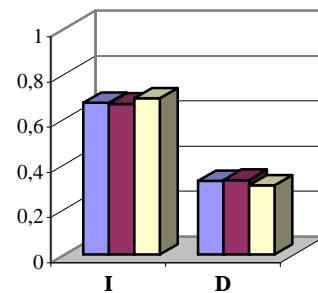
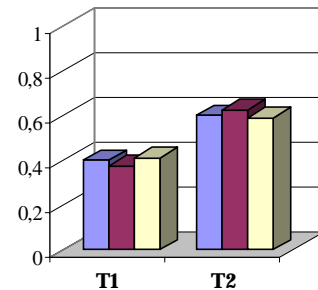


Figura IV.16. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes GPIIIa *TaqI* i GPIIb 9 pb INS/DEL a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Het. (unb.): heterozigositat “unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques dels esmentats marcadors. ★  $p < 0.05$ .

En referència a la variació en el gen PLAT, en el STR (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> es van detectar 14 al·lells diferents en el total dels individus que van cobrir el rang de mides comprés entre 104 pb i 136 pb (figura IV.17), aquest rang amplia en una repetició el marge inferior dels resultats obtinguts en aquest microsatèl·lit per Thomas i Drayna (1992) amb intervals de 106 a 128 pb i de 108 a 138 pb en 46 japonesos i en 35 nordamericans, respectivament. L'al·lel 104 no es va presentar en el grup de progenitors ni en el de fills afectats, en aquest darrer grup, a més, no es van presentar els al·lells 132, 134 i 136. Tots els al·lells es van diferenciar de l'al·lel anterior o posterior per una sola repetició (2 pb), excepte en el cas dels al·lells 106 i 114. En la distribució de les freqüències al·lèliques s'observa un sol pic



màxim a l'al·lel 120, amb una diferència considerable entre progenitors i fills afectats (0.571 i 0.636 respectivament). L'heterozigositat va ser de 0.493 per als pares i de 0.573 per als fills afectats, aquests valors resulten baixos respecte als obtinguts en l'estudi anteriorment citat (0.660 a japonesos i 0.690 nordamericans) i comparables als obtinguts per Tishkoff i col·laboradors (2000) en una mostra de 100 danesos (0.530). El grup de progenitors així com el de fills afectats es van mostrar en equilibri Hardy-Weinberg.

En la figura IV.18 es mostra la distribució de freqüències al·lèliques del STR  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  del gen **PLAT**. Es van detectar 17 al·lells diferents en el total dels individus, dels quals 16 es van presentar en els progenitors i només 12 es van presentar en els fills afectats. En el total dels individus, l'al·lel més petit va ser el 99 i el més gran va ser el 145, aquests resultats amplien el màxim rang d'al·lells detectat en poblacions d'origen europeu en el treball de Tishkoff i col·laboradors (2000) on l'al·lel més petit va ser el 105 i el més gran el 141 en una mostra de 100 danesos. El grup de fills afectats presenta una major heterozigositat (0.833) que el grup de pares (0.787), valors molt similars als detectats en poblacions europees en el mencionat treball (0.797 a danesos i 0.711 a finesos). En la majoria de casos, la diferència entre un al·lel determinat i l'immediatament anterior o posterior és d'una repetició (2 pb), encara que també s'observen dos salts de 4 pb, entre els al·lells 99 i 103 i entre els al·lells 105 i 109, i diferències de major grandària que, novament, es donen entre els al·lells més pesats i per tant amb major nombre de repeticions: un salt de 6 pb entre els al·lells 139 i 145 i un salt de 8 pb entre els al·lells 131 i 139. S'observa una distribució bimodal de les freqüències al·lèliques amb un pic màxim a l'al·lel 113 (0.345 a pares i 0.354 a fills afectats) i un segon pic menys freqüent en l'al·lel 127 (0.110 a pares i 0.120 a fills afectats). És destacable la diferència en la freqüència de l'al·lel 115 entre pares i fills afectats (0.110 i 0.057, respectivament). Tant el grup de progenitors com el de fills afectats es van mostrar en equilibri Hardy-Weinberg.

En el marcador **PLAT TPA25** (figura IV.19), l'al·lel més freqüent en el total dels individus va ser el D (0.425), amb un valor de 0.424 al grup de pares i de 0.426 al grup de fills afectats. Aquests resultats es troben dins del rang de freqüències obtingudes per al mencionat al·lel en les 2 poblacions peninsulars (0.412 a Bascos i 0.474 a Alpujarras). Els valors d'heterozigositat es van mostrar elevats (0.490 a pares i 0.491 a fills afectats), dins del marge observat per a aquest paràmetre a Bascos i Alpujarras. Tant els progenitors com els fills afectats es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg.

<b>PLAT (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>			
	<b>TOTAL</b>	<b>PARES</b>	<b>FILLS (CAI)</b>
<b>N</b>	286	136	96
<b>Het. (unb.)</b>	0.538	0.493	0.573
<b>HW (p ex.)</b>	-	0.206	0.857
<b>AL·LELS (pb):</b>			
<b>104</b>	0.002 ±0.001	-	-
<b>106</b>	0.005 ±0.003	0.007 ±0.005	0.005 ±0.004
<b>114</b>	0.003 ±0.002	0.004 ±0.004	0.005 ±0.006
<b>116</b>	0.005 ±0.003	0.007 ±0.005	0.005 ±0.005
<b>118</b>	0.066 ±0.011	0.051 ±0.012	0.062 ±0.019
<b>120</b>	0.621 ±0.021	0.571 ±0.026	0.636 ±0.035
<b>122</b>	0.207 ±0.017	0.202 ±0.024	0.193 ±0.028
<b>124</b>	0.037 ±0.008	0.026 ±0.010	0.042 ±0.014
<b>126</b>	0.007 ±0.004	0.007 ±0.006	0.010 ±0.007
<b>128</b>	0.019 ±0.006	0.022 ±0.008	0.021 ±0.010
<b>130</b>	0.021 ±0.007	0.022 ±0.009	0.021 ±0.010
<b>132</b>	0.003 ±0.002	0.007 ±0.006	-
<b>134</b>	0.002 ±0.002	0.037 ±0.004	-
<b>136</b>	0.002 ±0.002	0.037 ±0.004	-

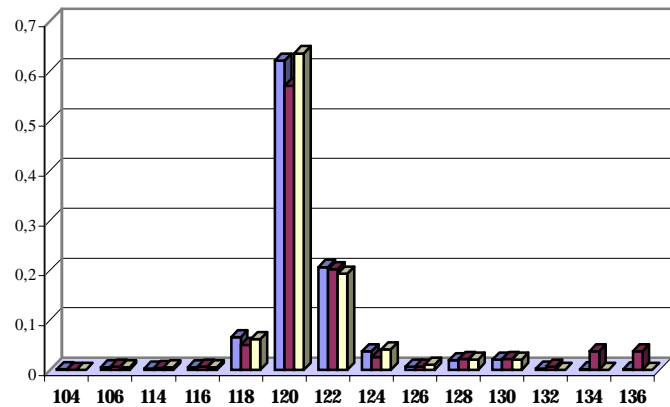


Figura IV.17. Distribució de les freqüències al·lèliques del STR PLAT (TG)<sub>14</sub> (TA)<sub>12</sub> a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Els al·lèls s'anomenen en funció de la seva grandària en pb. Het. (unb.): heterozigositat “ unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les esmentades freqüències al·lèliques.

PLAT (CA) <sub>15</sub> C(TC) <sub>10</sub>			
	TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
<b>N</b>	286	136	96
<b>Het. (unb.)</b>	0.797	0.787	0.833
<b>HW (p ex.)</b>	-	0.220	0.266
<b>AL-LELS (pb):</b>			
<b>99</b>	0.002 ±0.002	0.004 ±0.004	-
<b>103</b>	0.003 ±0.002	-	0.010 ±0.007
<b>105</b>	0.007 ±0.003	0.007 ±0.005	0.005 ±0.006
<b>109</b>	0.021 ±0.006	0.029 ±0.009	0.010 ±0.007
<b>111</b>	0.005 ±0.003	0.011 ±0.007	-
<b>113</b>	0.355 ±0.021	0.345 ±0.031	0.354 ±0.033
<b>115</b>	0.082 ±0.012	0.110 ±0.019	0.057 ±0.018
<b>117</b>	0.150 ±0.015	0.136 ±0.018	0.172 ±0.028
<b>119</b>	0.014 ±0.005	0.018 ±0.007	0.005 ±0.005
<b>121</b>	0.003 ±0.002	0.007 ±0.005	-
<b>123</b>	0.068 ±0.010	0.070 ±0.016	0.083 ±0.020
<b>125</b>	0.052 ±0.009	0.040 ±0.010	0.057 ±0.016
<b>127</b>	0.121 ±0.013	0.110 ±0.021	0.120 ±0.023
<b>129</b>	0.080 ±0.013	0.066 ±0.012	0.099 ±0.021
<b>131</b>	0.031 ±0.007	0.037 ±0.011	0.026 ±0.012
<b>139</b>	0.002 ±0.002	0.004 ±0.004	-
<b>145</b>	0.002 ±0.002	0.004 ±0.004	-

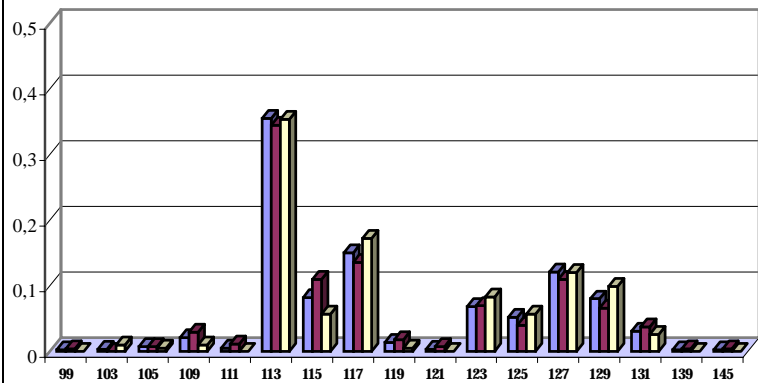


Figura IV.18. Distribució de les freqüències al·lèliques del STR PLAT (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Els al·lèls s'anomenen en funció de la seva grandària en pb. Het. (unb.): heterozigositat “ unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les esmentades freqüències al·lèliques.

PLAT TPA25			
	TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
<b>GENOTIPS:</b>			
<b>I I</b>	0.368	0.365	0.356
<b>I D</b>	0.414	0.421	0.436
<b>D D</b>	0.218	0.214	0.208
<b>N</b>	302	145	101
<b>Het. (unb.)</b>	0.490	0.490	0.491
<b>HW (p exacta)</b>	-	0.092	0.309
<b>AL·LELS:</b>			
<b>I</b>	0.575	0.576	0.574
<b>D</b>	0.425	0.424	0.426

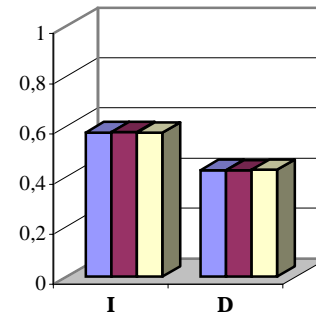


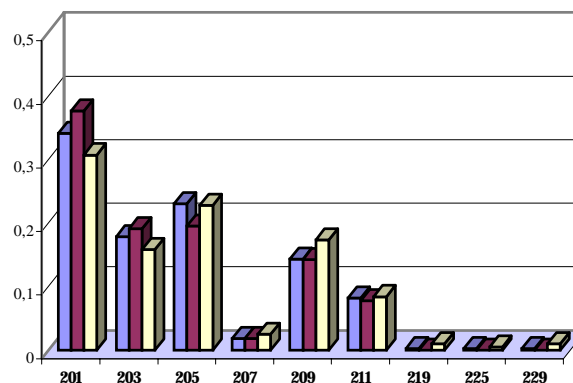
Figura IV.19. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme PLAT TPA25 a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Het. (unb.): heterozigositat “ unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l’equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques d’aquest marcador.

Els resultats obtinguts en els dos polimorfismes analitzats en el gen PAI-1 es mostren en la figura IV.20.

En el STR (CA)<sub>n</sub> es van detectar un total de 9 al·lells diferents amb grandàries compreses entre 201 pb i 229 pb. El grup de pares només va presentar 6 dels 9 al·lells (del 201 al 211), dins d’aquest interval la diferència en grandària d’un al·lel a l’immediat va ser sempre d’una repetició (2 pb). En els al·lells per sobre d’aquest interval, exclusius del grup de fills afectats, el pas d’un al·lel al següent en grandària va implicar més d’una repetició havent-hi 8 pb entre 211 i 219, 6 pb entre 219 i 225 i 4 pb entre 225 i 229. S’observa una distribució bimodal de les freqüències al·lèliques amb un primer màxim a l’al·lel 201, el més freqüent (0.376 a pares i 0.307 a fills afectats), i un segon màxim a l’al·lel 209 (0.142 a pares i 0.173 a fills afectats). Cal destacar l’existència de certes diferències entre els progenitors i els fills afectats en les freqüències de gairebé tots els al·lells. Els valors de diversitat van ser 0.761 i 0.791 per a pares i fills afectats respectivament. Ambdós grups es van adaptar a l’equilibri Hardy-Weinberg.

En el polimorfisme *Hind III*, de la mateixa manera que en les dues poblacions peninsulars analitzades, l'al·lel més comú va ser el Hd1, presentant-se amb unes freqüències de 0.613 en el total d'individus, 0.576 als pares i 0.644 als fills afectats. Aquests valors són de la mateixa magnitud que els obtinguts a Bascos (0.654) i a Alpujarras (0.596). De la mateixa manera que a les poblacions peninsulars analitzades, les heterozigositats mostrades van ser altes (0.490 per a pares i 0.461 per a fills afectats). Progenitors i fills afectats es van adaptar a l'equilibri Hardy-Weinberg.

<b>PAI-1 (CA)<sub>n</sub></b>			
	<b>TOTAL</b>	<b>PARES</b>	<b>FILLS (CAI)</b>
<b>N</b>	298	142	100
<b>Het. (unb.)</b>	0.772	0.761	0.791
<b>HW (p ex.)</b>	-	0.859	0.639
<b>AL·LELS (pb):</b>			
<b>201</b>	0.341 ±0.017	0.376 ±0.029	0.307 ±0.034
<b>203</b>	0.178 ±0.014	0.191 ±0.023	0.158 ±0.026
<b>205</b>	0.230 ±0.015	0.195 ±0.024	0.228 ±0.031
<b>207</b>	0.018 ±0.006	0.018 ±0.007	0.025 ±0.012
<b>209</b>	0.143 ±0.015	0.142 ±0.022	0.173 ±0.027
<b>211</b>	0.082 ±0.010	0.078 ±0.015	0.084 ±0.019
<b>219</b>	0.002 ±0.002	-	0.010 ±0.007
<b>225</b>	0.002 ±0.002	-	0.005 ±0.005
<b>229</b>	0.002 ±0.001	-	0.010 ±0.007



<b>PAI-1 Hind III</b>			
	<b>TOTAL</b>	<b>PARES</b>	<b>FILLS (CAI)</b>
<b>GENOTIPS:</b>			
<b>Hd1Hd1</b>	0.352	0.305	0.406
<b>Hd1Hd2</b>	0.522	0.542	0.475
<b>Hd2Hd2</b>	0.126	0.153	0.119
<b>N</b>	301	144	101
<b>Het. (unb.)</b>	0.475	0.490	0.461
<b>HW (p exacta)</b>	-	0.234	0.830
<b>AL·LELS:</b>			
<b>Hd1</b>	0.613	0.576	0.644
<b>Hd2</b>	0.378	0.424	0.356

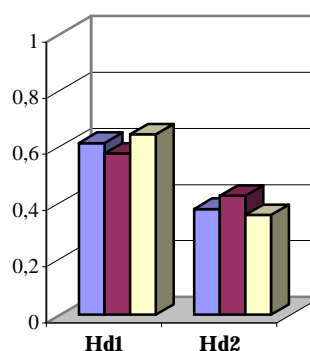


Figura IV.20. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes (CA)<sub>n</sub> i Hind III del gen PAI-1 a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Het. (unb.): heterozigotitat “ unbiased estimate”. HW (p exacta): significació del test exacte per a l'equilibri Hardy-Weinberg. A la dreta de la taula es mostra una representació gràfica de la distribució de les freqüències al·lèliques dels dos polimorfismes.

## B. VARIACIÓ HAPLOTÍPICA

En les taules entre la IV.47 i la IV.51 s'exposen les freqüències haplotípiques en les 5 regions cromosòmiques analitzades en la present tesi. Es tracta de freqüències reals (no estimades) ja que, ans al contrari que les mostres poblacionals, a la mostra de famílies nuclears el coneixement del genotip a cada *locus* en cada membre de la família permet la reconstrucció inequívoca, en un elevat percentatge d'individus, dels haplotips que formen aquests *loci*.

En el gen FVII (taula IV.47), va ser possible la reconstrucció inequívoca del 99.83 % dels haplotips. Es van detectar 4 haplotips diferents (I·H7, I·H6, D·H7 i D·H6), un més que els Bascos, que no havien presentat el I·H6, i un menys que Alpujarras que, a més, havia presentat l'haplotip D·H5. Com en el cas de les mostres poblacionals peninsulars, l'haplotip més freqüent va ser el D·H6, amb valors de 0.608 en el total dels individus, 0.615 en pares i 0.593 en fills afectats. Aquests valors són lleugerament inferiors als estimats per a Bascos (0.656) i Alpujarras (0.623). No es van observar diferències en la distribució de freqüències haplotípiques entre el grup de pares i el grup de fills afectats (figura IV.21). L'heterozigositat en el grup de progenitors (0.567) i en el grup de fills afectats (0.595) va superar lleugerament el valor d'aquest paràmetre a Alpujarras i en major grau al de Bascos.

En el cas del cluster gènic del fibrinogen (taula IV.48) va ser possible la reconstrucció inequívoca del 82.12 % dels haplotips. Van ser detectats un total de 7 haplotips diferents en el total dels individus (Hd1·B1·T2, Hd1·B2·T1, Hd1·B2·T2, Hd2·B1·T1, Hd2·B1·T2, Hd2·B2·T1, i Hd2·B2·T2), els mateixos que s'havien estimat a Alpujarras i tres més dels que s'havien estimat a Bascos. L'haplotip més freqüent va ser el Hd1·B2·T2 que es va presentar amb valors de 0.694 en el total dels individus, 0.651 en els progenitors i 0.652 en els fills afectats. Aquestes freqüències van ser properes a les estimades per al mateix haplotip a Bascos (0.657) i a Alpujarras (0.579). No es van observar diferències en la distribució dels haplotips més freqüents entre els progenitors i els fills afectats (figura IV.22). Els valors de diversitat també van ser similars als estimats en les 2 mostres poblacionals peninsulars, amb heterozigositats de 0.662 per als pares i de 0.643 per als fills afectats.

Dins del cluster gènic de les integrines plaquetàries es van poder reconstruir el 79.63 % dels haplotips. Es van detectar 28 haplotips diferents en el total dels individus, només els 14 que van presentar freqüències per sobre de 0.01 es mostren a la taula IV.49. L'haplotip més freqüent va ser el 178·T2·I (0.299 al total dels individus, 0.316 a pares i 0.289 a fills afectats) seguit del 166·T1·I (0.173 al total dels individus, 0.162 als progenitors i 0.171 a fills afectats), la resta d'haplotips van mostrar freqüències per sota de 0.1. No es van apreciar diferències en la distribució dels haplotips més freqüents entre els pares i els fills afectats (figura IV.23). La diversitat gènica va ser elevada, amb valors d'heterozigositat de 0.861 a progenitors i 0.887 a fills afectats.

En el gen PLAT es van poder reconstruir el 79.47 % dels haplotips. A la taula IV.50, només es mostren 19 haplotips, que van presentar una freqüència per sobre de 0.01, dels 57 que es van detectar en el total dels individus. Els haplotips més freqüents van ser el 120·113·I (0.250 en el total dels individus, 0.244 a pares i 0.267 als fills afectats) i en segon lloc l'haplotip 120·127·D amb valors de 0.104, 0.093 i 0.107 al total dels individus, progenitors i fills afectats, respectivament. A la figura IV.24 s'aprecien certes diferències en la distribució de freqüències haplotípiques entre el grup de pares i el de fills afectats, especialment en els haplotips 122·117·I, 120·129·D, 120·115·D i 122·113·I. Es van mostrar valors de diversitat elevats, amb heterozigositats de 0.876 a pares i 0.889 a fills afectats.

Finalment, en el gen PAI-1 van poder ser reconstruits el 86.42 % dels haplotips. Es van detectar 12 haplotips diferents en el total dels individus (taula IV.51), dels quals el grup de pares en va presentar 11. Els haplotips més freqüents van ser el 201·Hd2, amb valors de 0.272 en el total dels individus, 0.293 en els pares i 0.247 als fills afectats, seguit de 205·Hd1 amb valors de 0.234, 0.207 i 0.228 en el total dels individus, pares i fills afectats, respectivament. Es van apreciar certes diferències entre progenitors i fills afectats en la distribució d'alguns haplotips (figura IV.25), especialment per a 203·Hd1, 209·Hd1 i 211·Hd1. Els valors de diversitat en les freqüències haplotípiques van ser dels més elevats en el present treball, amb heterozigositats de 0.918 al grup de pares i 0.898 al grup de fills afectats.



HAPLOTIP	TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
I · H7	0.098	0.094	0.106
I · H6	0.060	0.055	0.058
D · H7	0.234	0.236	0.243
D · H6	0.608	0.615	0.593
<b>Heterozigositat</b>	0.577 ± 0.018	0.567 ± 0.027	0.595 ± 0.029

Taula IV.47. Freqüències haplotípiques inequívokes per al gen FVII en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

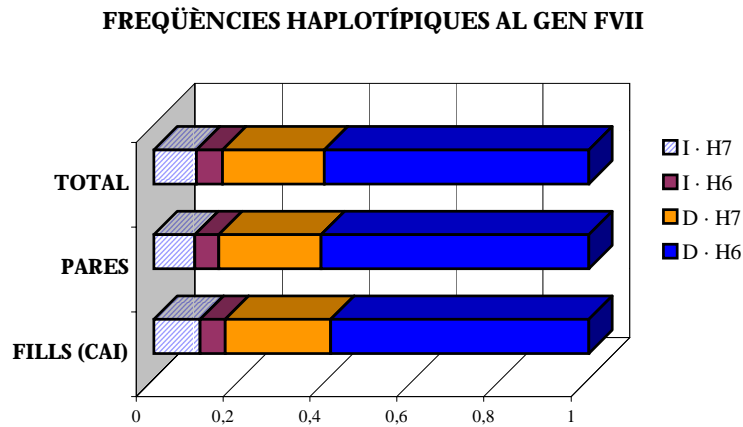


Figura IV.21. Representació de les freqüències haplotípiques inequívokes al gen FVII en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

HAPLOTIP	TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
Hd1 · B1 · T2	0.004	0.003	0.006
Hd1 · B2 · T1	0.125	0.182	0.195
Hd1 · B2 · T2	0.694	0.651	0.652
Hd2 · B1 · T1	0.016	0.010	0.006
Hd2 · B1 · T2	0.101	0.116	0.106
Hd2 · B2 · T1	0.004	0.006	0.006
Hd2 · B2 · T2	0.056	0.032	0.029
<b>Heterozigositat</b>	0.641 ± 0.0190	0.662 ± 0.0266	0.643 ± 0.0324

Taula IV.48. Freqüències haplotípiques inequívokes per al cluster gènic del fibrinogen en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

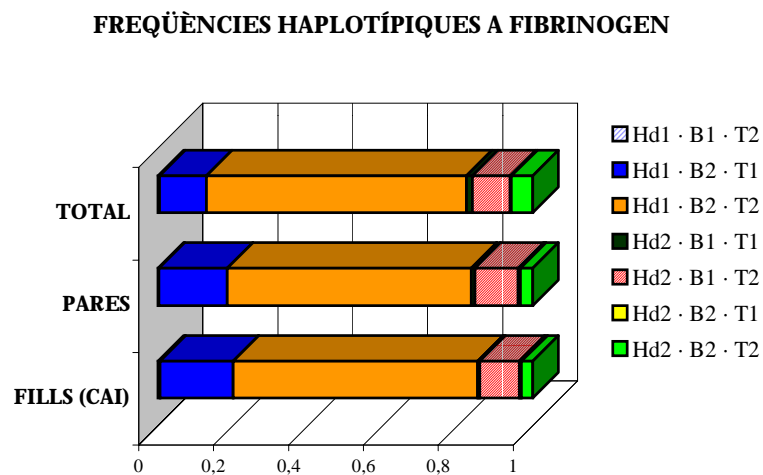


Figura IV.22. Representació de les freqüències haplotípiques inequívokes al cluster gènic del fibrinogen en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

HAPLOTIP	TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
<b>178 · T2 · I</b>	0.299	0.316	0.289
<b>166 · T1 · I</b>	0.173	0.162	0.171
<b>180 · T2 · I</b>	0.096	0.087	0.105
<b>178 · T2 · D</b>	0.091	0.099	0.086
<b>166 · T1 · D</b>	0.058	0.059	0.053
<b>178 · T1 · I</b>	0.050	0.047	0.066
<b>180 · T2 · D</b>	0.044	0.043	0.039
<b>176 · T1 · I</b>	0.027	0.020	0.026
<b>170 · T1 · D</b>	0.025	0.024	0.020
<b>170 · T1 · I</b>	0.017	0.016	0.013
<b>176 · T2 · D</b>	0.017	0.020	0.013
<b>178 · T1 · D</b>	0.015	0.020	0.013
<b>174 · T2 · I</b>	0.012	0.012	0.020
<b>166 · T2 · D</b>	0.010	0.008	0.013
<b>ALTRES</b>	0.066	0.067	0.073
<b>Heterozigositat</b>	0.874 ± 0.007	0.861 ± 0.011	0.887 ± 0.012

Taula IV.49. Freqüències haplotípiques inequívocues per al cluster gènic GPIIIa – GPIIb en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Només es mostren els haplotips amb freqüències per sobre de 0.01.

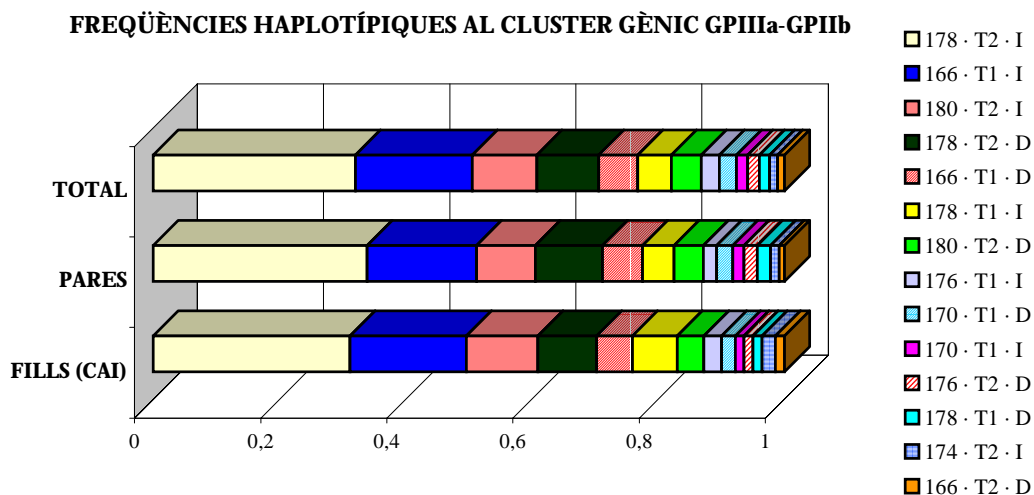


Figura IV.23. Representació de la distribució dels haplotips més freqüents al cluster gènic GPIIIa - GPIIb en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

HAPLOTIP	TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
120 · 113 · I	0.250	0.244	0.267
120 · 127 · D	0.104	0.093	0.107
122 · 117 · I	0.090	0.085	0.100
120 · 129 · D	0.073	0.062	0.087
120 · 115 · I	0.046	0.050	0.047
120 · 115 · D	0.035	0.043	0.020
122 · 113 · I	0.033	0.039	0.020
118 · 125 · D	0.029	0.027	0.027
118 · 113 · I	0.027	0.027	0.027
120 · 117 · I	0.025	0.023	0.040
120 · 131 · D	0.025	0.027	0.020
130 · 123 · D	0.021	0.019	0.027
120 · 123 · D	0.019	0.019	0.020
124 · 117 · I	0.019	0.016	0.020
128 · 123 · D	0.015	0.016	0.020
122 · 117 · D	0.013	0.012	0.013
124 · 113 · I	0.013	0.008	0.013
120 · 125 · D	0.010	0.012	0.013
122 · 119 · I	0.010	0.012	-
ALTRES	0.143	0.166	0.112
Heterozigositat	0.911 ± 0.008	0.918 ± 0.012	0.898 ± 0.016

Taula IV.50. Freqüències haplotípiques inequívokes per al gen *PLAT* en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. Només es mostren els haplotips amb freqüències per sobre de 0.01.

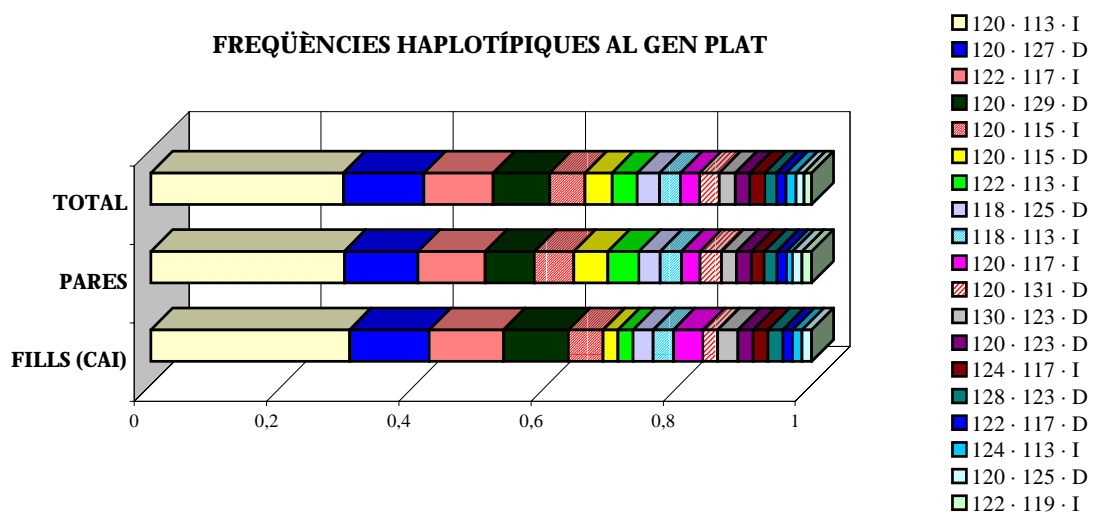


Figura IV.24. Representació de la distribució dels haplotips més freqüents al gen *PLAT* en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

HAPLOTIP	TOTAL	PARES	FILLS (CAI)
201 · Hd2	0.272	0.293	0.247
205 · Hd1	0.234	0.207	0.228
203 · Hd1	0.157	0.170	0.139
209 · Hd1	0.142	0.138	0.184
211 · Hd1	0.077	0.065	0.089
203 · Hd2	0.040	0.047	0.025
201 · Hd1	0.025	0.025	0.019
205 · Hd2	0.025	0.029	0.025
207 · Hd1	0.019	0.018	0.025
209 · Hd2	0.004	0.004	0.006
211 · Hd2	0.004	0.004	0.006
225 · Hd2	0.002	-	0.006
<b>Heterozigositat</b>	0.879 ± 0.005	0.876 ± 0.008	0.889 ± 0.008

Taula IV.51. Freqüències haplotípiques inequívokes per al gen PAI-1 en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

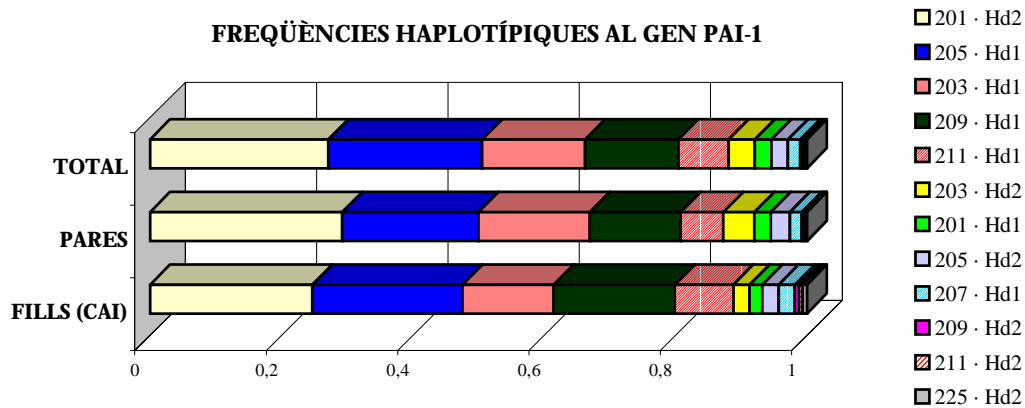


Figura IV.25. Representació de les freqüències haplotípiques inequívokes al gen PAI-1 en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

### C. ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

Els valors de desequilibri de lligament entre els marcadors analitzats dins de cadascuna de les 5 regions cromosòmiques estudiades en la mostra de famílies nuclears s'exposen en les taules de la IV.52 a la IV.56.

Dins del gen FVII (taula IV.52) es va detectar desequilibri de lligament significatiu entre els marcadors **-323 pb INS/DEL** i **HVR4** amb valors de  $D'$  de 0.449 ( $p = 0.0002$ ) a pares i de 0.455 ( $p = 0.0052$ ) a fills afectats. Aquests valors són propers als detectats en la mostra d'Alpujarras ( $D' = 0.560$ ,  $p = 0.0001$ ) i en una mostra de 182 individus procedents de Dinamarca i Països Baixos ( $D' = 0.37$ ,  $p = 0.004$ ) estudiada per de Maat i col·laboradors (1997).

		<b>HVR4</b>	
		<b><math>D'</math></b>	<b>p</b>
<b>PARES</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	0.449★	0.0002
<b>FILLS (CAI).</b>	<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	0.455★	0.0052

*Taula IV.52. Desequilibri de lligament al gen FVII en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.  $p$ : significació del test exacte de desequilibri de lligament. Els valors significatius s'indiquen amb el símbol ★.*

En el cluster gènic del fibrinogen (taula IV.53), es va detectar un desequilibri de lligament quasi total entre els marcadors **FGB Hind III** i **FGB Bcl I**, tant en els progenitors ( $D' = 0.915$ ,  $p < 0.0001$ ) com en els fills afectats ( $D' = 0.945$ ,  $p < 0.0001$ ) observant-se en ambdós casos una forta associació al·lèlica entre el al·lels Hd1 i B2. Aquest fet ja havia estat detectat en les mostres de Bascos ( $D' = 1$ ,  $p = 0.0001$ ) i d'Alpujarras ( $D' = 0.961$ ,  $p = 0.0001$ ) així com en l'estudi realitzat per Thomas i col·laboradors (1994) sobre una mostra de 302 caucasoides del Regne Unit ( $D' = 0.85$   $p < 0.001$ ). En la parella de polimorfismes **FGB Hind III-FGA Taq I** el test exacte va mostrar com a no significatiu el lligament detectat en els pares ( $D' = 0.494$   $p = 0.1928$ ), mentre que

en els fills afectats el lligament va ser de major magnitud i va resultar significatiu ( $D' = 0.592$   $p = 0.0368$ ). Per a la parella **FGB Bcl I-FGA Taq I**, el lligament mostrat pels progenitors va tornar a ser mostrat com a no significatiu a través del test exacte ( $D' = 0.610$   $p = 0.223$ ) essent de major magnitud i significatiu el mostrat pels fills afectats ( $D' = 0.754$   $p = 0.0295$ ). D'aquesta manera, els fills afectats mostren desequilibri de lligament significatiu al llarg de tot el fragment cromosòmic estudiat, encara que amb una magnitud inversament proporcional a la distància que separa els marcadors, tal i com calia esperar. Aquest patró de lligament és similar al detectat en Bascos i diferent al mostrat pels progenitors, Alpujarras i l'esmentada mostra de caucasoides del Regne Unit, que només mostren desequilibri de lligament significatiu dins del gen FGB però no entre els gens FGB i FGA.

		<b>Bcl I</b>		<b>Taq I</b>	
		<b>D'</b>	<b>p</b>	<b>D'</b>	<b>p</b>
<b>PARES</b>	<b>Hind III</b>	0.915★	< 0.0001	0.494	0.1928
<b>FILLS (CAI)</b>	<b>Hind III</b>	0.945★	< 0.0001	0.592★	0.0368
<b>PARES</b>	<b>Bcl I</b>			0.610	0.2230
<b>FILLS (CAI)</b>	<b>Bcl I</b>			0.754★	0.0295

Taula IV.53. Desequilibri de lligament al cluster gènic del fibrinogen en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. *p*: significació del test exacte de desequilibri de lligament. Els valors significatius s'indiquen amb el símbol ★.

En el cluster gènic de les integrines plaquetàries (taula IV.54), només es va detectar desequilibri de lligament significatiu entre el microsatèl·lit (**CT**)<sub>n</sub> i l'**RFLP Taq I**. Aquest lligament va ser d'una magnitud considerable tant a fills afectats ( $D' = 0.735$ ,  $p < 0.0001$ ) com a pares ( $D' = 0.658$ ,  $p < 0.0001$ ), mostrant-se cert grau d'associació al·lèlica entre els al·lèls 166 i T1. De la mateixa manera que en les 2 mostres peninsulars analitzades, no es va donar desequilibri de lligament entre qualsevol dels 2 *loci* situats al gen GPIIIa i la inserció/deleció del gen GPIIb. Aquest fet era d'esperar donada la gran distància que existeix entre aquest darrer marcador i els dos primers (unes 250 kilobases).

		<i>Taq I</i>		GPIIb 9 pb INS/DEL	
		D'	p	D'	p
<b>PARES</b>	<b>(CT)<sub>n</sub></b>	0.735★	< 0.0001	0.154	0.0897
<b>FILLS (CAI)</b>	<b>(CT)<sub>n</sub></b>	0.658★	< 0.0001	0.150	0.0923
<b>PARES</b>	<b><i>Taq I</i></b>			0.017	0.9918
<b>FILLS (CAI)</b>	<b><i>Taq I</i></b>			0.012	0.3755

Taula IV.54. Desequilibri de lligament al cluster gènic de les integrines plaquetàries en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. *p*: significació del test exacte de desequilibri de lligament. Els valors significatius s'indiquen amb el símbol ★.

En el gen PLAT (taula IV.55), pares i fills afectats van mostrar el mateix patró de lligament al llarg de la regió cromosòmica estudiada. Es va presentar desequilibri de lligament significatiu entre els microsatèl·lits (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> i (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> separats 9740 kilobases (D' = 0.593, p < 0.0001 a pares; i D' = 0.621, p < 0.0001 a fills afectats), i amb una magnitud similar entre el microsatèl·lit (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> i la inserció *Alu* TPA25 separats 12200 kilobases (D' = 0.540, p < 0.0001 a pares; i D' = 0.583, p < 0.0001 a fills afectats). No es va detectar desequilibri de lligament entre el microsatèl·lit (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> i la inserció *Alu* TPA25 que es troben separats 21940 kilobases. Aquest patró de lligament també va ésser observat per Tishkoff i col·laboradors (2000) en poblacions d'arreu del món.

		(CA) <sub>15</sub> C(TC) <sub>10</sub>		TPA25	
		D'	p	D'	p
<b>PARES</b>	<b>(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>	0.593★	< 0.0001	0.243	0.2374
<b>FILLS (CAI)</b>	<b>(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>	0.621★	< 0.0001	0.241	0.2577
<b>PARES</b>	<b>(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b>			0.540★	< 0.0001
<b>FILLS (CAI)</b>	<b>(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b>			0.583★	< 0.0001

Taula IV.55. Desequilibri de lligament al gen PLAT en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI. *p*: significació del test exacte de desequilibri de lligament. Els valors significatius s'indiquen amb el símbol ★.



Finalment, en el gen PAI-1 (taula IV.56) s'observa un desequilibri de lligament considerable entre el microsatèl·lit  $(CA)_n$  i l'RFLP *Hind III* tant a pares ( $D' = 0.740$ ,  $p < 0.0001$ ) com a fills afectats ( $D' = 0.770$ ,  $p < 0.0001$ ), amb associacions al·lèliques dels al·lèls 205, 203 i 209 del microsatèl·lit amb Hd1, i entre els al·lèls 201 i Hd2, en els dos grups. Aquest marcat desequilibri de lligament observat entre aquest dos marcadors també va ser detectat per Dawson i col·laboradors (1991) en una mostra de 145 pacients afectats d'infart de miocardi i 95 controls originaris de Suècia. En aquest treball l'al·lel Hd1 també es va associar preferiblement als al·lèls de major tamany del microsatèl·lit  $(CA)_n$ .

		<i>Hind III</i>	
		$D'$	$p$
<b>PARES</b>	$(CA)_n$	0.740★	< 0.0001
<b>FILLS (CAI).</b>	$(CA)_n$	0.770★	< 0.0001

Taula IV.56. Desequilibri de lligament al gen PAI-1 en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.  $p$ : significació del test exacte de desequilibri de lligament. Els valors significatius s'indiquen amb el símbol ★.

## 2.2. ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE LA TRANSMISSIÓ (TDT)

La transmissió diferencial de pares a fills afectats per CAI d' al·lells i combinacions haplotípiques dels mateixos en les 5 regions gèniques estudiades ha estat investigada mitjançant el test TDT amb la finalitat de detectar associacions significatives indicadores de risc genètic per a la CAI dins la mostra de famílies nuclears.

Amb la finalitat d'utilitzar la major quantitat possible d'informació les anàlisis han estat efectuades mitjançant el paquet estadístic TRANSMIT (Clayton, 1999a), que genera una estimació dels haplotips més probables en aquells casos en que la determinació de l'haplotip no és inequívoca. Totes les associacions estadísticament significatives detectades d'aquesta manera van ser recalculades, per a la seva confirmació, de forma manual aplicant la fórmula exposada a l'apartat C del punt 2.5. de la introducció, utilitzant únicament les transmissions inequívocues observades en el conjunt de les famílies examinades.

Els resultats obtinguts en les 5 regions gèniques estudiades indiquen la presència d'associacions genètiques amb la CAI per als gens implicats en la fibrinolisi (PLAT i PAI-1), mentre que en el gen FVII i els clusters gènics del fibrinogen i les integrines plaquetàries no es van detectar associacions estadísticament significatives. Amb la finalitat d'una major simplicitat i dinamisme en l'exposició, els resultats de les anàlisis en aquestes tres darreres regions cromosòmiques son exposats en l'annex 4.

*Associacions detectades en el gen de l'activador tissular del plasminogen (PLAT).* En una primera aproximació, donat que l'elevat nombre d'al·lells dels dos microsatèl·lits estudiats (14 per a (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> i 17 per a (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>) implicaria una pèrdua de poder estadístic a l'hora de realitzar les anàlisis pel baix nombre d'individus portadors de molts dels mencionats al·lells, el test es va aplicar només a aquells al·lells individuals que presenten una freqüència mínima del 10%, ja sigui en pares o en fills afectats, i a les combinacions haplotípiques dels mateixos, ja siguin totals (tenint en compte els tres marcadors) o parcials (considerant els 3 marcadors agrupats 2 a 2). D'aquesta manera, per a (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub> es van considerar els al·lells 120 i 122 i per a (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> els al·lells 113, 115, 117 i 127. Els resultats dels TDTs calculats sota aquest criteri es mostren a la taula IV.57.

Les anàlisis en les que es van considerar els al·lels de cada locus en solitari (primera secció de la taula IV.57), van mostrar una forta associació entre l'al·lel 115 del STR **(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>** i la malaltia. En aquest al·lel considerat de forma individual, que mostra una freqüència superior al 8% en les 84 famílies utilitzades per a aquesta anàlisi, s'observen 8 transmissions enfront de les 14.12 que s'esperarien sota el model mendelià, amb un valor de l'estadístic TDT de 7.30 que sota una distribució  $\chi^2$  amb un grau de llibertat implica una significació de 0.0079. Aquest estadístic es presenta acompanyat per un valor de Var (O-E) de 5.12 que en opinió de l'autor del programa TRANSMIT justifica la fiabilitat del TDT aplicat ja que és superior a 2.5, valor mínim recomanat per a aquest paràmetre ja que implica un mínim de 10 transmissions informatives (Clayton, 1999a). El test exacte també va mostrar un valor p molt baix ( $p = 0.0045$ ). Repetint el test de forma manual, fet que obvia la pèrdua de poder estadístic que implica l'inferència dels genotips dels pares absents que porta a terme pel programa TRANSMIT per tal d'utilitzar el major nombre possible de famílies, va permetre observar que d'un total de 11 pares informatius (heterozigots) només es va donar una transmissió inequívoca de l'al·lel 115 en front de 10 no transmissions als fills malalts, en lloc de les 5.5 transmissions que s'esperarien sota el model mendelià. El test TDT corresponent a aquests recomptes (proper a una distribució  $\chi^2$  amb un grau de llibertat) va ser de 7.36 amb una significació de 0.0066, valors molt propers als obtinguts pel programa.

Les anàlisis en les que es van considerar els haplotips parcials formats pels tres marcadors considerats 2 a 2 (segona secció de la taula IV.57), es va detectar una altra associació en la que també intervenia l'al·lel 115 del STR **(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>** en forma d'haplotip parcial amb la inserció *Alu* **TPA25** (haplotip 115·I). Aquest haplotip, que es va presentar en una freqüència propera al 5% en les 85 famílies utilitzades en el test, va mostrar 4.19 transmissions observades en front de 8.10 esperades. En aquest cas, malgrat el valor de Var (O-E) és prou alt (3.25), l'associació es més feble, amb un valor de l'estadístic TDT de 4.70 ( $p = 0.0301$ ,  $\chi^2$  1 g.ll.) i amb una significació de 0.0310 per al test exacte. De fet, la realització d'aquest test de forma manual fa que perdi significació ja que només es poden trobar 8 pares heterozigots (valor inferior a 10 que anul·la la fiabilitat del test) per a aquesta combinació haplotípica, observant-se 2 transmissions i 6 no transmissions; amb aquests paràmetres el valor de l'estadístic TDT va ser 2 ( $p = 0.1572$ ,  $\chi^2$  1 g.ll.). Un altre haplotip parcial en el que intervé l'al·lel 115 de **(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>**, en aquest cas conjuntament amb l'al·lel 120 de **(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub>** (haplotip 120·115), va mostrar un valor de l'estadístic TDT dins de la significació (TDT = 6.26,  $p = 0.01234$ ,  $\chi^2$  1 g.ll.) recolçat per

un valor de Var (O-E) elevat (4.329), malgrat tot, el test exacte no va resultar significatiu. També es va detectar un valor  $p$  significatiu, encara que ajustat, per al test exacte ( $p = 0.0499$ ) en un altre haplotip parcial format pels 2 STR, concretament el que conté els al·lells 122·113. Aquest haplotip es va presentar en una freqüència del 4.2% en les 86 famílies incloses en el test, observant-se 4.17 transmissions de les 7.29 que s'esperaven sota el model mendelià. El valor de Var (O-E) va ser de 2.576 trobant-se al límit del recomanat per l'autor del programa de cara a la fiabilitat del test. L'estadístic TDT va adquirir un valor (3.779) al límit de la significació ( $p = 0.05189$ ,  $\chi^2$  1 g.ll.). El càlcul manual d'aquest test només va permetre un recompte de 9 transmissions inequívocues de l'esmentat haplotip, en les que l'esmentat haplotip va ser transmés 4 cops enfront a 5 que no ho va ser. Sota aquestes condicions l'estadístic TDT va prendre un valor de 0.111, no resultant significatiu ( $p = 0.7388$ ,  $\chi^2$  1 g.ll.). Aquest resultat, conjuntament amb l'ajustada significació obtinguda quan el test és realitzat pel programa fa que l'associació detectada en l'haplotip 122·113 no pugui ésser considerada com a autèntica.

Finalment, en la realització dels tests sobre els haplotips totals (última secció de la taula IV.57) no es va detectar cap associació significativa. Cal destacar però, que novament un haplotip que contenia l'al·lel 115 de **(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>**, el 120·115-I, va mostrar un valor de l'estadístic TDT (3.634) proper a la significació ( $p = 0.05699$ ,  $\chi^2$  1 g.ll.). Malgrat que el test exacte no va ser significatiu ( $p = 0.1983$ ) va mostrar un número de transmissions (4.16) inferior al que s'esperaria sota el model mendelià (7.48).

Les anàlisis d'associació genètica en les que s'utilitzen marcadors de tipus microsatèl·lit, s'enfronten al ja comentat problema de la pèrdua de poder estadístic que representa l'elevat nombre d'al·lells que normalment presenta aquest tipus de marcador. Aquest problema metodològic es sol resoldre fent agrupacions d'al·lells en funció de la seva grandària, els límits de les quals depenen del criteri dels investigadors (Regnes et al. 1992, Mitsumori et al. 1999). En base als resultats obtinguts en els TDTs realitzats sobre els al·lells més freqüents i les seves combinacions haplotípiques totals o parcials ja exposats, es va decidir repetir les anàlisis fent agrupacions, utilitzant tots els al·lells, en els dos STRs. D'aquesta manera, donada la forta associació detectada en l'al·lel 115 del STR **(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>**, en aquest microsatèl·lit es van fer tres grups: al·lells de mida inferior a 115 pb (99 pb-113pb); al·lel 115 considerat individualment; i al·lells de mida superior a 115 pb (117 pb-145 pb). Per altra banda, ja que no va ser detectada cap associació important dins del STR **(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub>** es va decidir agrupar-lo de forma arbitrària en dos grups limitats pels 2 al·lells més freqüents: al·lells entre 104 i 120 pb i al·lells entre 122 i 136 pb.

Sota aquests criteris d'agrupació, quan es va considerar cada STR de forma individual (primera secció de la taula IV.58) en el microsatèl·lit  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  es va tornar a detectar l'associació amb l'al·lel 115. En aquest cas la significació del test exacte va ser superior ( $p = 0.0029$ ) amb un valor de l'estadístic TDT de 7.59 que també implica una significació lleugerament superior a la mostrada abans d'agrupar els al·lells ( $p = 0.0058$ ,  $\chi^2$  1 g.ll.). El test global per a tot el *locus* també va resultar significatiu ( $p$  exacta = 0.0141). No es va detectar cap associació en el microsatèl·lit  $(TG)_{14}(TA)_{12}$ .

En els TDTs realitzats sobre els haplotips parcials (segona secció de la taula IV.58) es va tornar a detectar l'associació amb l'haplotip 115·I (2·1 de taula IV.58), encara que es va mostrar més feble, ja que va presentar un valor  $p$  del test exacte de 0.0408. El valor de l'estadístic TDT així com la seva significació van ser lleugerament inferiors als mostrats anteriorment a l'agrupació (4.17;  $p = 0.0411$   $\chi^2$  1 g.ll.). D'altra banda, cal destacar el valor de l'estadístic TDT (6.71) en la combinació haplotípica (104-120)·115 (1·2 a la taula IV.58) implica una elevada significació ( $p = 0.0096$   $\chi^2$  1 g.ll.) que, sorprenentment, no és mostrada pel test exacte ( $p = 0.122$ ). També la combinació al·lèlica (104-120)·(117-145) (1·3 a la taula IV.58) va mostrar un valor de l'estadístic TDT dins de la significació (4.427,  $p = 0.0353$   $\chi^2$  1 g.ll.) amb un valor  $p$  per al test exacte fora de la significació (0.1645).

Finalment, en les anàlisis realitzades sobre els haplotips totals (tercera secció de la taula IV.58) no es va detectar cap associació significativa, encara que la combinació haplotípica (104-120)·115·I (1·2·I a la taula IV.58) va mostrar un valor de l'estadístic TDT proper a la significació (3.40,  $p = 0.0649$   $\chi^2$  1 g.ll.) de la mateixa manera que ho havia fet l'haplotip 120·115·I anteriorment a l'agrupació.

En conclusió, el que s'observa dins del gen PLAT és una forta associació amb la malaltia de l'al·lel 115 del STR  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  que es troba present en totes les associacions significatives detectades al gen PLAT, exceptuant l'associació detectada per a l'haplotip parcial 122·113 amb una significació estadística molt ajustada i segurament espúria. L'associació amb l'al·lel 115 és màxima quan aquest es considera en solitari i es dilueix en les combinacions haplotípiques que el contenen. Aquest al·lel protegiria contra la CAI ja que sempre és transmés als fills afectats en menys freqüència de la que s'espera sota el model mendelià, essent 0.1 el risc relatiu que implica l'al·lel 155, i 0.333 el risc associat a l'haplotip 115·I.

Marcadors	N	Al·lel / Haplotip	Freqüència	Transmissions Observades	Transmissions Esperades	Var (O-E)	Estadístic TDT ( $\chi^2$ )	g. ll.	p exacta	
<b>(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>	86	120	0.6254	116	111.01	17.246	1.4440	1	0.2213	
	87	122	0.2073	33	37.296	10.981	1.6810	1	0.1977	
	85	Global					11.818		0.6951	
<b>(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b>	83	113	0.3511	60	59.010	14.916	0.0656	1	0.7942	
	84	<b>115</b>	<b>0.0838</b>	<b>8</b>	<b>14.120</b>	<b>5.1241</b>	<b>7.3051</b>	<b>1</b>	<b>0.0045</b>	
	85	117	0.1398	28	24.340	9.4959	1.4119	1	0.2200	
	85	127	0.1319	23	23.496	8.4565	0.0291	1	0.8671	
	79	Global					23.336	15	0.392	
<b>·TPA25</b>	86	I	0.5755	100.00	101.26	15.600	0.1013	1	0.7488	
		D	0.4245	78.00	76.740	15.600	0.1013	1	0.7488	
		Global					0.1013	1	0.7488	
<b>·(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>	88	120·113	0.2698	51.697	47.203	11.143	1.8118	1	0.1972	
	86	120·115	0.0750	7.7591	12.965	4.3290	6.2606	1	0.1285	
	87	120·117	0.0312	7.6306	5.4673	2.2114	2.1162	1	0.1564	
	87	120·127	0.0993	21.878	18.410	6.4006	1.8792	1	0.1350	
	<b>·(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b>	86	<b>122·113</b>	<b>0.0421</b>	<b>4.1665</b>	<b>7.2869</b>	<b>2.5765</b>	<b>3.7790</b>	<b>1</b>	<b>0.0499</b>
		88	122·117	0.1017	19.564	18.519	6.7774	0.1612	1	0.6671
			Global					5.9580	3	0.1153
<b>·(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>	85	120·I	0.3479	64.616	60.735	13.236	1.1379	1	0.2908	
	85	120·D	0.2763	50.384	48.861	12.494	0.1857	1	0.6467	
	86	122·I	0.1700	25.615	29.922	9.6836	1.9156	1	0.1652	
	<b>·TPA25</b>	86	122·D	0.0392	6.3853	7.3012	2.6568	0.3157	1	0.6238
			Global					2.5585	3	0.5197
<b>·(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b>	84	113·I	0.3435	60.288	59.196	15.524	0.0767	1	0.7599	
	85	<b>115·I</b>	<b>0.0474</b>	<b>4.1904</b>	<b>8.1035</b>	<b>3.2557</b>	<b>4.7033</b>	<b>1</b>	<b>0.0310</b>	
	85	115·D	0.0401	4.5602	6.8569	2.2222	2.3736	1	0.1100	
	<b>·TPA25</b>	86	117·I	0.1278	25.048	22.643	8.4894	0.6818	1	0.4034
		86	117·D	0.0147	3.2796	2.5544	0.9829	0.5350	1	0.4830
		86	127·D	0.1231	21.49	22.332	7.5601	0.0937	1	0.7537
		Global					0.1443	3	0.9852	
<b>·(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b>	83	120·113·I	0.2591	48.181	44.396	11.851	1.2085	1	0.3448	
	84	120·115·I	0.0443	4.1628	7.4855	3.0381	3.6338	1	0.1983	
	84	120·115·D	0.0322	3.5561	5.4483	1.6949	2.1124	1	0.2663	
	85	120·117·I	0.0319	7.7148	5.4730	2.1786	2.0306	1	0.1217	
	<b>·(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b>	85	120·127·D	0.0949	19.899	17.288	5.9634	1.1426	1	0.3243
		84	122·113·I	0.0455	5.0881	7.6877	2.9683	2.2766	1	1
		<b>·TPA25</b>	88	122·117·I	0.0902	16.655	16.125	6.2189	0.0451	1
	88		122·117·D	0.0132	1.8361	2.2971	0.8615	0.2467	1	0.6164
		Global					8.3436	7	0.3114	

Taula IV.57. Resultats del test de desequilibri de la transmissió (TDT) en al·lels i combinacions haplotípiques dels marcadors estudiats en el gen PLAT. En negreta i ombrejades s'indiquen les associacions significatives per al test exacte. N: nombre de famílies incloses en el test; Var (O-E): variança de les transmissions observades menys les esperades; g.ll.: graus de llibertat; p exacta: significació del test exacte.

Marcadors	N	Al·lel / Haplotip	Freqüència	Transmissions Observades	Transmissions Esperades	Var (O-E)	Estadístic TDT ( $\chi^2$ )	g. ll.	p exacta
<b>(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b> (104-120) pb = 1 (122-136) pb = 2	86	1	0.7038	131	124.6	16.060	2.5466	1	0.0965
		2	0.2962	47	53.396	16.060	2.5466	1	0.0965
		Global					2.5466	1	0.0965
<b>(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b> (99-113) pb = 1 115 pb = 2 (117- 145) pb = 3	81	1	0.3824	64.00	62.71	14.961	0.1117	1	0.7266
		2	<b>0.0876</b>	<b>8.00</b>	<b>14.24</b>	<b>5.1202</b>	<b>7.5937</b>	<b>1</b>	<b>0.0029</b>
		3	0.5300	94.00	89.06	14.949	1.6344	1	0.1913
		Global					<b>7.8393</b>	<b>2</b>	<b>0.0141</b>
<b>·(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b> (104-120) pb = 1 (122-136) pb = 2  <b>·(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b> (99-113) pb = 1 115 pb = 2 (117- 145) pb = 3	83	1-1	0.3268	59.871	55.681	13.124	1.3373	1	0.3138
		2-1	0.0612	7.2401	10.233	2.9512	3.0349	1	0.2065
		1-2	0.0788	7.7679	13.161	4.3331	6.7135	1	0.1220
		2-2	0.0070	0	1.1721	0.4826	2.8462	1	0.2553
		1-3	0.3050	60.361	52.633	13.493	4.4267	1	0.1645
		2-3	0.2210	36.76	39.119	12.252	0.4543	1	0.5172
		Global					13.726	5	0.1871
<b>·(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b> (104-120) pb = 1 (122-136) pb = 2  <b>· TPA25</b>	85	1-I	0.3859	69.738	67.267	14.655	0.4164	1	0.5284
		2-I	0.1866	29.262	32.407	9.7234	1.0171	1	0.3191
		1-D	0.3188	60.262	56.126	14.083	1.2147	1	0.2644
		2-D	0.1087	16.738	20.199	7.4467	1.6092	1	0.1933
		Global					2.9148	3	0.4112
<b>·(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b> (99-113) pb = 1 115 pb = 2 (117- 145) pb = 3  <b>· TPA25</b>	83	1-I	0.3705	65.42	62.98	16.088	0.3704	1	0.5042
		2-I	<b>0.0487</b>	<b>4.35</b>	<b>8.14</b>	<b>3.4355</b>	<b>4.1717</b>	<b>1</b>	<b>0.0408</b>
		3-I	0.1518	25.23	25.89	8.7998	0.0503	1	0.8171
		1-D	0.0178	1.24	2.97	1.2283	2.4455	1	0.1202
		2-D	0.0404	4.82	6.74	2.2288	1.6658	1	0.1854
		3-D	0.3708	70.95	65.28	13.617	2.3609	1	0.1168
		Global					9.6631	5	0.0775
<b>·(TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub></b> (104-120) pb = 1 (122-136) pb = 2  <b>·(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub></b> (99-113) pb = 1 115 pb = 2 (117- 145) pb = 3  <b>· TPA25</b>	82	1-1-I	0.3127	57.457	52.757	13.755	1.6057	1	0.2799
		2-1-I	0.0548	7.1547	9.0477	2.9814	1.2020	1	0.3347
		1-2-I	0.0453	4.1969	7.4831	3.1709	3.4058	1	0.2087
		2-2-I	0.0033	0	0.5476	0.2439	1.2291	1	0.2580
		1-3-I	0.0342	7.1429	5.6700	2.3232	0.9339	1	0.3840
		2-3-I	0.1190	18.049	20.154	6.7725	0.6548	1	0.4608
		1-1-D	0.0114	1.0354	1.8879	0.4902	1.4827	1	0.3339
		2-1-D	0.0068	0.19425	1.1223	0.2075	4.1511	1	0.3040
		1-2-D	0.0327	4.0186	5.4130	1.7469	1.1130	1	0.3631
		2-2-D	0.0043	0	0.7206	0.2295	2.2626	1	0.2949
		1-3-D	0.2758	53.149	47.156	12.811	2.8036	1	0.2174
		2-3-D	0.0994	17.603	18.040	7.2113	0.0264	1	0.8630
		Global							11

Taula IV.58. Resultats del test de desequilibri de la transmissió (TDT) en les agrupacions d'al·lells i combinacions haplotípiques de les mateixes en els marcadors estudiats en el gen PLAT.

*Associacions detectades en el gen de l'inhibidor de l'activador tissular del plasminogen-1 (PAI-1).* En una primera aproximació, i per les mateixes raons que en els dos microsatèl·lits del gen PLAT, per al STR (CA)<sub>n</sub> els TDTs només van ser calculats en aquells al·lells amb una freqüència mínima del 10% en el subgrup de pares o en el de fills afectats (al·lells 201, 203, 205 i 209) i en les combinacions haplotípiques dels mateixos amb els al·lells del marcador *HindIII*. Els resultats són exposats a la primera secció de la taula IV.59. No es van detectar associacions significatives en cap dels dos marcadors estudiats en el gen PAI-1 ni en les seves combinacions haplotípiques. Malgrat tot, cal resaltar que l'al·lel 209 del STR (CA)<sub>n</sub>, amb una freqüència propera al 16% en les 78 famílies incloses en el test, va mostrar un valor de l'estadístic TDT proper a la significació (3.70,  $p = 0.0543 \chi^2$  1 g.ll.), mostrant 31 transmissions contra les 25.2 que s'esperaven sota el model mendelià. A més, un haplotip en el que participa aquest al·lel, el 209·Hd1, també va mostrar un valor de l'estadístic TDT proper a la significació (3.72,  $p = 0.0536 \chi^2$  1 g.ll.) molt similar a l'obtingut en considerar l'al·lel 209 en solitari. L'haplotip 209·Hd1, amb una freqüència superior al 15% en les 78 famílies considerades en aquesta anàlisi, també va mostrar un número de transmissions (30) superior al que s'esperava sota el model mendelià (24.3).

D'altra banda es van calcular TDTs utilitzant tots els al·lells del microsatèl·lit (CA)<sub>n</sub> fent una agrupació dels mateixos en funció de la seva grandària i freqüència. D'aquesta manera van resultar 4 grups, 3 dels quals estaven formats pels al·lells 201, 203 i 205 considerats individualment, i el quart, format pels al·lells de major grandària en nombre de repeticions, va incloure els al·lells compresos entre 207 i 229 pb. Els resultats d'aquestes anàlisis es mostren a la segona secció de la taula IV.59.

Sota aquest criteri d'agrupació, en considerar el marcador (CA)<sub>n</sub> en solitari es va detectar una associació significativa entre el grup d'al·lells de major grandària (207-229) i la CAI. Aquest grup d'al·lells es va presentar en una freqüència del 25.6% en les 80 famílies incloses en aquest test, amb 51 transmissions observades respecte a les 41.65 que s'esperarien sota el model mendelià. L'estadístic TDT (5.89,  $p = 0.01518, \chi^2$  1 g.ll) va venir recolçat per un molt elevat valor de Var (O-E) (14.82), que assegura una elevada fiabilitat d'aquest resultat i, a més, per un valor p força baix del test exacte (0.019). Aquest marcador considerat en la seva globalitat va mostrar un valor de TDT de 6.96 proper a la significació ( $p = 0.0731, \chi^2$  3 g.ll;  $p$  exacta = 0.0552). L'associació de la globalitat del *locus* amb la malaltia vindria recolçada pel càlcul manual de l'estadístic TDT que va prendre un valor de 3.93 per al grup d'al·lells compresos entre 207 i 229 pb, amb 28



transmissions enfront a 15 no transmissions essent menys significatiu que el test realitzat pel programa ( $p = 0.0474$ ,  $\chi^2$  1 g.l), i que va detectar associacions que no van ser detectades pel programa, mostrant-se significatiu per a l'al·lel 203 (4.235,  $p = 0.0395$ ,  $\chi^2$  1 g.l), amb 11 transmissions enfront a 23 no transmissions, i per a l'al·lel 205 (5.12,  $p = 0.0236$ ,  $\chi^2$  1 g.l) amb 10 transmissions enfront a 23 no transmissions.

Quan es van considerar les combinacions haplotípiques dels dos marcadors estudiats dins del gen PAI-1 no es va detectar cap associació significativa amb la CAI. Malgrat tot, una combinació haplotípica de la que formava part el grup d'al·lells 207-229 del STR (CA)<sub>n</sub>, l'haplotip (207-229)·Hd1 (4·Hd1 de la taula IV.59), va assolir un valor significatiu de l'estadístic TDT (5.47,  $p = 0.019$ ,  $\chi^2$  1 g.l) que va ser recolzat per un molt elevat valor de Var(O-E) (14.28), encara que el test exacte ( $p = 0.1109$ ) va fer rebutjar el resultat com a estadísticament significatiu. Aquest haplotip, que presenta una freqüència del 24.1% en les 80 famílies incloses en el test, va mostrar 48 transmissions enfront a les 39.16 que s'esperarien sota el model mendelià.

En base als resultats obtinguts, el grup d'al·lells de major tamany (207-229 pb) del STR (CA)<sub>n</sub> podrien predisposar cap a la CAI ja que es transmeten als fills afectats amb major freqüència del que s'esperaria sota el model mendelià i amb un increment del risc relatiu associat (1.86). D'altra banda, els al·lells 203 i 205 tindrien un paper protector contra la CAI ja que es transmeten als fills afectats amb menys freqüència de l'esperada sota el model mendelià i amb uns riscos relatius associats de 0.48 i 0.43, respectivament.

Marcadors	N	Al·lel / Haplotip	Freqüència	Transmissions Observades	Transmissions Esperades	Var (O-E)	Estadístic TDT ( $\chi^2$ )	g. ll.	p exacta	
• (CA) <sub>n</sub>	78	201	0.3283	52	53.152	18.637	0.0712	1	0.7602	
		203	0.2033	28	32.802	12.041	1.9152	1	0.2645	
		205	0.2172	34	36.265	11.851	0.4330	1	0.5025	
		209	0.1579	31	25.200	9.0861	3.7021	1	0.1596	
		Global							5	0.2519
• <i>Hind</i> III	87	Hd1	0.6151	115.00	110.59	20.329	0.9548	1	0.289	
		Hd2	0.3849	65.00	69.41	20.329	0.9548	1	0.289	
		Global							1	0.289
• (CA) <sub>n</sub> • <i>Hind</i> III	78	201·Hd1	0.0107	0.0858	1.7117	0.7675	3.4436	1	0.1906	
		203·Hd1	0.1650	24.467	26.811	11.083	0.4957	1	0.4724	
		205·Hd1	0.1941	32.447	32.421	10.794	6.33x10 <sup>-5</sup>	1	0.9922	
		209·Hd1	0.1521	30	24.307	8.7018	3.7242	1	0.1597	
		201·Hd2	0.3180	51.727	51.255	18.01	0.0124	1	0.9056	
		203·Hd2	0.0420	4.1403	6.5777	2.9569	2.0092	1	0.2544	
		205·Hd2	0.0239	2.1138	4.2489	1.8649	2.4445	1	0.2553	
		209·Hd2	0.0073	1.0191	1.1438	0.4932	0.0315	1	0.7653	
		Global							9	0.2571
• (CA) <sub>n</sub> 201 pb = 1 203 pb = 2 205 pb = 3 (207-229) pb = 4	80	1	0.3264	53.00	54.16	19.086	0.0704	1	0.7756	
		2	0.1983	28.00	32.82	12.062	1.9233	1	0.1464	
		3	0.2187	34.00	37.37	12.352	0.9201	1	0.2983	
		<b>4</b>	<b>0.2565</b>	<b>51.00</b>	<b>41.65</b>	<b>14.819</b>	<b>5.8953</b>	<b>1</b>	<b>0.019</b>	
		Global							3	0.0552
• (CA) <sub>n</sub> 201 pb = 1 203 pb = 2 205 pb = 3 (207-229) pb = 4 • <i>Hind</i> III	80	1·Hd1	0.0140	0.11	2.28	1.022	4.6027	1	0.1742	
		2·Hd1	0.1610	24.46	26.82	11.090	0.5040	1	0.4841	
		3·Hd1	0.1962	32.43	33.52	11.283	0.1049	1	0.7299	
		4·Hd1	0.2410	48.00	39.16	14.276	5.4702	1	0.1109	
		1·Hd2	0.3128	52.70	51.69	18.150	0.0562	1	0.7953	
		2·Hd2	0.0411	4.15	6.59	2.947	2.0195	1	0.2548	
		3·Hd2	0.0233	2.13	4.24	1.840	2.4278	1	0.2578	
		4·Hd2	0.0106	2.03	1.70	0.742	0.1446	1	0.6509	
		Global							7	0.1849

Taula IV.59. Resultats del test de desequilibri de la transmissió (TDT) en els al·lels, agrupacions d'al·lels i combinacions haplotípiques dels mateixos dels marcadors estudiats en el gen PAI-1.

Els valors de significació  $p$  dels tests al·lèlics o haplotípics individuals han d'ésser considerats amb cura donat el risc que existeix de detectar falses associacions quan es fa un número elevat de tests. Totes les associacions significatives descrites en aquest apartat estan recolçades per valors de Var (O-E) per sobre de 2.5, i en el cas de PAI-1  $(CA)_n$  es supera de llarg aquest valor. Aquest fet implica un número considerable de transmissions tingudes en compte en les anàlisis. En les associacions descrites en el gen PLAT per a l'al·lel 115 de  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  ( $p$  exacta = 0.0029), la globalitat del locus  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  ( $p$  exacta = 0.0141), i al gen PAI-1 per a l'interval al·lèlic 207-229 pb de  $(CA)_n$  ( $p$  exacta = 0.019) el valor  $p$  del test exacte és prou baix com per considerar els TDTs prou robustos. La manera d'avaluar la validesa d'un valor  $p$  per sota de 0.05 (el més generalment acceptat com indicador d'un resultat significatiu) davant del problema dels test múltiples ha generat polèmiques en la bibliografia. Realitzar una correcció dels valors  $p$  dels tests per Bonferroni tenint en compte cadascun dels marcadors i haplotips totals i parcials a l'hora de comptabilitzar el número total de tests realitzats representaria un mètode excessivament conservatiu que implicaria una pèrdua de poder estadístic a causa d'un engrandiment de l'error de tipus II (probabilitat d'acceptar la hipòtesi nul·la quan en realitat és falsa o, en altres paraules, acceptar falsos negatius). A més, aquesta pràctica representa un error conceptual que implicaria l'assumpció de la hipòtesi nul·la: "cap marcador de tots els analitzats està associat a la malaltia", quan en realitat cadascun dels gens potencialment implicats en l'etiologia de la malaltia representa una hipòtesi nul·la individual a testar sense cap referència a altres marcadors no continguts en ell (Boehringer et al. 2000, Krawczak et al. 2001). D'altra banda, la teoria estadística bàsica estableix que quan es realitzen múltiples tests s'incrementa l'error de tipus I (rebuig de la hipòtesi nul·la quan aquesta és certa, és a dir acceptació de falsos positius). Aquest argument faria considerar la necessitat d'implicar en la correcció dels valors  $p$  per tests múltiples la totalitat dels gens estudiats en un mateix treball i no pas considerar-los de forma individual (Nyholt, 2001). Malgrat tot, els autors citats semblen estar d'acord en el fet que els tests corresponents a marcadors amb desequilibri de lligament entre ells dins d'un mateix gen no són independents. Com aquests tests estan correlacionats, no es dona en una oportunitat totalment independent a l'aparició de l'error de tipus I en cada test, pel que l'aplicació de la correcció de Bonferroni no seria correcta, com tampoc ho seria en el cas dels marcadors multial·lèlics ja que en aquest tipus de *loci* els tests corresponents a cada al·lel o haplotip individuals no són independents dels altres dins del mateix marcador. Segons les dades sobre desequilibri de lligament obtingudes en les famílies nuclears (taules de la IV.52 a la

IV.56), tant en fills afectats com en pares, els marcadors analitzats formen: 1 grup de lligament al gen FVII, 2 en el cluster gènic de les integrines plaquetàries, 2 en el gen PLAT i 1 en el gen PAI-1; mentre que en el cluster gènic del fibrinogen es poden distingir 2 grups de lligament per als pares i 1 sol per als fills afectats. Tenint en compte el més restrictiu dels conceptes anteriorment mencionats, hauríem de considerar la totalitat dels gens analitzats, resultant un total de 8 tests totalment independents (tenint en compte els 2 grups de lligament detectats en els pares dins del cluster gènic del fibrinogen), en base a la correcció de Bonferroni només s'haurien de considerar significatius aquells tests amb un valor p igual o inferior a 0.006 (0.05/8). Només l'associació descrita per a l'al·lel 115 de **(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>** al gen PLAT seria significativa sota aquestes condicions. Tenint en compte el criteri menys restrictiu, només haurien de considerar-se 2 tests independents dins del gen PLAT que exigeixen, segons la correcció de Bonferroni, un valor p igual o inferior a 0.025 (0.05/2) per als tests significatius. Sota aquest darrer criteri les associacions descrites al gen PLAT per als haplotips 115·I (p exacta = 0.0310) i 122·133 (p exacta = 0.0499), deixarien de ser estadísticament significatives. Per al gen PAI-1 només hauria de considerar-se un sol test independent, pel que un valor p de 0.05 seria suficient per considerar una associació com a significativa.

### 2.3. ANÀLISI DELS PARÀMETRES LIPÍDICS SÈRICS

Com ja ha estat enunciat en l'apartat 4.1 de la introducció, a la bibliografia han estat descrites correlacions entre els nivells plasmàtics o les activitats dels productes proteïcs codificats per alguns dels gens estudiats en la present tesi i els nivells plasmàtics d'alguns paràmetres lipídics sèrics. Per aquesta raó, en aquest apartat s'investiga:

- La influència del genotip del gen FVII sobre els nivells de colesterol total, HDL-colesterol (HDL-C) i ApoB en base a les correlacions detectades en la bibliografia entre els nivells plasmàtics de FVII:C i els nivells plasmàtics de LDL-colesterol.
- La influència del genotip dels gens PAI-1 i FVII sobre el nivell plasmàtic de triglicèrids en base a les correlacions descrites en la bibliografia entre els nivells plasmàtics dels productes proteïcs d'aquests gens i l'esmentat paràmetre sèric.
- La influència dels genotips del gen PLAT i del cluster gènic del fibrinogen sobre els nivells plasmàtics de lipoproteïna (a) en base a l'homologia estructural existent entre la lipoproteïna (a) i l'activador tissular del plasminogen en els dominis mitjançant els quals poden unir-se a fibrinogen.

Les anàlisis de la varianza necessàries en aquest apartat s'han efectuat sobre la mostra de famílies nuclears subdividida en pares i fills afectats. Aquesta subdivisió és necessària per evitar la correlació que presenten tots els paràmetres lipídics dins d'una mateixa família la magnitud de la qual depèn del grau d'heretabilitat del paràmetre. Les mitjanes dels nivells plasmàtics dels paràmetres lipídics utilitzats en els dos subgrups mostrals es presenten a la taula IV.60 tal i com es recullen a Valveny (2000).

<b>PARAMETRE LIPÍDIC (mg/dl)</b>	<b>PARES</b>	<b>FILLS (CAI)</b>
<b>Colesterol</b>	206.8 ± 6.8	194.1 ± 8.3
<b>HDL-C</b>	46.8 ± 1.9	36.2 ± 1.6
<b>ApoB</b>	98.8 ± 3.9	96.9 ± 4.9
<b>Lipoproteïna (a)</b>	17.4 ± 2.3	17.8 ± 2.7
<b>Triglicèrids</b>	109.7 ± 9.8	124.9 ± 13.5

*Taula IV.60. Mitjanes dels nivells plasmàtics dels parametres lipídics estudiats en pares i fills afectats.*

La normalitat de la distribució dels paràmetres lipídics, necessària per a la realització de les anàlisis de la variança, va ser comprovada (Valveny, 2000) mitjançant el test de Kolmogorov-Smirnov. Els triglicèrids, tant en fills afectats com en pares, i la lipoproteïna (a), només en pares, van mostrar una probabilitat inferior a 0.05 en l'esmentat test. En aquests tres casos, en les anàlisis es va utilitzar la transformació en forma de logaritme neperià de la variable en qüestió que sí segueix una distribució normal.

Donat que no va ser possible una mesura fiable dels nivells plasmàtics de LDL-colesterol degut a que en la recollida de la mostra no es van reunir les condicions adients, s'utilitzen els nivells plasmàtics d'ApoB com a indicadors dels primers donada l'elevada correlació (0.90) mostrada entre aquests dos paràmetres sèrics (Livshits et al. 1997).

Com a variables ambientals que podrien influir en la distribució dels paràmetres lipídics es van tenir en compte el sexe, l'edat, el *body mass index* (BMI), la pràctica d'exercici físic, el consum d'alcohol, la dieta anterior i posterior a la manifestació de la CAI (en el cas de que aquesta s'hagi manifestat), consum actual de tabac, presència de diabetes tipus I i presència de diabetes tipus II. Aquestes covariables van ser estratificades de la següent manera:

- Sexe: dona; home.
- Edat: en categories d'edat cada 5 anys desde 15 fins a 90.
- BMI: inferior a 25; entre 25 i 30 (sobrepès); superior a 30 (obesitat).
- Pràctica d'exercici físic: absent; moderada (caminada de més d'una hora diària o realització d'un exercici més intens de 1 a 3 cops per setmana); forta (realització d'exercici intens més de 3 cops per setmana).
- Consum d'alcohol: nul; menys de 30 g/dia; més de 30 g/dia.
- Dieta anterior a la manifestació de la CAI: normal (dieta dels individus que no estaven inclosos en la resta de categories per a aquesta variable, és a dir, dieta similar a la del conjunt de la població espanyola); rica en greixos (elevat consum de carn de xai, porc i vedella amb baix consum de peix, fruita i verdures); per a diabètics (baixa en hidrats de carboni); altres pobres en greix (baixa en sal i vegetariana).
- Dieta especial posterior a la manifestació de la CAI: cap; pobre en greixos; per a diabètics; altres pobres en greix.

- Consum actual de tabac: nul; 1-14 cigarretes/dia; 15-25 cigarretes/dia; més de 25 cigarretes/dia.
- Diabetes tipus I: absent; present (edat d'inici anterior als 40 anys).
- Diabetes tipus II: absent; present (edat d'inici superior als 40 anys).

Un resum de la distribució d'aquestes variables en la mostra de famílies nuclears s'exposa a la taula III.3 de l'apartat de material i mètodes.

Com a pas previ a les anàlisis de la varianza, es va determinar quines de les esmentades variables influenciaven la variabilitat dels paràmetres lipídics i en quin percentatge ho feien aplicant una regressió lineal múltiple amb introducció "pas a pas" (*stepwise*) de les covariables. En la taula IV.61 se'n presenten els resultats.

	PARES			FILLS (CAI)		
	Covariables	Variabilitat explicada	p	Covariables	Variabilitat explicada	P
<b>Colesterol</b>	Sx	5.4%	0.006	Ed	17.3%	0.030
<b>HDL-C</b>	Sx	6.2%	0.003	Sx Ed Ta	4.1% 15.8% 13.8%	0.048 0.050 0.004
<b>ApoB</b>	Sx Ed	3.5% 11.3%	0.028 0.045	Ta	18.2%	< 0.001
<b>Lipoproteïna (a)</b> (ln Lp(a) a pares)	-	-	-	-	-	-
<b>Triglicèrids</b> (ln Triglicèrids)	Al D2	7.7% 3%	0.011 0.046	Sx	5.3%	0.024

*Taula IV.61. Covariables amb efecte significatiu sobre els paràmetres lipídics estudiats i percentatge de la variabilitat explicada per les mateixes. Sx: sexe; Ed: edat; Al: consum d'alcohol; D2: presència de diabetes tipus II; Ta: consum actual de tabac.*

Per al colesterol total, el sexe explica un 5.4 % de la variació als progenitors ( $p = 0.006$ ) no mostrant-se efecte significatiu d'aquesta variable als fills afectats. Això podria estar condicionat pel desequilibri entre els dos sexes que existeix a la mostra de fills (8 dones i 90 homes), fet que pot evitar la detecció d'efectes d'aquesta variable sobre el nivell de colesterol. D'altra banda, en els fills afectats, l'edat explica el 17.3% ( $p = 0.03$ ) de la variabilitat, mentre que als pares no és significativa. Aquesta diferenciació podria indicar que els nivells de colesterol tenen un increment més important en el període d'edat que comprén el subgrup de fills afectats (dels 30 als 60 anys) que en el rang d'edats que comprén el subgrup de pares (dels 50 als 80 anys).

Per als nivells de HDL-C, en la mostra de fills afectats les variables sexe, edat i consum actual de tabac determinen el 4.1% ( $p = 0.048$ ), el 15.8% ( $p = 0.05$ ) i el 13.8% ( $p = 0.004$ ) de la variabilitat, respectivament. L'efecte del tabac concorda amb la hipòtesi generalment acceptada de que l'hàbit tabàquic disminueix els nivells de HDL-C fet que entre d'altres explicaria la connexió entre el tabaquisme i la malaltia cardiovascular. Els nivells de HDL-C solen ser més baixos en els homes, motiu que explicaria l'efecte significatiu de la variable sexe. En canvi, en els progenitors només és significativa la variable sexe que explica el 6.2% de la variabilitat ( $p = 0.002$ ). El fet de no detectar una influència significativa del consum actual de tabac sobre els nivells de HDL-C podria venir condicionat per la correlació existent entre aquesta variable i el sexe en aquesta mostra (el 81% dels progenitors fumadors són homes), per la qual aquestes dues variables no serien independents.

Sobre els nivells d'ApoB, en els pares tenen una influència significativa les variables sexe (3.5%,  $p = 0.028$ ) i edat (11.3%,  $p = 0.045$ ) mentre que en els fills afectats, el consum actual de tabac explica el 18.2% de la variació ( $p < 0.001$ ).

Per als triglicèrids, la variable sexe va condicionar un 5.3% ( $p = 0.024$ ) de la variabilitat dels seus nivells als fills afectats, mentre que en els pares el consum d'alcohol (7.7%,  $p = 0.011$ ) i la presència de diabetes tipus II (3%,  $p = 0.046$ ) van ser les variables amb efecte significatiu. Aquestes dues variables han estat freqüentment associades a un increment del nivell plasmàtic de triglicèrids.

Finalment, no es va trobar cap variable ambiental amb un efecte significatiu sobre la variabilitat dels nivells plasmàtics de lipoproteïna (a) ni als fills afectats ni als progenitors.



Les variables ambientals que van demostrar influir sobre la variabilitat dels paràmetres lipídics estudiats, van ser introduïdes com a covariables en les posteriors anàlisis de la variança. El percentatge de la variabilitat explicat per aquestes covariables va ser restat del percentatge de variabilitat explicat pels models que inclouen els genotips en aquells casos en que aquests van influir de forma significativa sobre la distribució d'alguns dels paràmetres lipídics estudiats.

En la taula IV.62 es mostra un resum dels resultats de totes les anàlisis de la variança realitzades per tal de detectar efectes significatius dels genotips en les 5 regions cromosòmiques analitzades sobre els nivells plasmàtics dels paràmetres lipídics considerats. Només els haplotips formats pels marcadors **-323 10 pb INS/DEL** i **HVR4** del gen FVII van mostrar efectes significatius, concretament sobre els nivells de HDL- C ( $p = 0.005$ ) i de triglicèrids ( $p = 0.015$ ) en els fills afectats, i sobre els nivells d'ApoB ( $p = 0.028$ ) en els pares. Aquests resultats han d'ésser interpretats tenint en compte els conceptes de consistència vertical i consistència horitzontal.

La consistència vertical 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, i per un efecte de dosi gènica, si els individus heterozigots per a un determinat al·lel "x" presenten nivells d'un determinat paràmetre plasmàtic superiors al d'individus no portadors d'aquest al·lel, és d'esperar que els individus homozigots "xx" també presentin nivells incrementats que en una associació total haurien d'ésser el doble que els dels heterozigots.

La consistència horitzontal implica que la detecció en una mostra determinada d'un model genètic amb una influència significativa sobre els nivells d'un paràmetre lipídic ha d'observar-se en altres mostres, en els mateixos al·lells, encara que no sigui significativa.

PARAMETRE LIPÍDIC	MARCADOR	P	
		PARES	FILLS (CAI)
Colesterol	FVII -323 10 pb INS/DEL	0.315	0.364
	FVII HVR4	0.254	0.833
	<b>Haplo. -323 10 pb INS/DEL - HVR4</b>	0.138	0.922
HDL- C	FVII -323 10 pb INS/DEL	0.477	0.304
	FVII HVR4	0.799	0.871
	<b>Haplo. -323 10 pb INS/DEL - HVR4</b>	0.665	<b>0.005</b>
ApoB	FVII -323 10 pb INS/DEL	0.591	0.631
	FVII HVR4	0.172	0.732
	<b>Haplo. -323 10 pb INS/DEL - HVR4</b>	<b>0.028</b>	0.838
Lipoproteïna (a) (ln Lp(a) a pares)	FGB <i>Hind</i> III	0.734	0.130
	FGB <i>Bcl</i> I	0.499	0.625
	FGA <i>Taq</i> I	0.314	0.731
	<b>Haplo. <i>Hind</i> III- <i>Bcl</i> I- <i>Taq</i> I</b>	0.460	0.600
	PLAT (TG) <sub>14</sub> (TA) <sub>12</sub>	0.745	0.350
	PLAT (CA) <sub>15</sub> C(TC) <sub>10</sub>	0.915	0.283
	<b>Haplo. (TG)<sub>14</sub>(TA)<sub>12</sub>(CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub>-TPA25</b>	0.578	0.105
Triglicèrids (ln Triglicèrids)	FVII -323 10 pb INS/DEL	0.609	0.837
	FVII HVR4	0.732	0.219
	<b>Haplo. -323 10 pb INS/DEL - HVR4</b>	0.866	<b>0.015</b>
	PAI-1 (CA) <sub>n</sub>	0.951	0.547
	PAI-1 <i>Hind</i> III	0.301	0.131
	<b>Haplo. (CA)<sub>n</sub> - <i>Hind</i> III</b>	0.808	0.565

Taula IV.62. Resultats de les anàlisis de la varianza per a la detecció d'efectes gènics significatius de les 5 regions cromosòmiques estudiades sobre els paràmetres lipídics considerats. En negreta i ombrejats es mostren els resultats significatius.

En les taules IV.63, IV.64 i IV.65 s'exposen el total de les anàlisis de la varianza realitzades per a la detecció d'efectes dels genotips i de les combinacions haplotípiques del gen FVII sobre els nivells plasmàtics de triglicèrids, HDL- C i ApoB, tant en pares com en fills afectats.

En l'associació detectada en fills afectats entre les combinacions d'haplotips del gen FVII i els nivells de triglicèrids (taula IV.63), els individus amb la combinació haplotípica I·H6/D·H6 presentarien, en promig, uns nivells plasmàtics de triglicèrids significativament inferiors als de la resta d'individus amb una significació (ajustada per correcció de Bonferroni per a les comparacions múltiples) de 0.022. Aquests individus presentarien la major diferència significativa en els nivells plasmàtics de triglicèrids amb els individus portadors de la combinació haplotípica IH7/DH7 (p corregida per Bonferroni = 0.043) que

els superarien en promig per 70.63 mg/dl. El model en que es va basar l'anàlisi explicaria el 23% de la variació total dels nivells de triglicèrids que queda en un 17.7% en descomptar l'efecte de la covariable sexe (5.3%). Aquests resultats mostren certa consistència vertical ja que els fills afectats amb combinacions haplotípiques (representades per més d'un individu) que impliquen dos al·lels H7 presenten nivells de triglicèrids més elevats que els portadors de la combinació I·H6/D·H6, encara que no queda clar que els portadors de les combinacions amb un al·lel H7 i un H6 presentin nivells intermitjos. L'anàlisi del marcador **HVR4** en els fills afectats (taula IV.63), encara que no va resultar significativa, mostra com els homozigots H6 presenten nivells de triglicèrids baixos que incrementen en els heterozigots H6H7 i que arriben al màxim en els homozigots H7H7. Aquest fet confirmaria la major importància relativa de la variació en aquest marcador enfront a la del *locus* **-323 10 pb INS/DEL** en l'efecte haplotípic detectat sobre els nivells de triglicèrids plasmàtics. Malgrat tot, no es dona consistència horitzontal ja que en la mostra de progenitors no es mostren tendències que confirmin els resultats obtinguts en els fills afectats.

En l'efecte de les combinacions haplotípiques del gen FVII sobre els nivells de HDL-C detectat en els fills afectats (taula IV.64) els individus amb la combinació genotípica I·H7/D·H6 presentarien uns nivells plasmàtics de HDL-C superiors en promig als de la resta d'individus (p corregida per Bonferroni = 0.014). Aquests individus presentarien la màxima diferència significativa en nivells plasmàtics d'HDL-C amb els individus amb la combinació haplotípica D·H7/D·H6 als que superarien en 12.92 mg/dl (p corregida per Bonferroni = 0.021). El model va explicar el 30.6% del total de la variabilitat en els nivells plasmàtics de HDL-C, encara que aquest percentatge queda totalment anul·lat en descomptar els efectes de les covariables sexe (4.1%), edat (15.8%) i consum actual de tabac (13.8%). No s'observa consistència vertical en l'associació descrita ja que no es pot assignar un efecte determinat a un al·lel o haplotip en concret. A l'anàlisi del marcador **-323 10 pb INS/DEL** (taula IV.64), que no va resultar significativa, es mostra certa tendència, tant en pares com en fills afectats, cap a un augment dels nivells de HDL-C amb el número de còpies de l'al·lel I. Els resultats obtinguts per a les combinacions haplotípiques no van presentar consistència horitzontal ja que en els progenitors no es mostren tendències que confirmin els resultats obtinguts en els fills afectats.

En l'associació entre les combinacions haplotípiques del gen FVII i els nivells plasmàtics d'ApoB detectada en els progenitors (taula IV.65), els individus portadors de la combinació haplotípica I·H7/D·H7 presentarien uns nivells plasmàtics d'ApoB en promig més alts que la resta d'individus ( $p$  corregida per Bonferroni = 0.004), presentant-se la màxima diferència significativa entre aquests individus i els homozigots D·H6/D·H6 als quals superarien en 32.08 mg/dl ( $p$  corregida per Bonferroni = 0.034). Aquest model va explicar el 19.2% de la variabilitat total dels nivells plasmàtics d'ApoB, valor que queda reduït al 4.4% en descomptar l'efecte de les covariables sexe (3.5%) i edat (11.3%). Els resultats observats no presenten consistència vertical ja que hi ha progenitors amb una combinació haplotípica que implica dos al·lels H7, diferent a l'anteriorment esmentada, amb nivells d'ApoB no gaire diferents als mostrats pels individus amb combinacions haplotípiques contenint dos al·lels H6 o un al·lel H6 i un H7. Els resultats obtinguts tampoc presenten consistència horitzontal ja que els fills afectats no mostren tendències que confirmin els resultats obtinguts en els pares.

Finalment, cal remarcar que segons les anàlisis realitzades el fet de ser portador de la combinació haplotípica I·H7/D·H7 s'associa amb nivells plasmàtics elevats d'ApoB (indicador dels nivells de LDL-C) en els pares i de triglicèrids en fills afectats.







Marcador	Covariables		Genotip	Nº Individus		Mitges corregides (mg/dl)		Efecte del genotip (mg/dl)		p	
	Pares	Fills (CAI)		Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)
<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	Al D2	Sx	<b>II</b>	2	3	70.9 ± 21.3	109.5 ± 60.2	-35.156	-12.545	0.609	0.837
			<b>ID</b>	35	29	111.9 ± 68.6	128 ± 101.7.	4.249	70.543		
			<b>DD</b>	78	65	110.5 ± 66.1	120.6 ± 68.5	0	0		
<b>HVR4</b>	Al D2	Sx	<b>H7H7</b>	15	15	101.6 ± 36.4	147.5 ± 80.9	-4.420	39.343	0.732	0.219
			<b>H7H6</b>	44	36	115.5 ± 84.5	131.7 ± 83.4	13.401	23.501		
			<b>H7H5</b>	1	1	45 ± 0	69 ± 0	-40.819	-39.192		
			<b>H6H6</b>	52	45	109.6 ± 56.9	108.2 ± 45.2	6.823	0		
			<b>H6H5</b>	1	-	112.9 ± 0	-	0	-		
<b>· 323 10 pb INS/DEL</b>  <b>· HVR4</b>	Al D2	Sx	<b>IH7/IH7</b>	-	1	-	74.4 ± 0	-	-43.941	0.200	<b>0.015</b>
			<b>IH7/IH6</b>	2	1	70.9 ± 21.3	179 ± 0	-33.450	60.623		
			<b>IH7/DH7</b>	6	9	102.4 ± 42.6	165.7 ± 98.5	-1.794	47.362		
			<b>IH7/DH6</b>	9	6	130.3 ± 109.7	78.6 ± 22.7	24.421	-33.536		
			<b>IH6/DH6</b>	9	10	118.6 ± 62.4	79.2 ± 31	16.279	-23.268		
			<b>DH7/DH7</b>	9	5	101 ± 34.5	129.4 ± 32.4	-14.671	11.010		
			<b>DH7/DH6</b>	23	24	122.4 ± 90.9	127.4 ± 56	13.850	9.033		
			<b>DH6/DH6</b>	43	35	107.7 ± 56.3	116.5 ± 45.6	0	0		
			<b>IH6/DH7</b>	1	-	65.4 ± 0	-	-24.327	-		

Taula IV.63. Anàlisi de la variança per a la detecció d'efectes dels genotips i de les combinacions d'haplotips del gen *FVII* sobre els nivells sèrics de triglicèrids. Els valors de *p* significatius es marquen en negreta i ombrejats.



Marcador	Covariables		Genotip	Nº Individus		Mitges corregides (mg/dl)		Efecte del genotip (mg/dl)		p	
	Pares	Fills (CAI)		Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)
<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	Sx	Sx	<b>II</b>	2	3	52.1 ± 2.7	40.1 ± 11.5	7.404	7.062	0.477	0.304
		Ed	<b>ID</b>	44	28	48.1 ± 16.4	37.1 ± 10.03	2.290	1.59		
		Fm	<b>DD</b>	92	62	45.6 ± 11.4	35.4 ± 7.9	0	0		
<b>HVR4</b>	Sx	Sx	<b>H7H7</b>	17	14	49 ± 111.3	34.9 ± 8.9	10.248	-0.188	0.799	0.871
		Ed	<b>H7H6</b>	56	36	47.3 ± 15.2	34.9 ± 9.5	9.491	-0.830		
		Fm	<b>H7H5</b>	1	1	43 ± 0	43 ± 0	9.262	5.923		
			<b>H6H6</b>	61	42	45.1 ± 11.8	37.2 ± 8.1	6.599	0		
			<b>H6H5</b>	1	-	40.8 ± 0	-	0	-		
<b>· 323 10 pb INS/DEL</b>  <b>· HVR4</b>	Sx	Sx Ed Fm	<b>IH7/IH7</b>	-	1	-	36.2 ± 0	-	7.673	0.665	<b>0.005</b>
			<b>IH7/IH6</b>	2	1	52.1 ± 2.7	31 ± 0	7.264	-5.920		
			<b>IH7/DH7</b>	8	8	47.3 ± 9.2	31.3 ± 9	1.604	-3.247		
			<b>IH7/DH6</b>	11	6	47.8 ± 14.5	46.4 ± 8.5	2.689	10.918		
			<b>IH6/DH6</b>	11	10	41.5 ± 11.5	41.9 ± 9.7	-4.850	5.129		
			<b>DH7/DH7</b>	9	5	50.6 ± 13.2	40.6 ± 6.9	3.840	3.637		
			<b>DH7/DH6</b>	30	24	44 ± 10.3	33.5 ± 8.8	-1.025	-2.004		
			<b>DH6/DH6</b>	50	32	45.9 ± 11.9	35.7 ± 7.1	0	0		
			<b>IH6/DH7</b>	1	-	48.9 ± 0	-	0.674	-		

Taula IV.64. Anàlisi de la variança per a la detecció d'efectes dels genotips i de les combinacions d'haplotips del gen *FVII* sobre els nivells sèrics de HDL- C. Els valors de p significatius es marquen en negreta i ombrejats.

Marcador	Covariables		Genotip	Nº Individus		Mitges corregides (mg/dl)		Efecte del genotip (mg/dl)		P	
	Pares	Fills (CAI)		Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)	Pares	Fills (CAI)
<b>-323 10 pb INS/DEL</b>	Sx Ed	Fm	<b>II</b>	2	3	91.6 ± 0.5	103.5 ± 34.1	-3.737	0.702	0.591	0.631
			<b>ID</b>	44	29	103 ± 30.9	91.9 ± 22.1	4.563	-4.992		
			<b>DD</b>	92	63	97.9 ± 22.9	97.1 ± 25.4	0	0		
<b>HVR4</b>	Sx Ed	Fm	<b>H7H7</b>	17	14	111.8 ± 2.1	96.8 ± 19.5	25.977	-3.393	0.172	0.732
			<b>H7H6</b>	55	37	94.9 ± 20.9	94.6 ± 28.9	11.070	-4.238		
			<b>H7H5</b>	1	1	73 ± 0	73 ± 0	-4.309	-20.598		
			<b>H6H6</b>	62	43	99.7 ± 24.9	96.9 ± 224	14.068	0		
			<b>H6H5</b>	1	-	90 ± 0	-	0	-		
<b>· 323 10 pb INS/DEL</b>  <b>· HVR4</b>	Sx Ed	Fm	<b>IH7/IH7</b>	-	1	-	104 ± 0	-	-21.381	<b>0.028</b>	0.838
			<b>IH7/IH6</b>	2	1	91.6 ± 0.5	69.1 ± 0	-2.546	-22.838		
			<b>IH7/DH7</b>	8	8	127.8 ± 46	96.4 ± 25.1	32.084	-3.966		
			<b>IH7/DH6</b>	11	6	103.2 ± 23	89.9 ± 27.9	7.150	-7.660		
			<b>IH6/DH6</b>	11	10	108.8 ± 22.3	98.7 ± 16.7	8.650	5.646		
			<b>DH7/DH7</b>	9	5	97.6 ± 19.9	96 ± 10.9	-3.032	4.005		
			<b>DH7/DH6</b>	29	24	98.4 ± 19.8	99.4 ± 29.7	2.931	0.900		
			<b>DH6/DH6</b>	51	33	97.7 ± 25.2	96.4 ± 24	0	0		

Taula IV.65. Anàlisi de la variança per a la detecció d'efectes dels genotips i de les combinacions d'haplotips del gen FVII sobre els nivells sèrics d'ApoB. Els valors de p significatius es marquen en negreta i ombrejats.



## 2.4. DISCUSSIÓ SOBRE ELS RESULTATS EPIDEMIOLÒGICS

### A. ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI DE LA TRANSMISSIÓ (TDT)

Les anàlisis per tal de detectar desequilibri en la transmissió d'al·lells i haplotips en les 5 regions cromosòmiques analitzades només van donar resultats significatius en els gens implicats en la fibrinolisi (PLAT i PAI-1), no detectant-se cap associació entre els gens implicats en la coagulació sanguínea i la CAI.

En el gen PLAT, es van detectar 3 casos amb un defecte significatiu en la transmissió: en l'al·lel 115 del STR  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$ , en l'haplotip parcial 115·I format pels marcadors  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  i **TPA25**, i en l'haplotip parcial 122·113 format pels marcadors  $(TG)_{14}(TA)_{12}$  i  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$ . Com ja s'ha vist a l'apartat de resultats, la correcció per tests múltiples exigeix, en el més estricte dels casos, que el valor p dels tests no superi el 0.006 (0.05/8). Només les anàlisis de la transmissió de l'al·lel 115 van complir aquests requisit abans (p exacta = 0.0045) i després (p exacta = 0.0029) de l'agrupació dels al·lells del STR en  $(CA)_{15}C(TC)_1$ , essent l'únic cas amb una associació prou robusta dels tres esmentats.

El conjunt dels resultats obtinguts en el gen PLAT fa sospitar que l'al·lel 115 de  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  és l'únic realment associat a una protecció contra la CAI essent l'haplotip parcial 115·I "arrossegat" cap a la significació pel fet de contenir aquest al·lel, ja que existeix un desequilibri de lligament considerable entre  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  i **TPA25** (veure taula IV.55). En el present estudi no s'ha detectat cap resultat significatiu en les anàlisis TDT en considerar el marcador **TPA25** en solitari. En la bibliografia es recullen diversos estudis cas/control a la recerca d'associació entre els al·lells del marcador **TPA25** i la CAI en els que s'han obtingut resultats contradictoris i poc clars al respecte (veure taula I.1 de la introducció), que van des de l'associació del genotip II amb risc per a l'infart de miocardi (van der Boom et al. 1997), fins a l'associació de l'al·lel D amb tromboembolisme venós (Hooper et al. 2000), passant per estudis en els que no es troba cap associació entre la CAI i el polimorfisme (Steeds et al. 1998, Ridker et al. 1997a). Aquest fet podria respondre a l'existència de diferents patrons de lligament dins del gen PLAT en les diferents mostres utilitzades en els esmentats estudis donat que tenen orígens geogràfics molt diversos i per tant històries poblacionals també diferents.

En base a aquesta hipòtesi, és necessari preguntar-se perquè l'al·lel 115 de  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  ha arrossegat cap a la significació un haplotip parcial que el conté conjuntament amb el marcador **TPA25** però no ho ha fet amb haplotips que el contenen conjuntament amb el marcador  $(TG)_{14}(TA)_{12}$ , malgrat l'existència d'un desequilibri de lligament considerable entre els loci  $(TG)_{14}(TA)_{12}$  i  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$ , lleugerament superior al que existeix entre  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  i **TPA25** tant en pares com en fills afectats. A més, en el cas concret de l'al·lel 115 de  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$ , el desequilibri de lligament amb l'al·lel 120 de  $(TG)_{14}(TA)_{12}$  (al·lel junt amb el que és troba en la quasi totalitat dels haplotips reconstruïts en el total dels individus) es superior (D pares = 0.0550; D fills afectats = 0.0317) al mostrat per aquest al·lel respecte als al·lells de **TPA25** (D pares = 0.0073; D fills afectats = 0.0073). Com a possible resposta a aquests fets es podria hipotetitzar l'existència d'un locus realment associat a la malaltia que es trobaria entre els marcadors  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  i **TPA25**. Aquest *locus* presentaria un fort desequilibri de lligament amb el marcador  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  amb una forma al·lèlica protectora contra la CAI amb un grau d'associació al·lèlica molt elevat amb l'al·lel 115. A més, presentaria un desequilibri de lligament considerable amb el marcador **TPA25**, però molt baix desequilibri de lligament amb el marcador  $(TG)_{14}(TA)_{12}$ , fet que vindria recolçat per la manca de desequilibri de lligament entre  $(TG)_{14}(TA)_{12}$  i **TPA25** (veure taula IV.55).

L'existència d'aquest *locus* hipotètic també ajudaria a superar la dificultat de trobar una explicació fisiològica al fet de que un sol al·lel dels 17 que existeixen al STR  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  confereixi protecció contra la CAI. A més, cal tenir en compte que aquest microsatèl·lit es troba a l'intró 1 del gen PLAT, entre aquest i l'intró 8, que conté el marcador **TPA25**, es troben 8 exons dels quals només 6 codifiquen per dominis de la proteïna madura entre els quals 1 codifica per al domini digital i 3 per a regions *kringle*. Tant el domini digital com les regions *kringle* de de t-PA intervenen en la seva interacció amb la fibrina. Aquesta interacció és necessària perquè t-PA activi el plasminogen (veure l'apartat D.1 del punt 3.2 de la introducció) i, per tant, la fibrinolisi. L'existència d'un hipotètic *locus* associat amb la CAI entre els marcadors  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  i **TPA25** podria implicar modificacions en els esmentats dominis de la proteïna que incidirien sobre la seva capacitat d'interacció amb la fibrina i pertant sobre la seva funció fibrinolítica mitjançant l'activació del plasminogen. La protecció contra la CAI mostrada en la present tesi podria venir conferida per un més eficient procés fibrinolític en individus portadors de la variant en associació al·lèlica amb l'al·lel 115 de  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  condicionat per una major afinitat de la proteïna t-PA vers al fibrinogen que, a més, podria relacionar-se amb un

efecte protector en front a la interferència que es suposa que causa la lipoproteïna (a) sobre el procés de fibrinolisi quan es troba a concentracions plasmàtiques elevades, ja que aquesta lipoproteïna també posseeix dominis *kringle* a través dels quals podria unir-se al fibrinogen (Hamsten, 1993). El fet de que t-PA presentés una unió més eficient a la xarxa de fibrina contrarrestaria aquest risc en persones amb nivells plasmàtics elevats de lipoproteïna (a).

L'associació entre el STR (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> i la CAI ha estat descrita per primer cop en la present tesi.

Pel que respecta al gen PAI-1, es va detectar un excés significatiu en la transmissió del grup d'al·lels de més gran tamany (207-229 pb) del microsatèl·lit (CA)<sub>n</sub> que van implicar un risc relatiu envers a la CAI de 1.86. Dawson i col·laboradors (1991), van portar a terme un estudi d'associació entre els dos marcadors del gen PAI-1 analitzats en la present tesi i els nivells plasmàtics de la proteïna PAI-1 en una mostra de 145 pacients amb infart de miocardi anterior als 45 anys d'edat i en 95 controls. En aquest estudi es va mostrar una associació significativa entre l'STR (CA)<sub>n</sub> i els nivells plasmàtics de PAI-1, amb els al·lels de mida curta (203, 201 i 199 pb) associats als nivells plasmàtics més alts i els al·lels de mida a partir de 205 pb en endavant associats a nivells plasmàtics baixos. Aquests resultats podrien ser interpretats com discordants amb els obtinguts en la present tesi, ja que uns nivells plasmàtics elevats de PAI-1 podrien implicar una inhibició excessiva de la fibrinolisi que dificultaria l'eliminació de coàguls i, per tant, una predisposició per a la CAI. El grup d'al·lels que Dawson i col·laboradors detecten com a associats a nivells plasmàtics baixos de PAI-1 inclou la totalitat del grup d'al·lels que en el present treball s'han associat amb una predisposició per a la CAI. Malgrat tot, cal ressaltar que l'al·lel 205 que Dawson i col·laboradors troben associat a nivells plasmàtics baixos de PAI-1, ha estat determinat en la present tesi com un al·lel protector contra la CAI. Per altra banda, en el mencionat treball també es va detectar una associació no significativa entre el genotip Hd2/Hd2 de **Hind III** amb nivells plasmàtics elevats de PAI-1. Aquest resultat, per les mateixes raons anteriorment esmentades, es trobaria en desacord amb el número de transmissions incrementades dels haplotips (207-229)·Hd1 que, en certa manera, involucren, encara que no de forma significativa, l'al·lel Hd1 en un cert risc cap a la CAI.

Dawson i col·laboradors atribueixen l'associació del STR (CA)<sub>n</sub> amb els nivells plasmàtics de PAI-1 a l'existència d'alguna variació de la seqüència en algun punt del gen que influiria en l'expressió del mateix, ja que s'ha demostrat la importància de la

transcripció en el control de la síntesi de la proteïna PAI-1 (Klinger, 1987; Riccio, 1988; Emeis i Kooistra, 1986). La mateixa explicació es podria donar en l'associació detectada en el present treball, hipotetitzant l'existència d'un *locus* en desequilibri de lligament amb el microsatèl·lit (CA)<sub>n</sub> amb al·lels que condicionarien una major taxa de transcripció del gen que, al seu torn, condicionarien nivells plasmàtics alts de PAI-1 i, en conseqüència, una major inhibició de PLAT. En aquesta situació, els processos fibrinolítics serien en cert grau menys eficients que en unes condicions en les que els nivells plasmàtics de PAI-1 fossin més baixos, afavorint els processos trombòtics donat que el creixement dels coàguls seria més difícil de limitar i la xarxa de fibrina més difícil d'eliminar.

Malgrat tot, no és necessari recórrer a l'existència d'un *locus* realment causant de risc per la malaltia lligat al STR (CA)<sub>n</sub> per poder explicar l'associació detectada en aquest marcador amb la CAI. Bosma i col·laboradors (1988) descriuen aquest microsatèl·lit com una regió Z-ADN que, conjuntament amb una altra regió del mateix tipus localitzada entre les posicions -195 i -153 i dues còpies invertides de la seqüència reguladora de proteïnes de fase aguda (CTGGGA) localitzades a la regió 5' del gen, podrien intervenir en el control de la transcripció del gen fent que aquest es comporti com una proteïna de fase aguda. Les regions Z-ADN són seqüències constituïdes per purines i pirimidines alternades que es caracteritzen per ser capaces de passar d'un estat d'hèlix dextrògira (B-ADN) a un estat d'hèlix levògira (Z-ADN). Aquesta transició ocorre en situacions de sobreentrellament helicoidal negatiu, no revertint l'estructura en Z-ADN a B-ADN fins que l'acció de les topoisomerases permet eliminar l'*stress* de torsió causat per el sobreentrellament. L'avanç de les ARN polimerases sobre una doble hèlix d'ADN genera en la part anterior a l'enzim un sobreentrellament helicoidal positiu del ADN, mentre que en la part posterior genera un sobreentrellament helicoidal negatiu. S'ha comprovat que les estructures Z-ADN es donen durant la transcripció de molts gens, però desapareixen quan aquests no s'expressen (Wöfl et al. 1996). A més, s'ha observat que sobre les estructures en Z-ADN les ARN polimerases no poden transcriure (Peck i Wang, 1985). D'aquesta manera, el pas d'una ARN polimerasa per una d'aquestes regions indueix el canvi de conformació de la mateixa cap a Z-ADN provocant que ARN polimerases subsegüents quedin bloquejades fins que l'acció de les topoisomerases retorni la zona a una conformació B-ADN. A més, l'estructura en Z-ADN emmascara llocs de reconeixement de proteïnes d'unió a B-ADN i representa zones per les quals els enzims implicats en la transcripció presenten gran afinitat (Arndt-Jovin et al. 1993, Herbert et al. 1995). El conjunt d'aquestes evidències assenyalen a

les seqüències Z-ADN com a importants elements reguladors de l'expressió dels gens que les posseeixen.

L'associació amb risc per la CAI dels al·lels del microsatèl·lit  $(CA)_n$  de 207 a 229 pb en contraposició a cert efecte protector, detectat només en els TDTs realitzats manualment, dels al·lels 203 i 205 podria suggerir un diferent efecte sobre el control de la transcripció dels al·lels de mida petita enfront a al·lels de mides més grans que podria estar condicionat per la menor o major facilitat per adoptar la conformació de Z-ADN per part de la regió ocupada pel microsatèl·lit en funció de la grandària de la mateixa. D'aquesta manera, els al·lels compresos entre 207 i 229 pb afavoririen una major transcripció del gen PAI-1 que els al·lels 203 i 205. Aquesta hipòtesi podria ser recolçada pels resultats obtinguts en el treball de Rothenburg i col·laboradors (2001) en el que es va detectar una diferència significativa en la taxa de transcripció de fins a un 27% entre 2 al·lels d'un microsatèl·lit  $(CA)_n(CG)_n$  capaç d'adoptar l'estructura Z-ADN en el gen Nci de la rata que es diferenciaven en 2 repeticions de dinucleòtid (4pb). Malgrat tot, en aquest estudi d'entre els 2 al·lels esmentats la major taxa de transcripció va correspondre al de menor tamany contràriament al que hipotèticament succeiria en el microsatèl·lit  $(CA)_n$  del gen PAI-1.



## B. ANÀLISI DELS PARÀMETRES LIPÍDICS SÈRICS

Les anàlisis de la varianza realitzades no van detectar cap efecte de la variabilitat del gen FVII sobre els nivells de colesterol total, del cluster gènic del fibrinogen ni del gen PLAT sobre els nivells de lipoproteïna (a) ni del gen PAI-1 sobre els nivells de triglicèrids.

D'altra banda, cal resaltar que segons aquestes anàlisis un 17.7% de la variabilitat dels nivells plasmàtics de triglicèrids en els fills afectats i un 4.4% de la variabilitat dels nivells plasmàtics d'ApoB en els progenitors poden ser explicats en funció de la combinació d'haplotips del gen FVII que porten els individus. En cap dels dos casos es van observar resultats significatius per als marcadors **-323 10 pb INS/DEL** i **HVR4**, considerats individualment.

Pel que respecta a l'associació entre les combinacions haplotípiques del gen FVII amb els nivells de triglicèrids en fills afectats, es va observar certa consistència vertical ja que les combinacions d'haplotips que implicaven ser portador de dues còpies de l'al·lel H7 van implicar en promig una major concentració plasmàtica de triglicèrids que aquelles que implicaven ser portador de dues còpies de l'al·lel H6, encara que no es va evidenciar clarament el fet de que els portadors d'haplotips que implicaven una heterozigosi H7H6 per al marcador **HVR4** presentessin nivells de triglicèrids plasmàtics en promig intermitjos. Aquesta consistència vertical es va manifestar més clarament, encara que no de forma significativa, en l'anàlisi del marcador **HVR4** considerat de forma individual ja que, entre els fills afectats, els individus homozigots H6H6 van presentar els nivells de triglicèrids plasmàtics en promig més baixos, els homozigots H7H7 els més alts i els heterozigots H7H6 nivells situats entre els dos tipus d'homozigots. Aquesta tendència no es va observar en el grup de progenitors. L'associació detectada no va presentar consistència horitzontal ja que només va ser observada en els fills afectats i no pas en els pares.

En relació a l'associació entre les combinacions haplotípiques del gen FVII amb els nivells d'ApoB en els pares, aquesta no va mostrar consistència vertical ja que no es va poder atribuir un efecte determinat sobre els nivells plasmàtics d'ApoB a un haplotip o a un determinat al·lel dels marcadors **-323 10 pb INS/DEL** o **HVR4**. No obstant, de la mateixa manera que en l'associació detectada entre els haplotips del gen FVII i els nivells plasmàtics de triglicèrids, una combinació d'haplotips que implica dues còpies de l'al·lel H7 (I·H7/D·H7), va mostrar els nivells en promig més alts del paràmetre lipídic estudiat en l'anàlisi. No es va observar consistència horitzontal.

Una tercera associació va ser detectada, en aquest cas entre les combinacions d'haplotips del gen FVII i els nivells plasmàtics d'HDL-C en el grup de fills afectats. Malgrat que aquesta anàlisi de la varianza va resultar significativa, el percentatge de la variabilitat dels nivells de HDL-C que va explicar el model (30.6%) va quedar totalment anul·lat en descomptar els percentatges de l'esmentada variabilitat explicats per les covariables sexe (4.1%), edat (15.8%) i consum actual de tabac (13.8%). A més, no va ser possible detectar cap indicatiu de consistència vertical ni horitzontal en aquesta associació, encara que en l'anàlisi del marcador **-323 10 pb INS/DEL**, que no va resultar significativa, es va observar tant en pares com en fills afectats un augment en promig dels nivells plasmàtics d'HDL-C amb el número de còpies de l'al·lel I. Es pot concloure que l'associació detectada entre les combinacions d'haplotips del gen FVII i els nivells d'HDL-C no reuneix els requisits suficients per a ser considerada com a autèntica.

Malgrat tot, crida l'atenció el fet que en dues de les associacions detectades es coincideixi en mostrar els individus portadors de la combinació haplotípica I·H7/D·H7 com els que en promig presenten els nivells plasmàtics més elevats, ja sigui de triglicèrids (en els fills afectats) com d'ApoB (en els pares). En el cas dels fills afectats, aquest fet és degut a que els portadors de la combinació I·H7/D·H7 van presentar la màxima diferència en els nivells promig de triglicèrids plasmàtics respecte als portadors de la combinació I·H6/D·H6 ( $p = 0.043$ ), els quals al seu torn van presentar nivells en promig més baixos que la resta d'individus ( $p = 0.022$ ). En el cas dels progenitors, la implicació de l'haplotip I·H7/D·H7 amb nivells alts d'ApoB va ser més directa ja que els portadors d'aquest haplotip van presentar nivells promig d'aquest paràmetre significativament més elevats que la resta d'individus ( $p = 0.004$ ). En aquest darrer cas, el grup d'individus més diferenciat dels portadors de la combinació I·H7/D·H7 van ser els homozigots D·H6/D·H6, amb nivells d'ApoB en promig més baixos ( $p = 0.034$ ).

Cal preguntar-se per què la combinació haplotípica I·H7/D·H7 coincideix en determinar nivells plasmàtics en promig elevats de triglicèrids (en fills afectats) i d'ApoB (en els progenitors) i quin es el mecanisme fisiològic mitjançant el qual la variabilitat del gen FVII pot influir sobre aquests paràmetres lipídics. En la bibliografia es troba àmpliament documentada l'existència d'interaccions entre les lipoproteïnes plasmàtiques i el procés de l'hemostasi. Ha estat demostrada la participació de les lipoproteïnes plasmàtiques en els processos de coagulació i fibrinolisi. Aquestes representen superfícies on s'adhereixen els enzims de l'hemostasi, tant coagulants com anticoagulants, i s'uneixen als seus cofactors i

substrats per tal d'expressar les seves activitats (per a revisió veure Griffin et al. 2001). A més, els tractaments hipolipemians no provoquen només una davallada en els nivells dels lípids plasmàtics sinó que també tenen un efecte antitrombòtic a través d'un descens de FVII:Ag (concentració plasmàtica de factor VII) i d'un descens de FVII:C (activitat coagulant del factor VII en plasma) (Porreca et al. 2000). Un increment en els nivells plasmàtics de lípids aterogènics (com el colesterol total o els triglicèrids) està correlacionat linealment amb un increment de la concentració plasmàtica tant de FVIIa (enzim en la forma activada) com de FVII:C (Hansen et al. 2001). Aquest increment de la capacitat de coagulació de la sang es donaria per l'activació del factor VII a través de la via intrínseca ja que les lipoproteïnes oxidades constitueixen superfícies elèctricament carregades capaces d'activar aquesta via (Kjalke et al. 2000). La correlació dels nivells plasmàtics de triglicèrids i FVII:C és contínua, es a dir, no es necessari assolir un determinat valor límit en la concentració de triglicèrids perquè es manifesti (Chadarevian et al. 1999). Altres estudis han detectat associacions entre genotips del gen FVII i nivells de paràmetres lipídics en plasma. En un treball realitzat per Mariani i col·laboradors (1999b) va ser detectada una influència de la variabilitat en el gen FVII sobre la correlació dels nivells de FVIIa i FVII:C amb els nivells plasmàtics de lipoproteïnes riques en triglicèrids. En un estudi anterior realitzat en pacients d'infart de miocardi d'esdeveniment anterior a l'edat de 45 anys (Moor et al. 1995), es va detectar una correlació significativa del contingut de triglicèrids de les VLDLs i la concentració plasmàtica d'ApoB (interpretada com un indicador del número de partícules d'aquesta fracció lipoproteica) amb els nivells de FVII:C i FVII:Ag només en els individus homozigots Arg/Arg per al polimorfisme Arg/Gln 353 del gen FVII. Davant d'aquest resultat l'autor de l'estudi va interpretar que aquest polimorfisme es localitzaria en una regió de la molècula del factor VII que estaria implicada en la interacció amb les lipoproteïnes riques en triglicèrids i que podria afectar el processament intracel·lular en els hepatòcits o l'estabilitat de la proteïna, fets que tindrien repercussió sobre els seus nivells plasmàtics.

En el present treball ha estat descrita per primera vegada l'associació entre haplotips del gen FVII formats per els marcadors **-323 10 pb INS/DEL** i **HVR4** i els nivells plasmàtics de triglicèrids i d'ApoB. En base als resultats obtinguts en els estudis mencionats en el paràgraf anterior, es podria hipotetitzar que la combinació haplotípica I-H7/D-H7 s'associa amb un increment del número de partícules VLDL (considerant els nivells d'ApoB com a indicadors d'aquest paràmetre) i del seu contingut en triglicèrids. Aquest efecte gènic hauria de fonamentar-se en l'existència d'un polimorfisme que podria trobar-se en

l'interval comprés entre els marcadors **-323 10 pb INS/DEL** i **HVR4**, que inclou la major part del gen **FVII**, o bé fora d'aquest interval cap a 3' ja que presentaria desequilibri de lligament amb el marcador **HVR4** per la certa consistència vertical mostrada en aquest *locus* en l'associació descrita respecte als nivells plasmàtics de triglicèrids en els fills afectats. Aquest hipotètic polimorfisme hauria de manifestar-se a nivell de proteïna donant lloc a una variant del factor de coagulació VII que interaccionaria amb gran afinitat amb les lipoproteïnes riques en triglicèrids i ApoB (especialment VLDLs) i provocaria alteracions del seu metabolisme com una disminució de l'hidròlisi per part de la lipoproteïna-lipasa dels triglicèrids que transporten i que també impediria el seu processament cap a IDLs i LDLs que portaria a un major acúmulo de VLDLs en el plasma. Aquest efecte sobre el metabolisme lipoproteic també podria donar-se a través d'un increment en els nivells plasmàtics del factor de coagulació VII, paràmetre no mesurat en la present tesi, causat per aquest hipotètic polimorfisme. Aquest fet incrementaria la quantitat de molècules de factor VII en interacció amb les mencionades lipoproteïnes interferint el seu metabolisme.

## 1. CONCLUSIONS DE L'ESTUDI POBLACIONAL

Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels 9 marcadors utilitzats en la part poblacional de la present tesi permeten concloure que:

- La variabilitat poblacional trobada per als polimorfismes FVII **-323 10 pb INS/DEL**, FVII **HVR4**, FGB **BclII**, GPIIb **9 pb INS/DEL**, GPIIIa **TaqI** i PLAT **TPA25 Alu** indica que aquests marcadors són de gran utilitat en l'estudi de la diversitat genètica interpoblacional tant en el total de les mostres estudiades com a nivell de les 6 mostres procedents de la Mediterrània Occidental. Els marcadors FGB **HindIII** i FGA **TaqI** mostren certa homogeneïtat dins de les 6 mostres de la Mediterrània Occidental, encara que discriminen la mostra Sud-sahariana. El marcador PAI-1 **HindIII** és el menys divers a nivell del total de les 7 mostres analitzades.
- Els marcadors analitzats indiquen una gran homogeneïtat entre les mostres d'Àrabs i d'Alpujarras compatible amb l'existència d'un flux gènic no negligible a través de l'estret de Gibraltar en algun moment del passat. Aquest resultat s'oposa a la idea d'un flux gènic limitat entre la Península Ibèrica i el Nord d'Àfrica suggerida en estudis basats en altres marcadors (Simoni et al. 1999, Comas et al. 2000, Bosch et al. 2001).
- La distribució poblacional dels polimorfismes estudiats es compatible amb certa peculiaritat genètica de la mostra de Bascos i de les mostres sardes que pot ser el reflexe del seu aïllament respecte a la resta de poblacions de la Mediterrània Occidental analitzades en el present treball. Aquests resultats concorden amb dades genètiques previes (Scozzari et al. 1997; Lucotte i Hazaout, 1996, Cavalli-Sforza et al. 1994).
- Pel que respecta a les poblacions marroquines, els resultats obtinguts recolçarien, d'acord amb altres estudis (Comas et al. 2000), l'existència d'un fort component berber en la constitució genètica de la mostra d'Àrabs del Marroc.

## 2. CONCLUSIONS DE L'ESTUDI EPIDEMIOLÒGIC

Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels 13 marcadors utilitzats en la part epidemiològica de la present tesi permeten concloure que:

- Cap marcador contingut en els gens implicats en el procés de la coagulació sanguínia analitzats en la present tesi (FVII **-323 10 pb INS/DEL**, FVII **HVR4**, FGB **HindIII**, FGB **BclII**, FGA **TaqI**, GPIIIa (CT)<sub>n</sub>, GPIIIa **TaqI** i GPIIb **9 pb INS/DEL**) presenta associació entre la seva variació i la CAI en la mostra de 101 famílies nuclears amb membres afectats per la malaltia.
- Dins del gen PLAT, l'al·lel 115 del STR (CA)<sub>15</sub>C(TC)<sub>10</sub> presenta un defecte significatiu en la transmissió cap a la descendència afectada i per tant s'associa a un efecte protector contra la CAI. Es postula l'existència d'un polimorfisme realment associat amb la malaltia amb efecte sobre els dominis de la proteïna t-PA que intervenen en la seva interacció amb la xarxa de fibrina i que presentaria un al·lel protector contra la CAI amb una forta associació al·lèlica amb l'al·lel 115.
- Dins del gen PAI-1, es dona un excés significatiu en la transmissió dels al·lells més grans (207-229 pb) del microsatèl·lit (CA)<sub>n</sub> envers als fills afectats, associant-se aquests a un risc relatiu per a la CAI. Per contra, els al·lells 203 i 205 presenten un defecte en la transmissió envers els fills afectats pel que s'associen a un efecte protector contra la CAI. Aquests resultats permetrien hipotetitzar la influència del tamany dels al·lells d'aquest marcador sobre la taxa de transcripció del gen PAI-1 a través de la capacitat que presenta l'STR (CA)<sub>n</sub> d'adoptar la conformació de Z-ADN.
- No es detecta cap efecte significatiu de la variació en el gen FVII sobre els nivells plasmàtics de colesterol total, ni de la variació en el cluster gènic del fibrinogen o en el gen PLAT sobre els nivells plasmàtics de lipoproteïna (a), ni tampoc de la variació en el gen PAI-1 sobre els nivells plasmàtics de triglicèrids.

- La combinació d'haplotips I·H7/D·H7 del gen FVII s'associa significativament amb un increment en els nivells plasmàtics promig de triglicèrids en els fills afectats i d'Apo B en els progenitors. Aquests efectes poden reflectir un increment en la concentració plasmàtica de lipoproteïnes riques en triglicèrids (probablement les VLDLs) que es donaria a través d'un increment de la concentració plasmàtica del factor de coagulació VII en individus portadors d'aquesta combinació haplotípica.

En definitiva, a la mostra analitzada cap dels marcadors estudiats pot considerar-se com un factor de risc important per a la CAI, confirmant-se els resultats negatius descrits a la literatura en altres mostres de malalts d'origen poblacional diferent.

A partir dels resultats obtinguts en el present treball es plantegen com a possibles noves aproximacions al paper del procés hemostàtic en la CAI:

- La recerca de nous polimorfismes dins del gen PLAT en l'interval comprés entre els marcadors  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  i TPA25 per tal d'avaluar la seva implicació en el risc per a la CAI.
- La realització d'estudis funcionals que permetin determinar l'efecte de la grandaria dels al·lels del STR  $(CA)_n$  sobre la taxa de transcripció del gen PAI-1, acompanyats per estudis que confirmin la presència de nivells plasmàtics incrementats de PAI-1 en portadors dels al·lels més grans (207-229 pb) del microsatèl·lit  $(CA)_n$  en la mostra de famílies nuclears.
- La realització d'estudis en la mostra de famílies nuclears que permetin confirmar la influència dels haplotips del gen FVII sobre els nivells plasmàtics de FVII:Ag i de FVII:C com a intermediaris de l'efecte sobre els nivells plasmàtics de VLDLs.
- La determinació dels polimorfismes PLAT  $(CA)_{15}C(TC)_{10}$  i PAI-1  $(CA)_n$  en mostres poblacionals de l'àmbit mediterrani i en altres mostres poblacionals amb elevada incidència de CAI per tal de descobrir patrons diferencials en la distribució de les freqüències al·lèliques d'aquests dos *loci* que contribueixin a donar una explicació a la relativament baixa incidència d'aquesta malaltia a les poblacions mediterrànies.





## **ANNEX 1**

### **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\_ SI\_  
 Moderat (<30 gr/dia) \_  
 Important (>30 gr/dia) \_

5. Hipertensió: NO\_ SI\_

6. Diabetes: NO\_ TIPUS I\_ TIPUS II\_

7. Tract. hormonal: NO\_ SI\_

8. Dislipèmia: NO\_ SI\_  
 (especificar, si es coneix, el tipus)

9. Hiperuricèmia: NO\_ SI\_

10. AVC: NO\_ SI\_  
 AIT NO\_ SI\_  
 Art. Perif. NO\_ SI\_  
 Claudicació intermitent NO\_ SI\_  
 (Malaltia vascular perifèrica)

11. Estrés: NO\_ SI\_

12. Personalitat tipus A : NO\_ SI\_

13. Dieta: Normal\_  
 Rica en greixos \_  
 Per diabètics \_  
 Altres (especificar) \_ \_\_\_\_\_

14. Estudis: Cap/ Primaris \_  
 Secundaris \_  
 Llicenciat. o superior \_

15. Situació laboral: Actiu/va \_  
 Baixa laboral \_  
 Invalidesa perm. \_  
 Atur \_  
 Altres (especificar) \_ \_\_\_\_\_

16. Estat civil: 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

### PROTOCOL D'EXTRACCIÓ D'ADN PEL MÈTODE DEL FENOL- CLOROFORM

1. Partim de 5 ml de sang per tub, la qual cosa equival a uns  $5 \times 10^6$  de cèl.lules.
2. Centrifugar 10 minuts a temperatura ambient a 600 g.
3. Extreure la fase superior de plasma amb una pipeta Pasteur fins a 1 mm de la fase vermella.
4. Agafar aproximadament 1 ml de la fase de color crema i posar-la en un nou tub.
5. Afegir 8 ml de tampó de lisi 1.
6. Invertir i 10 minuts en gel.
7. Centrifugar 10 minuts a 4°C i a 900 g.
8. Extreure el sobrenedant i resuspendre el sediment amb 1 ml de TBS.
9. Barrejar amb la pipeta.
10. Afegir 1 ml de tampó de lisi 2 i 50 µl de proteinasa K a 10 mg/ml.
11. Barrejar per immersió.
12. Incubar de 1 a 2 hores a 55°C.
13. Posar els 2 ml de la nostra una vegada refredats amb un tub cònic amb la resina de silicagel.
14. Afegir 1 ml de fenol i 1 ml de cloroform-isoamílic (24:1).
15. Agitar per immersió durant 5 minuts.
16. Centrifugar durant 7 minuts a 600 g a temperatura ambient.
17. Decantar la fase superior en un nou tub de silicagel o afegir 1 ml de fenol i 2 ml de cloroform-alcohol isoamílic en el mateix tub.
18. Agitar per immersió durant 5 minuts.
19. Centrifugar durant 7 minuts a 600 g a temperatura ambient.
20. Posar la part superior en un tub de 30 ml.

21. Afegir 0,67 ml d'acetat d'amoni 10 M (5X) per cada 2 ml de mostra.
22. Afegir 2,5 volums d'etanol al 95 %.
23. Invertir diverses vegades.
24. Deixar durant tota la nit a -20 °C o 45 minuts a -80 °C.
25. Centrifugar durant 30 minuts a temperatura ambient a 6700 g.
26. Llençar el sobrenedant i afegir 2 volums d'etanol al 70 % i agitar en el vórtex.
27. Centrifugar igual que en el punt 25.
28. Treure el sobrenedant i assecar el pellet d'ADN al buit.
29. Resuspendre en 300 µl o menys de TE en un eppendorf.
30. Incubar durant uns 10 minuts a 65 °C.
31. Fer un spin.
32. Diluir 1/50 vegades en TE i mesurar la DO a 260 nm i 280 nm, amb TE de blanc.
33. Calcular la concentració.
34. Guardar l'ADN a -20 °C.

Reactius i tampons necessaris:

**TAMPÓ DE LISI 1:**

10 mM TrisHCl pH 7.5  
10 mM NaCl  
3mM MgCl<sub>2</sub>  
S'autoclava.

**TAMPÓ DE LISI 2:**

400 mM TrisHCl pH 8  
100 mM EDTA pH 8  
1% SDS  
No s'autoclava l'SDS.

**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.

**PROTEÏNASA K:**

10 mg/ml en aigua bidestil.lada estèril

No s'autoclava.

**ACETAT D'AMONI:**

10 M Acetat d'amoni en aigua bidest. estèril.

Es filtra .

### **ANNEX 3**

#### **PROTOCOL DE PURIFICACIÓ I SEQÜENCIACIÓ D'ADN**

Abans de poder seqüenciar el producte de PCR és necessària la purificació del mateix. Per a tal fi, es va dur a terme el protocol de purificació *GeneClean II* amb algunes modificacions (Boyle i Lew, 1995) que es detalla a continuació:

1. Es parteix de 25 µl de producte de PCR que es posen en un tub *ependorf* de 500 µl de capacitat.
2. s'afegeixen 3 volums (75 µl) de NaI i 8 µl de *GLASSMILK*.
3. Deixar 5 minuts en gel barrejant cada minut per assegurar-se que la *GLASSMILK* estigui resuspesa.
4. Centrifugar 1 minut a 15000 g per precipitar la matriu de resina amb el DNA.
5. Abocar el sobrenedant sense apurar i tirar-lo (podria guardar-se) i comprovar que no queda ADN.
6. Resuspendre el pellet amb 10-15 volums de *NEW WASH* fred (200-700 µl, encara que amb 100 µl n'hi ha prou).
7. Centrifugar 1 minut a 15000 g i abocar el sobrenedant sense apurar.
8. Repetir els rentats amb *NEW WASH* dos cops més apurant el sobrenadant només l'últim cop.
9. Resuspendre el pellet en un volum d'H<sub>2</sub>O bidestilada estèril igual al de *GLASSMILK* (8 µl) per eluir el DNA i passar-lo a l'aigua.
10. Incubar a 55 °C de 2 a 3 minuts.
11. Centrifugar 1 minut a 15000 g i passar el sobrenedant a una altre *ependorf* (conté 80 % del ADN).



12. Pot fer-se una altra elució a la resina amb H<sub>2</sub>O bidestilada estèril per acabar d'extreure tot l'ADN de la PCR.

Reactius i tampons necessaris:

**Preparació de la GLASSMILK:**

1. Barrejar 10 gr de sílica (*Sigma* ref. S-5631) amb 100 ml de sèrum salí (0.9% p/v de NaCl).
2. Es deixa reposar la suspensió durant 2 hores perquè precipiti la sílica.
3. Es tira el sobrenedant.
4. Es repeteix el rentat amb sèrum salí.
5. Es centrifuga 2 minuts a 2000 g i es tira el sobrenedant .
6. Es resuspén el pellet en NaI 3M i es dissol a 100 mg/ml.
7. Es guarda la suspensió de sílica a 4 °C preservant-la de la llum.

**NEW WASH:**

50 mM NaCl.

10 mM Tris Hcl pH 7.5.

2.5 mM EDTA.

50 % v/v etanol.

Un cop purificat el producte de PCR es va procedir a la seqüenciació. Per a tal fi, primerament es va fer una comprovació del rendiment del protocol *GeneClean II* carregant 5 µl del producte purificat en un gel d'agarosa al 1 %.

La seqüenciació es va portar a terme mitjançant el kit *Perkin Elmer ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With Ampli Taq DNA Polymerase, FS*.

El contingut de la *mix* per a la PCR va ser:

4 µl de *Terminator Ready Mix*.

1.5 µl de producte de PCR purificat.

3.2 µl d'un oligonucleotid de la parella a una concentració de 1 pmol/µl.

11.3 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estèril (20 µl de volum total de reacció).

Es van fer 2 *mix*, una per al *primer forward* i l'altre per al *primer reverse*, els temps i les temperatures utilitzats en la PCR van ser:

96 °C	10''	} x 25
50 °C	5''	
60 °C	4'	

A continuació els productes d'extensió eren purificats i precipitats amb etanol de la següent manera:

1. Traspasar el producte de la PCR de seqüenciació a un *eppendorf* gran (1.5 ml).
2. Afegir-hi 2 µl d'acetat de sodi 3M pH 4.6 i 50 µl d'etanol 95 %.
3. Agitar amb vòrtex i posar en gel 10 minuts.
4. Centrifugar a 15000 g (4 °C) durant 30 minuts.
5. Retirar l'etanol amb una micropipeta apurant un mica.
6. Resuspendre el pellet en 250 µl d'etanol al 70 %.
7. Centrifugar a 15000 g durant 10 minuts.
8. Apurar al màxim l'etanol sobrenedant amb una micropipeta.
9. Assecar el pellet a l'estufa a 80 °C (amb la porta oberta).

Les mostres així preparades eren seqüenciades mitjançant un analitzador de fragments *ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer*.

## **ANNEX 4**

### **ANÀLISI DEL DESEQUILIBRI EN LA TRANSMISSIÓ (TDT) EN EL GEN FVII I EN ELS CLUSTERS GÈNICS DEL FIBRINOGEN I LES INTEGRINES PLAQUETÀRIES**

En les tres taules, N: número de famílies incloses en el test; Var (O-E): variança de les transmissions observades menys les esperades; g.ll.: graus de llibertat; p exacta: significació del test exacte.

## FVII

MARCADORS	N	Al·lel / Haplotip	Freqüència	Transmissions Observades	Transmissions Esperades	Var (O-E)	Estadístic TDT ( $\chi^2$ )	g. ll.	p exacta
· -323 10 pb INS/DEL	88	I	0.1831	32	32.38	12.012	0.0120	1	0.9152
		D	0.8169	150	149.62	12.012	0.0120	1	0.9152
		Global					0.0120	1	0.9152
· HVR4	87	H7	0.3274	60	58.06	15.785	0.2391	1	0.6173
		H6	0.6664	119	120.85	15.779	0.2171	1	0.629
		H5	0.0063	1	1.09	0.4941	0.0171	1	0.7949
		Global					0.2468	2	0.8772
· -323 10 pb INS/DEL  · HVR4	87	I·H7	0.1126	19.02	19.63	7.7816	0.0473	1	0.8173
		D·H7	0.2133	40.98	38.18	12.774	0.6136	1	0.4024
		I·H6	0.0669	11.98	11.66	4.5695	0.0226	1	0.875
		D·H6	0.6009	107.02	109.44	17.462	0.3349	1	0.5452
		D·H5	0.0063	1	1.10	0.49368	0.0187	1	0.7869
		Global					0.7085	4	0.946

## FGB i FGA

MARCADORS	N	Al·lel / Haplotip	Freqüència	Transmissions Observades	Transmissions Esperades	Var (O-E)	Estadistic TDT ( $\chi^2$ )	g. ll.	p exacta
· FGB <i>Hind</i> III	88	Hd1	0.8158	153.00	148.80	10.9770	1.6098	1	0.2244
		Hd2	0.1842	29.00	33.20	10.9770	1.6098	1	0.2244
		Global					1.6098	1	0.2244
· FGB <i>Bcl</i> I	79	B1	0.1464	21.00	23.04	7.4185	0.5580	1	0.4671
		B2	0.8536	137.00	134.97	7.4185	0.5580	1	0.4671
		Global					0.5580	1	0.4671
· FGA <i>Taq</i> I	88	T1	0.2139	40.00	38.44	11.7440	0.2071	1	0.6461
		T2	0.7861	142.00	143.56	11.7440	0.2071	1	0.6461
		Global					0.2071	1	0.6461
· FGB <i>Hind</i> III · FGB <i>Bcl</i> I	88	Hd1.B1	0.0068	1.10	1.21	0.4888	0.0249	1	0.8252
		Hd2.B1	0.1448	22.87	25.60	8.1819	0.9121	1	0.3494
		Hd1.B2	0.8107	151.90	148.00	11.0650	1.3773	1	0.2721
		Hd2.B2	0.0377	6.13	7.19	2.8925	0.3897	1	0.5799
		Global					1.3899	3	0.736
· FGB <i>Bcl</i> I · FGA <i>Taq</i> I	88	B1.T1	0.0149	1.58	2.64	0.5868	1.9290	1	0.0821
		B2.T1	0.1989	38.42	35.79	10.5110	0.6575	1	0.4477
		B1.T2	0.1365	23.03	24.16	6.7154	0.1884	1	0.6756
		B2.T2	0.6497	118.97	119.41	14.0620	0.0138	1	0.9092
		Global					2.9381	3	0.3917
· FGB <i>Hind</i> III · FGA <i>Taq</i> I	88	Hd1.T1	0.1924	37.26	34.60	10.2510	0.6913	1	0.4286
		Hd2.T1	0.0215	2.74	3.87	0.9233	1.3746	1	0.2179
		Hd1.T2	0.6254	115.74	114.60	16.2620	0.0796	1	0.7894
		Hd2.T2	0.1606	26.26	28.93	9.3455	0.7645	1	0.4289
		Global					2.4531	3	0.5282
· FGB <i>Hind</i> III · FGB <i>Bcl</i> I · FGA <i>Taq</i> I	88	Hd1.B1.T1	0.0025	0.04	0.44	0.0271	6.0607	1	0.5386
		Hd2.B1.T1	0.0149	1.91	2.64	0.6327	0.8295	1	0.4065
		Hd1.B2.T1	0.1898	37.32	34.17	9.6066	1.0333	1	0.4263
		Hd2.B2.T1	0.0066	0.73	1.18	0.2380	0.8645	1	0.3762
		Hd1.B1.T2	0.0043	1.06	0.77	0.1597	0.5498	1	0.4599
		Hd2.B1.T2	0.1288	20.82	22.81	7.3861	0.5357	1	0.5256
		Hd1.B2.T2	0.6221	114.58	114.02	16.0340	0.0193	1	0.9052
		Hd2.B2.T2	0.0309	5.54	5.97	2.1818	0.0847	1	0.7921
		Global					0.0000		1

## GPIIIa i GPIIb

MARCADORS	N	Al·lel / Haplotip	Freqüència	Transmissions Observades	Transmissions Esperades	Var (O-E)	Estadístic TDT ( $\chi^2$ )	g. ll.	p exacta
· GPIIIa (CT) <sub>n</sub> (158-166) pb = 1 (168-178) pb = 2 (180-196) pb = 3	80	1	0.2563	41.00	42.09	16.3770	0.0721	1	0.7901
		2	0.5745	97.00	95.29	20.2940	0.1448	1	0.6726
		3	0.1692	28.00	28.63	12.1170	0.0325	1	0.8535
		Global					0.1451	2	0.9252
· GPIIIa TaqI	88	T1	0.3825	69.00	69.50	16.5690	0.0154	1	0.9113
		T2	0.6175	113.00	112.50	16.5690	0.0154	1	0.9113
		Global					0.0154	1	0.9113
· GP 9bp INS/DEL	87	I	0.6834	126.00	124.13	15.6030	0.2237	1	0.6331
		D	0.3166	54.00	55.87	15.6030	0.2237	1	0.6331
		Global					0.2237	1	0.6331
· GPIIIa (CT) <sub>n</sub> (158-166) pb = 1 (168-178) pb = 2 (180-196) pb = 3  · GPIIIa TaqI	80	1.T1	0.2174	36.42	35.84	13.9280	0.0240	1	0.8831
		2.T1	0.1483	24.45	25.33	10.3490	0.0735	1	0.7692
		3.T1	0.0173	2.12	2.81	1.1945	0.3927	1	0.5306
		1.T2	0.0356	4.58	5.74	2.1612	0.6251	1	0.4294
		2.T2	0.4269	72.55	70.02	18.1520	0.3515	1	0.5341
		3.T2	0.1545	25.88	26.26	11.1800	0.0133	1	0.9046
		Global					1.1809	5	0.946
· GPIIIa TaqI  · GPIIb 9 pb INS/DEL	87	T1.I	0.2705	50.00	48.96	14.3270	0.0760	1	0.8028
		T2.I	0.4110	76.00	74.80	16.1950	0.0899	1	0.7584
		T1.D	0.1204	19.00	21.24	7.6133	0.6594	1	0.4371
		T2.D	0.1982	35.00	35.01	10.9330	0.0000	1	0.9984
		Global					0.6718	3	0.8821
· GPIIIa (CT) <sub>n</sub> (158-166) pb = 1 (168-178) pb = 2 (180-196) pb = 3  · GPIIb 9 pb INS/DEL	79	<a href="#">1.I</a>	0.1710	28.65	27.58	10.3440	0.1110	1	0.7434
		<a href="#">2.I</a>	0.3916	66.82	65.15	17.0190	0.1637	1	0.645
		<a href="#">3.I</a>	0.1179	18.53	20.18	8.1376	0.3320	1	0.5254
		<a href="#">1.D</a>	0.0833	12.35	13.69	5.1148	0.3483	1	0.569
		<a href="#">2.D</a>	0.1865	29.18	29.54	10.8560	0.0120	1	0.9041
		<a href="#">3.D</a>	0.0497	8.47	7.87	3.0297	0.1183	1	0.7067
		Global					1.1442	5	0.9318
· GPIIIa (CT) <sub>n</sub> (158-166) pb = 1 (168-178) pb = 2 (180-196) pb = 3  · GPIIIa TaqI  · GPIIb 9 pb INS/DEL	79	1.T1.I	0.1535	25.75	24.82	9.7333	0.0889	1	0.7739
		2.T1.I	0.0955	16.66	16.59	6.4927	0.0008	1	0.9754
		3.T1.I	0.0180	2.33	2.93	1.1610	0.3048	1	0.5891
		1.T2.I	0.0125	1.79	1.98	0.5182	0.0668	1	0.7904
		2.T2.I	0.2945	51.09	48.27	13.4430	0.5942	1	0.4042
		3.T2.I	0.1002	16.37	17.30	6.8332	0.1249	1	0.6884
		1.T1.D	0.0667	10.78	10.99	4.5783	0.0094	1	0.9251
		2.T1.D	0.0560	7.48	8.88	3.5412	0.5526	1	0.4544
		1.T2.D	0.0205	2.67	3.33	0.9181	0.4663	1	0.5402
		2.T2.D	0.1306	20.77	20.69	7.3321	0.0008	1	0.9783
		3.T2.D	0.0519	8.29	8.23	3.1712	0.0012	1	0.9664
		Global					1.6163	10	0.9973

## **LLISTAT DE FIGURES**

### **I. INTRODUCCIÓ**

- I.1. Classificació de les malalties cardiovasculars d'origen ateroscleròtic.
- I.2. Localització de les artèries coronàries al miocardi.
- I.3. Estructura d'una artèria coronària.
- I.4. Micrografia electrònica de la superfície d'una lesió arterial en la que s'observen macròfags recoberts d'agregats plaquetaris.
- I.5. Plaques d'ateroma.
- I.6. Processos de coagulació i fibrinolisi.
- I.7. Procés d'anticoagulació.
- I.8. Estructura del factor de coagulació VII humà.
- I.9. Estructura del gen del factor VII humà.
- I.10. Estructura del fibrinogen humà.
- I.11. Estructura dels gens FGA i FGB ( $\alpha$  i  $\beta$  fibrinogen) humans.
- I.12. Glucoproteïna plaquetària IIb/IIIa humana.
- I.13. Estructura dels gens GPIIIa i GPIIb humans.
- I.14. Estructura de l'activador tissular del plasminogen humà.
- I.15. Estructura del gen PLAT humà.
- I.16. Estructura de l'inhibidor tipus 1 de l'activador del plasminogen humà.
- I.17. Estructura del gen PAI-1 humà.

### **III. MATERIAL I MÈTODES**

- III.1. Localització geogràfica de les mostres poblacionals utilitzades.
- III.2. Seqüència d'un al·lel H7 del polimorfisme FVII HVR4.
- III.3. Fotografies de gels d'electroforesi utilitzats en l'anàlisi del VNTR del FVII i les insercions / delecions presents a FVII, GPIIb i PLAT.
- III.4. Fotografies de gels d'electroforesi utilitzats en l'anàlisi dels RFLPs presents a FGA, FGB, GPIIIa i PAI-1.
- III.5. Electroforogrames resultants de l'electroforesi per l'anàlisi dels microsatèl·lits presents a PLAT, GPIIIa i PAI-1.

- III.6. Fotografia de gel d'anàlisi per SSCP del polimorfisme GPIIb 3063C→T.  
III.7. Associació al·lèlica completa entre els marcadors 9 pb INS/DEL i 3063 C→T al gen GPIIb.

## IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### PART 1. ESTUDI POBLACIONAL

- IV.1. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII a les mostres estudiades.  
IV.2. Freqüències haplotípiques estimades al gen FVII en les mostres analitzades.  
IV.3. Arbre neighbor-joining per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII.  
IV.4. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors FGB *HindIII*, FGB *BclI* i FGA *TaqI* a les mostres estudiades.  
IV.5. Freqüències haplotípiques al *cluster* gènic del fibrinogen.  
IV.6. Arbre neighbor-joining per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes FGB *HindIII*, FGB *BclI* i FGA *TaqI*.  
IV.7. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors GPIIIa *TaqI* i GPIIb 9 pb INS/DEL a les mostres estudiades.  
IV.8. Freqüències haplotípiques estimades al *cluster* gènic GPIIIa - GPIIb.  
IV.9. Arbre neighbor-joining per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes GPIIIa *TaqI* i GPIIb 9 pb INS/DEL.  
IV.10. Distribució de les freqüències al·lèliques dels marcadors PLAT TPA25 i PAI-1 *HindIII* a les mostres estudiades.  
IV.11. Representació gràfica de les relacions genètiques entre les poblacions estudiades, excepte Cabras, en base a tots els polimorfismes analitzats.  
IV.12. Representació gràfica de les relacions genètiques entre totes les poblacions estudiades en base a tots els polimorfismes analitzats excepte per a FVII HVR4.

### PART 2. ESTUDI EPIDEMIOLÒGIC

- IV.13. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes analitzats en el gen FVII a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.



- IV.14. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes analitzats en el *cluster* gènic del fibrinogen a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.15. Distribució de les freqüències al·lèliques del STR GPIIIa (CT)<sub>n</sub> a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.16. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes GPIIIa *TaqI* i GPIIb 9 pb INS/DEL a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.17. Distribució de les freqüències al·lèliques del STR PLAT (TG)<sub>14</sub> (TA)<sub>12</sub> a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.18. Distribució de les freqüències al·lèliques del STR PLAT (CA)<sub>15</sub> C(TC)<sub>10</sub> a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.19. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme PLAT TPA25 a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.20. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes (CA)<sub>n</sub> i *HindIII* del gen PAI-1 a la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.21. Representació de les freqüències haplotípiques inequívokes al gen FVII en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.22. Representació de les freqüències haplotípiques inequívokes al *cluster* gènic del fibrinogen en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.23. Representació de la distribució dels haplotips més freqüents al *cluster* gènic GPIIIa - GPIIb en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.24. Representació de la distribució dels haplotips més freqüents al gen PLAT en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.25. Representació de les freqüències haplotípiques inequívokes al gen PAI-1 en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.

## **LLISTAT DE TAULES**

### **I. INTRODUCCIÓ**

I.1. Estudis d'associació realitzats amb els polimorfismes utilitzats en el present treball.

### **III. MATERIAL I MÈTODES**

- III.1. Composició de les famílies que formen part de l'estudi.
- III.2. Distribució per sexes i rangs d'edat del total d'individus que integren les famílies que han participat al present estudi.
- III.3. Resum de les dades (obtingudes mitjançant el qüestionari) sobre els antecedents personals i familiars dels 101 malalts de Cardiopatia Isquèmica mostrejats.
- III.4. Oligonucleòtids utilitzats i condicions d'amplificació per al VNTR del FVII i les insercions / delecions presents a FVII, GPIIb i PLAT.
- III.5. Condicions de migració en l'electroforesi del VNTR del FVII i de les insercions / delecions presents a FVII, GPIIb i PLAT.
- III.6. Oligonucleòtids utilitzats i condicions d'amplificació per als RFLPs presents als gens FGA, FGB, GPIIIa i PAI-1.
- III.7. Condicions de digestió i migració electroforètica per als RFLPs presents als gens FGA, FGB, GPIIIa i PAI-1.
- III.8. Oligonucleòtids utilitzats i condicions d'amplificació per als microsatèl·lits presents als gens PLAT, GPIIIa i PAI-1.

### **IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

#### **PART 1. ESTUDI POBLACIONAL**

- IV.1. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII a les mostres estudiades.
- IV.2. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador -323 10 pb INS/DEL del gen FVII.

- IV.3. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador HVR4 del gen FVII.
- IV.4. Diversitat gènica en base als marcadors -323 10 pb INS/DEL i HVR4 entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.
- IV.5. Freqüències al·lèliques del polimorfisme -323 10 pb INS/DEL.
- IV.6. Freqüències al·lèliques del polimorfisme HVR4.
- IV.7. Distribució de les freqüències haplotípiques estimades per al gen FVII en les mostres analitzades.
- IV.8. Diferenciació entre parells de poblacions basada en haplotips del gen FVII.
- IV.9. Diversitat gènica en base a haplotips del gen FVII entre les mostres agrupades en funció del seu origen geogràfic.
- IV.10. Matriu de distàncies de Reynolds per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes -323 10 pb INS/DEL i HVR4 del gen FVII.
- IV.11. Desequilibri de lligament dins del gen FVII a les mostres estudiades.
- IV.12. Anàlisi dels components de la variança del desequilibri de lligament en les poblacions analitzades en base al gen FVII.
- IV.13. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes analitzats en els gens FGB i FGA a les mostres estudiades.
- IV.14. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador *HindIII* del gen FGB.
- IV.15. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador *BclI* del gen FGB.
- IV.16. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador *TaqI* del gen FGA.
- IV.17. Diversitat gènica en base als marcadors FGB *Hind III*, FGB *Bcl I*, i FGA *Taq I* entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.
- IV.18. Freqüències al·lèliques del polimorfisme FGB *HindIII*.
- IV.19. Freqüències al·lèliques del polimorfisme FGB *BclI*.
- IV.20. Freqüències al·lèliques del polimorfisme FGA *TaqI*.
- IV.21. Distribució de les freqüències haplotípiques estimades per al *cluster* gènic del fibrinogen en les mostres analitzades.
- IV.22. Diferenciació entre parells de poblacions basada en haplotips del *cluster* gènic del fibrinogen.

- IV.23. Diversitat gènica en base a haplotips del *cluster* gènic del fibrinogen entre les mostres agrupades en funció del seu origen geogràfic.
- IV.24. Matriu de distàncies de Reynolds per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes FGB *Hind* III, FGB *Bcl* I i FGA *Taq* I.
- IV.25. Desequilibri de lligament dins del *cluster* gènic del fibrinogen a les mostres estudiades.
- IV.26. Anàlisi dels components de la variança del desequilibri de lligament en les poblacions analitzades en base als gens FGB i FGA.
- IV.27. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes GPIIIa *Taq*I i GPIIb 9 pb INS/DEL a les mostres estudiades.
- IV.28. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador GPIIIa *Taq* I.
- IV.29. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador GPIIb 9 pb INS/DEL.
- IV.30. Diversitat gènica en base als marcadors GPIIIa *Taq* I i GPIIb 9 pb INS/DEL entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.
- IV.31. Freqüències al·lèliques del polimorfisme GPIIIa *Taq* I.
- IV.32. Freqüències al·lèliques del polimorfisme GPIIb 9 pb INS/DEL.
- IV.33. Distribució de les freqüències haplotípiques estimades per als gens GPIIIa i GPIIb en les mostres analitzades.
- IV.34. Diferenciació entre parells de poblacions basada en haplotips del *cluster* gènic GPIIIa - GPIIb.
- IV.35. Diversitat gènica en base a haplotips del *cluster* gènic GPIIIa - GPIIb entre les mostres agrupades en funció del seu origen geogràfic.
- IV.36. Matriu de distàncies de Reynolds per a les poblacions estudiades en base als polimorfismes GPIIIa *Taq* I i GPIIb 9 pb INS/DEL.
- IV.37. Desequilibri de lligament entre els marcadors GPIIIa *Taq*I i GPIIb 9 pb INS/DEL a les mostres estudiades.
- IV.38. Distribució de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes PLAT TPA25 i PAI-1 *Hind* III a les mostres estudiades.
- IV.39. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador PLAT TPA25.
- IV.40. Diferenciació entre parells de poblacions per al marcador PAI-1 *Hind* III.
- IV.41. Diversitat gènica en base als marcadors PLAT TPA25 i PAI-1 *Hind* III entre les mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.

- IV.42. Freqüències al·lèliques del polimorfisme PLAT TPA25.
- IV.43. Freqüències al·lèliques del polimorfisme PAI-1 *Hind* III.
- IV.44. Matriu de distàncies de Reynolds ( $\pm$  error de la distància) en base a tots els polimorfismes analitzats en totes les poblacions estudiades excepte Cabras.
- IV.45. Matriu de distàncies de Reynolds ( $\pm$  error de la distància) en el total de les poblacions estudiades en base a tots els polimorfismes analitzats excepte per a FVII HVR4.
- IV.46. Diversitat gènica en base als 9 marcadors entre les 6 mostres mediterrànies agrupades sota un criteri geogràfic.

## **PART 2. ESTUDI EPIDEMIOLÒGIC**

- IV.47. Freqüències haplotípiques inequívokes per al gen FVII en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.48. Freqüències haplotípiques inequívokes per al *cluster* gènic del fibrinogen en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.49. Freqüències haplotípiques inequívokes per al *cluster* gènic GPIIIa - GPIIb en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.50. Freqüències haplotípiques inequívokes per al gen PLAT en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.51. Freqüències haplotípiques inequívokes per al gen PAI-1 en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.52. Desequilibri de lligament al gen FVII en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.53. Desequilibri de lligament al *cluster* gènic del fibrinogen en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.54. Desequilibri de lligament al *cluster* gènic de les integrines plaquetàries en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.55. Desequilibri de lligament al gen PLAT en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.56. Desequilibri de lligament al gen PAI-1 en la mostra de famílies nuclears amb fills afectats per CAI.
- IV.57. Resultats del test de desequilibri de la transmissió (TDT) en al·lells i combinacions haplotípiques dels marcadors estudiats en el gen PLAT.

- IV.58. Resultats del test de desequilibri de la transmissió (TDT) en les agrupacions d'al·lels i combinacions haplotípiques de les mateixes en els marcadors estudiats en el gen PLAT.
- IV.59. Resultats del test de desequilibri de la transmissió (TDT) en els al·lels, agrupacions d'al·lels i combinacions haplotípiques dels mateixos dels marcadors estudiats en el gen PAI-1.
- IV.60. Mitjanes dels nivells plasmàtics dels paràmetres lipídics estudiats en pares i fills afectats.
- IV.61. Covariables amb efecte significatiu sobre els paràmetres lipídics estudiats i percentatge de la variabilitat explicada per les mateixes.
- IV.62. Resultats de les anàlisis de la varianza per a la detecció d'efectes gènics significatius de les 5 regions cromosòmiques estudiades sobre els paràmetres lipídics considerats.
- IV.63. Anàlisis de la varianza per a la detecció d'efectes dels genotips i de les combinacions d'haplotips del gen FVII sobre els nivells sèrics de triglicèrids.
- IV.64. Anàlisis de la varianza per a la detecció d'efectes dels genotips i de les combinacions d'haplotips del gen FVII sobre els nivells sèrics de HDL- C.
- IV.65. Anàlisis de la varianza per a la detecció d'efectes dels genotips i de les combinacions d'haplotips del gen FVII sobre els nivells sèrics d' ApoB.

#### **ANNEX 4**

Anàlisi del desequilibri en la transmissió (TDT) en el gen FVII i en els *clusters* gènics del fibrinogen i les integrines plaquetàries.

## **ABREVIATURES**

- ADN= Àcid Desoxirribonucleic.
- AMI= *Acute Myocardial Infarction* (infart agut de miocardi).
- AP= *Angina pectoris* (angina de pit).
- ARN= Àcid Ribonucleic.
- ARNm= ARN missatger.
- BMI= *Body Mass Index* (índex de massa corporal).
- CAD= *Coronary Artery Disease* (malaltia arterial coronària).
- CAI= Cardiopatia Isquèmica.
- CAM= *Cell Adhesion Molecule* (molècula d'adherència cel·lular).
- CHD= *Coronary Heart Disease* (malaltia coronària).
- EGF= *Epidermal Growth Factor* (factor de creixement epidèrmic).
- F<sub>1+2</sub>= fragment protrombina 1+2 .
- FGA= Alfa Fibrinogen.
- FGB= Beta Fibrinogen.
- FIXP= Pèptid d'activació del factor IX.
- FPA= Fibrinopèptid A.
- FPB= Fibrinopèptid B.
- FVII:C= Activitat coagulant del factor VII.
- FVII= Factor VII de la coagulació.
- FXP= Pèptid d'activació del factor X de la coagulació.
- GPIIb= Glucoproteïna IIb.
- GPIIIa= Glucoproteïna IIIa.
- HDL= *High Density Lipoprotein* (lipoproteïna d'alta densitat).
- HDL-C= HDL colesterol.
- HMK= *High Molecular Weight Kininogen* (cininogen d'alt pes molecular).
- HNF-1= *Hepatocyte Nuclear Factor-1* (factor nuclear 1 de l'hepatòcit).
- HNF-4= *Hepatocyte Nuclear Factor-4* (factor nuclear 4 de l'hepatòcit).
- HVR4= *Hypervariable Region-4* (regió hipervariable 4).
- IHD= *Ischaemic Heart Disease* (cardiopatia isquèmica).
- IL-1= Interleucina 1.
- IL-6= Interleucina 6.
- INS/DEL= Inserció/Deleció.
- kb= kilobases.

kDa= kiloDaltons.

LDL= *Low Density Lipoprotein* (lipoproteïna de baixa densitat).

LDL-C= LDL colesterol.

Lp(a)= Lipoproteïna (a).

MI= *Myocardial Infarction* (infart de miocardi).

NIDDM= *Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (diabetes mellitus no dependent d'insulina).

PAF= *Platelet-Activating Factor* (factor activador de plaquetes).

PAI-1= *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (inhibidor tipus 1 de l'activador del plasminogen).

pb= parells de bases.

PCR= *Polymerase Chain Reaction* (reacció en cadena de la polimerasa).

PDGF= *Platelet-Derived Growth Factor* (factor de creixement derivat de plaquetes).

PLAT= *Plasminogen Activator, Tissue* (activador tissular del plasminogen).

PM= Pes Molecular.

r.r.= Risc relatiu.

RFLP= *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfisme de longitud dels fragments de restricció).

SERPIN= *Serine Protease Inhibitor* (inhibidor de proteases de serina).

SNP= *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfisme de canvi nucleotídic simple).

SSCP= *Single Strand Chain Polymorphism* (polimorfisme de cadena senzilla).

STRs= *Short Tandem Repeats* (repeticions curtes en tàndem).

TF= *Tissue Factor* (factor tissular).

TFPI= *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (inhibidor de la via del factor tissular).

TGF $\beta$ = *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (factor transformador del creixement  $\beta$ ).

TNF= *Tumor Necrosis Factor* (factor de necrosi tumoral).

t-PA= *Tissue type Plasminogen Activator* (activador tissular del plasminogen).

UK= *United Kingdom* (Regne Unit).

u-PA= *Urokinase type Plasminogen Activator* (activador del plasminogen tipus uroquinasa).

USA= *United States of America* (Estats Units d'Amèrica).

VLDL= *Very Low Density Lipoprotein* (lipoproteïna de molt baixa densitat).

VNTR= *Variable Number of Tandem Repeats* (nombre variable de repeticions en tàndem).

vWF= *von Willebrand Factor* (factor von Willebrand).



**BIBLIOGRAFIA**

Aguirre A., Vicario A., Mazon L., Estomba A., Martínez de Pancorbo M., Arrieta-Pico V., Perez-Elortondo F., Lostao C.M. (1991); Are the basques a single and unique population? *Am J Hum Genet.* 49:450-8.

Albright G.L., Andreassi J.L., Steiner S.S. (1988); Interactive effects of type A personality and psychological and physical stressors on human cardiovascular functions. *J Psychophys.* 6:315-26.

Anderson G.M., Shaw A.R., Shafer J.A. (1993); Functional Characterization of Promoter Elements Involved in Regulation of Human  $\alpha$ -Fibrinogen Expression evidence for binding novel activator and repressor proteins. *J Biol Chem.* 268(30):22650-5.

Anderson J.L., King G.J., Bair T.L., Elmer S.P., Muhlestein J.B., Habashi J., Carlquist J.F. (1999); Associations Between a Polymorphism in the Gene Encoding Glycoprotein IIIa and Myocardial Infarction or Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology.* 33(3):727-33.

Arnaiz-Villena A., Martínez-Laso J., Gómez-Casado E., Díaz-Campos M., Santos P., Martinho A., Breda-Coimbra H. (1997); Relatedness among Basques, Portuguese, Spaniards and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics.* 47:37-43.

Arnaiz-Villena A., Benmamar D., Alvarez M., Díaz-Campos M., Varela P., Gómez-Casado E., Martínez-Laso J. (1995); HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques. *Hum Immunol.* 43:259-68.

Arndt-Jovin D.J., Udvardy A., Garner M.M., Ritter S., Jovin T.M. (1993); Z-DNA binding and inhibition by GTP of *Drosophila* topoisomerase II. *Biochemistry.* 32(18):4862-72.

Barbujani G., Magagni A., Minch E., Cavalli-Sforza L.L. (1997); An apportionment of human DNA diversity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(9):4516-9.

Barbujani G., Pilastro A., De Domenico S., Renfrew C. (1994); Genetic variation in North Africa and Eurasia: Neolithic demic diffusion vs Paleolithic Colonisation. *Am J Phys Anthropol.* 95:137-54.

BEC (2000); Anàlisi de la mortalitat a Catalunya, 1988\*. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya.* XXI(10):141-55.

Behague I., Poirier O., Nicaud V., Evans A., Arveiler D., Luc G., Cambou J.P., Scarabin P.Y., Bara L., Green F.R., et al (1996); Fibrinogen Gene Polymorphisms Are Associated With Plasma Fibrinogen and Coronary Artery Disease in Patients With Myocardial Infarction The ECTIM Study. *Circulation.* 93:440-9.

Benza R.L., Grenett H., Li X.N., Reeder V.C., Brown S.L., Go R.C., Hanson K.A., Perry G.J., Holman W.L., McGiffin D.C., et al (1998a); Gene polymorphisms for PAI-1 are associated with the angiographic extent of coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis.* 5(2):143-50.

Benza R.L., Grenett H., Bourge R.C., Kirklin J.K., Naftel D.C., Castro P.F., McGiffin D.C., George J.F., Booyse F.M. (1998b); Gene polymorphisms for plasminogen activator inhibitor-1/tissue plasminogen activator and development of allograft coronary artery disease. *Circulation.* 98:2248-54.

Berg K., Kierulf P. (1989); DNA polymorphisms at fibrinogen loci and plasma fibrinogen concentration. *Clinical Genetics.* 36:229-35.

- Bernardi F., Arcieri P., Bertina R.M., Chiarotti F., Corral J., Pinotti M., Prydz H., Samama M., Sandset P.M., Strom R., et al (1997); Contribution of factor VII genotype to activated FVII levels. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 17:2548-53.
- Bertranpetit J., Cavalli-Sforza L.L. (1991); A genetic reconstruction of the history of the population of the Iberian Peninsula. *Ann Hum Genet*. 55:51-67.
- Bijnens A.P., Gils A., Knockaer I., Stassen J.M., Declerck P.J. (2000); Importance of the hinge region between -helix F and the main part of serpins, based upon identification of the epitope of plasminogen activator inhibitor type 1 neutralizing antibodies. *J Biol Chem*. 275(9):6375-80.
- Black W.C., Krafusur E.S. (1985); A frotran program for analysis of genotypic frequencies and description of the breeding structure of populations. *Theor Appl Genet*. 70:848-490.
- Bohringer S., Epplen J.T., Krawczak M. (2000); Genetic association studies of bronchial asthma - a need for Bonferroni correction? *Hum Genet*. 107:197
- Bosch E., Calafell F., Comas D., Oefner P.J., Underhill P.A., Bertranpetit J. (2001); High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet*. 68:1019-29.
- Bosch E., Calafell F., Perez-Lezaun A.J., Clarimon J., Comas D., Mateu E., Martinez-Arias R., Morera B., Brakez Z., et al. (2000); Genetic structure of northwestern Africa revealed by STR analysis. *Eur J Hum Genet*. 8:360-6.
- Bosch E., Calafell F., Santos F.R., Perez-Lezaun A.J., Comas D., Benchemsi N., Tyler-Smith C., Bertranpetit J. (1999); STR variation is deeply structured by genetic background on the human Y chromosome. *Am J Hum Genet*. 65:1623-38.
- Bosma P.J., van den Berg E.A., Kooistra T. (1988); Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. *J Biol Chem*. 263(19):9129-41.
- Boyle J.S., Lew A.M. (1995); An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics*. 11(1):8
- Calderon R., Vidales C., Peña J.A., Pérez-Miranda A., Dogoujon J.M. (1998); Immunoglobulin allotypes (GM and KM) in basques from Spain: approach to the origin of the basque population. *Hum Biol*. 70:667-98.
- Calvete J.J. (1999); Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med*. 222(1):29-38.
- Cavalli-Sforza LL. (1997); Genes, pueblos y lenguas. Barcelona: Crítica.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. (1994); The history and geography of human genes. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Chadarevian R., Bruckert E., Dejager S., Presberg P., Turpin G. (1999); Relationship between triglycerides and factor VIIc and plasminogen activator inhibitor type-1: lack of threshold value. *Thromb Res*. 96(3):175-82.
- Clayton D. (1999a); An extended TDT test for uncertain haplotypes. *Am J Hum Genet*. 65:1170-7.
- Clayton D., Jones H. (1999b); TDT test for extended marker haplotypes. *Am J Hum Genet*. 65:1161-9.
- Collen D, Lijnen HR. (1998); Haber E, editors. Medicina cardiovascular molecular. Barcelona: Scientific American, Inc. Traducció espanyola: Medical Trends, SL, 9, Agentes trombolítics. p. 110-1.

- Comas D., Calafell F., Benchemsi N., Helal A., Lefranc G., Stoneking M., Batzer M.A., Bertranpetit J., Sajantilla A. (2000); *Alu* insertions polymorphisms in northwestern Africa and in the Iberian Peninsula: evidence for a strong genetic boundary through the Gibraltar Strait. *Hum Genet.* 107:312-9.
- Comas D., Mateu E., Calafell F., Perez-Lezaun A.J., Bosch E., Martinez-Arias R., Bertranpetit J. (1998); HLA class I and class II DNA typing and the origin of Basques. *Tissue Antigens* . 51:30-40.
- Connor J.M., Fowkes F.G.R., Wood J., Smith F.B., Donnan P.T., Lowe G.D.O. (1992); Genetic variation at fibrinogen loci and plasma fibrinogen levels. *J Med Genet.* 29(7):480-2.
- Cook D.G., Cappuccio F.P., Atkinson R.W., Wicks P.D., Chitolie A., Nakandakare E.R., Sagnella G.A., Humphries S.E. (2001); Ethnic differences in fibrinogen levels: the role of environmental factors and the beta fibrinogen gene. *Am J Epidemiol.* 153(8):799-806.
- Cook N.S., Ubben D. (1990); Fibrinogen as a major risk factor in cardiovascular disease. *TiPS.* 11:444-51.
- Courtois G., Morgan J.G., Campbell L.A., Fourel G., Crabtree G.R. (1987); Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and  $\alpha_1$ -antitrypsin promoters. *Science.* 238:688-92.
- Crandall K.A., Templeton A.R. (1993); Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics.* 134:959-69.
- Dalmon J., Laurent M., Courtois G. (1993); The human fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element. *Molecular and Cellular Biology.* 13(2):1183-93.
- Dawson S., Hamsten A., Wiman B., Henney A., Humphries S. (1991); Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 11:183-90.
- de Knijff P., Green F., Johansen L.G., Grootendorst D., Temple A., Cruickshank J.K., Humphries S.E., Jespersen J., Klufft C. (1994); New alleles in F7 VNTR. *Human Molecular Genetics.* 3(2):384
- de Maat M.P., Bladbjerg E.M., Johansen L.G., de Knijff P., Gram J., Klufft C., Jespersen J. (1999); DNA-Polymorphisms and plasma levels of vascular disease risk factors in Greenland Inuit. Is there a relation with the low risk of cardiovascular disease in the inuit? *Thromb Haemost.* 81(4):547-52.
- de Maat M.P., Green F., de Knijff P., Jespersen J., Klufft C. (1997); Factor VII polymorphisms in populations with different risks of cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 17:1918-23.
- de Maat M.P., de Bart A.C., Hennis B.C., Meijer P., Havelaar A.C., Mulder P.G., Klufft C. (1996); Interindividual and intraindividual variability in plasma fibrinogen, TPA antigen, PAI activity, and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 16(9):1156-62.
- de Maat M.P.M., de Knijff P., Green F.R., Thomas A.E., Jespersen J., Klufft C. (1995); Gender-Related Association Between  $\alpha_2$ -Fibrinogen Genotype and Plasma Fibrinogen Levels and Linkage Disequilibrium at the Fibrinogen Locus in Greenland Inuit. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 15(7):856-60.
- Dell Acqua G., Iacoviello L., D'Orazio A., Di Bitondo R., Di Castelnuovo A., Benedetta Donati M. (1997); A polymorphic cluster in the 5' region of the human coagulation factor VII gene: detection, frequency, and linkage disequilibrium. *Thrombosis Research.* 88:445-8.
- Di Castelnuovo A., D'Orazio A., Amore C., Falanga A., Benedetta Donati M., Iacoviello L. (2000); The daccanucleotide insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the coagulation factor VII gene and the risk of familial myocardial infarction. *Thrombosis Research.* 98:9-17.

Di Castelnuovo A., D'Orazio A., Amore C., Falanga A., Kluft C., Benedetta Donati M., Iacoviello L. (1998); Genetic modulation of coagulation factor VII plasma levels: contribution of different polymorphisms and gender-related effects. *Thromb Haemost.* 80:592-7.

Dobrusin M., Corbex M., Kremer I., Murad I., Muhaheed M., Bannoura I., Müller D.J., Schulze T.G., Reshef A., Blanaru M., et al (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.* 105:328-31.

Doggen C.J., Bertina R.M., Cats V.M., Rosendaal F.R. (2000); Fibrinogen polymorphisms are not associated with the risk of myocardial infarction. *British Journal of Haematology.* 110(4):935-8.

Duguid J.B. (1948); Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol.* 60:57-61.

Eaves I.A., Merriman T.R., Barber R.A., Nutland S., Toumilehto-Wolf E., Toumilehto J., Cucca F., Todd J.A. (2000); The genetically isolated populations of Finland and sardinia may not be a panacea for linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat, Genet.* 25(3):320-3.

Emeis J., Kooistra T. (1986); Interleukin-1 and lipopolysaccharide induce a fast acting inhibition of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J Exp Med.* 163:1260-6.

Fay WP, Ginsburg D. (1994); Goldbourt U, de Faire U, Berg K, editors. Genetic factors in coronary heart disease. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 9, Fibrinogen, factor VII, and plasminogen activator inhibitor-1. p. 125-38.

Ferrer-Auntes C., de Maat M.P., Palmeiro A., Pimentel J., Fernandes V. (1998a); Association between polymorphisms in the fibrinogen alpha- and beta -genes on the post-trauma fibrinogen increase. *Thrombosis Research.* 92(5):207-12.

Ferrer-Auntes C. (1998b); Polymorphisms of coagulation factor genes- areview. *Clin Chem Lab Med.* 36(12):897-906.

Fowkes F.G.R., Connor J.M., Smith E.B., Wood J., Donnan P.T., Lowe G.D.O. (1992); Fibrinogen genotype and risk of peripheral atherosclerosis. *Lancet.* 339(8795):693-6.

Freizner Degen S.J., Rajput B., Reich E. (1986); The Human Tissue Plasminogen Activator gene. *J Biol Chem.* 261(15):6972-85.

Friedman M., Rosenman M. (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.* 169:1286-96.

Girelli D., Russo C., Ferraresi P., Olivieri O., Pinotti M., Friso S., Manzato F., Mazzuco A., Bernardi F., Corrocher R. (2000); Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine.* 343:774-80.

Goldbourt, U., de Faire, U., and Berg, K. (1994); Genetic factors in coronary heart disease. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Goodall A.H., Curzen N., Panesar M., Hurd C., Knight C.J., Ouwehand W.H., Fox K.M. (1999); Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-Proline33 (HPA-1b,PI<sup>A2</sup>,Zw<sup>b</sup>) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *European Heart Journal.* 20:742-7.

Goudet J., Raymond M., de Meeüs T., Rousset F. (1996); Testing differentiation in diploid populations. *Genetics.* 144:1933-40.

- Grant J.P., Humphries S.E. (1999); Genetic determinants of arterial thrombosis. *Baillière's Clinical Haematology*. 12(3X):505-32.
- Green F.R., Watkins H. (1999); Genetic association studies in coronary disease: the case of GPIIb-IIIa polymorphisms. *European Heart Journal*. 20:706-8.
- Greenberg D., Doneshka P. (1996); Partitioned association-linkage test: distinguishing "necessary" from "susceptibility" loci. *Genetic Epidemiology*. 13:243-52.
- Grenett H.E., Benza R.L., Li X.N., Aikens M.L., Grammer J.R., Brown S.L., Booyse F.M. (1999); Expression of plasminogen activator inhibitor type I in genotyped human endothelial cell cultures: genotype-specific regulation by insulin. *Thromb Haemost.* 82(5):1504-9.
- Griffin J.H., Fernández J.A., Deguchi H. (2001); Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 1:386-94.
- Groen J.J., Medalie J.H., Neufeld H.N., 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.
- Haber E. (1998); Medicina cardiovascular molecular. Barcelona: Scientific American, Inc. Traducció espanyola: Medical Trends, SL.
- Hallman D.M., Boerwinkle E., Saha N., Sandholer C., Mendel H.J., Császár A., Utermann G. (1991); The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet.* 49:338-49.
- Hamsten A. (1993); The hemostatic system and coronary heart disease. *Thrombosis Research*. 70:1-38.
- Hansen J.B., Grimsgaard D., Huseby N., Sandset P.M., Bonna K.H. (2001); Serum lipids regulation of tissue factor-induced coagulation in middle-aged men. *Thromb Res.* 1(102):3-13.
- Harich N. (2002); Etude anthropogénétique de la population Berbère du Moyen Atlas: analyse comparative de polymorphisme dermatoglyphique, marqueurs classiques et d'ADN à l'échelle méditerranéenne et mondiale. El Jadida (Marroc): Université Chouaib Doukkali.
- Harvald B., Hauge M. (1970); Coronary occlusion in twins. *Acta of Genetica Medica in Gemellology*. 19:248-50.
- Hawiger J. (1998); Haber E, editors. Medicina cardiovascular molecular. Barcelona: Scientific American, Inc. Traducció espanyola: Medical Trends, SL. 11, Plaquetes en la trombosis y en la retrombosis. p. 128-43.
- Haynes S.G., Feinleib M., Kannel W.B. (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 D.M., Ausman L.M. (1988); Diet, alcohol and coronary heart disease in men. *Journal of Nutrition*. 118:1184-9.
- Heinrich J., Funke H., Rust S., Schulte H., Schönfeld R., Köhler E., Assmann G. (1995); Impact of polymorphisms in the alpha- and beta-fibrinogen gene on plasma fibrinogen concentrations of coronary heart disease patients. *Thrombosis Research*. 77(3):209-15.
- Heinrich J., Balleisen L., Schulte H. (1994); Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 14:54-9.

Henschen A.H. (1993); Human Fibrinogen - Structural Variants and Functional Sites. *Thromb Haemost.* 70(1):42-7.

Herbert.A, Lowenhaupt K., Spitzner J., Rich A. (1995); Chicken double-stranded RNA adenosine deaminase has apparent specificity for Z-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(16):7550-4.

Herrmann S.M., Poirier O., Marques-Vidal P. (1997); The Leu33/Pro polymorphism (PIA1/PIA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost.* 77:1179

Heywood D., Carter A.M., Catto A.J., Bamford J.M., Grant P.J. (1997); Polymorphisms of the factor VII gene and the circulating FVII:C levels in relation to acute cerebrovascular disease and poststroke mortality. *Stroke.* 28:816-21.

Hitti P. (1990); The Arabs: a short history. Washington DC: Gateway.

Hooper W.C., Lally C., Austin H., Renshaw M., Dilley A., Wenger N.K., Phillips D.J., Whitsett C., Rawlins P., Evatt B. (2000); The role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thrombosis Research.* 99(3):223-30.

Humphries S., Temple A., Lane D.A., Green F., Cooper J., Miller G. (1996); Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost.* 75(4):567-72.

Humphries S.E., Panahloo A., Montgomery H.E., Green F.R., Yudkin J. (1997); Gene-Environment Interaction in the Determination of Levels of Haemostatic Variables Involved in Thrombosis and Fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 78(1):457-61.

Humphries S.E., Cook M., Dubowitz M., Stirling Y., Meade T.W. (1987); Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *The Lancet.* 27:1452-5.

Iacoviello L., Di Castelnuovo A., de Knijff P., D'Orazio A., Amore C., Arboretti R., Kluff C., Benedetta Donati M. (1998); Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine.* 338(2):79-85.

Iso H., Folsom A.R., Winkelmann J.C., Koike K., Horada S., Greenberg B., Sato S., Shimamoto T., Lida M., Komachi Y. (1995); Polymorphisms of the Beta Fibrinogen Gene and Plasma Fibrinogen Concentration in Caucasian and Japanese Population Samples. *Thromb Haemost.* 73(1):106-11.

Kandil M. (1999); Etude anthropo-genetique de la population Arabe du Maroc Meridional (Abda, Chaouia, Doukkala et Tadla). El Jadida (Marroc): Universite Chouaib Doukkali.

Kannel WB. ; Ernst E, Koenig W, Lowe GDO, Meade TW, editors. (1992); Fibrinogen: a 'new' cardiovascular risk factor. Vienna: Blackwell-MZV, Fibrinogen: a major cardiovascular risk factor. p. 101-9.

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.

Kant J.A., Fornace A.J., Saxe D., Simon M.I., McBride O.W., Crabtree G.R. (1985); Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: Gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:2344-8.

Keys A., Menotti A., Karvonen M.J., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Djorjevic B.S., Dontas A.S., Fidanza F., Keys M.H., et al (1986); The diet and the 15-year death rate in the seven countries study. *American Journal of Epidemiology.* 124:903-15.



- Kirschbaum N.E., Budzynski A.Z. (1990); A Unique Fragment of Human Fibrinogen Containing the A COOH-terminal Domain of the Native Molecule. *J Biol Chem.* 265(23):13669-76.
- Kjalke M., Silveira A., Hamsten A., Hedner U., Ezban M. (2000); Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1835-41.
- Klinger K., Winqvist R., Riccio A., Andreasen P.A., Sartorio R., Nielson L., Stuart N., Stanislovitis P., Watkins P., Douglas P., et al (1987); Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:8548-52.
- Klinger K.W., Winqvist R., Andreasen P.A., Stuart N., Stanislovitis P., Schwartz R., Doherty R., Alitalo K., Blasi F., Dano K. (1987); Regional mapping of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene to 7q21.3-q22 and assignment to the CF linkage group. *Cytogenet Cell Genet.* 40:640
- Krawczak M., Bohringer S., Epplen J.T. (2001); Correcting for multiple testing in genetic association studies: the legend lives on. *Hum Genet.* 109:566-7.
- Lalueza Fox C., González Martín A., Vives Civit S. (1996); Cranial variation in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands: inferences about the history of the population. *Am J Phys Anthropol.* 99(3):413-28.
- Lane A., Green F., Scarabin P.Y. (1996); Factor VII Arg/Gln353 polymorphism determines factor VII coagulant activity in patients with myocardial infarction (MI) and control subjects in Belfast and in France but is not a strong indication of MI risk in the ECTIM study. *Atherosclerosis.* 119:119
- Lane D.A., Grant P.J. (2000); Role of the hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 95(5):1517-32.
- Lanza F., Kieffer N., Phillips D.R., Fitzgerald L.A. (1990); Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. *J Biol Chem.* 265(30):18098-103.
- Lee A.J., Fowkes F.G.R., Lowe G.D.O., Connor J.M., Rumley A. (1999); Fibrinogen, Factor VII and PAI-1 genotypes and risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study. *Thromb Haemost.* 81:553-60.
- Lee A.J., Lowe G.D.O., Woodward M., Tunstall Pedoe H. (1993); Fibrinogen in relation to a personal history of prevalent hypertension, diabetes, stroke, intermittent claudication, coronary heart disease and family history: te Scottish Heart Health Study. *Br Heart J.* 69:338
- Lefranc G., Lange G., Rivat L., Langaney A., Lefranc M.P., Ellouze F., Sfar G., Sfar M., van Loghem E. (1979); Am and Km immunoglobulin allotypes of two populations in Tunisia. *Hum Genet.* 50:199-211.
- Lewontin R.C. (1972); The apportionment of human diversity. *Evol Biol.* 6:381-98.
- Lewontin R.C. (1964); The interaction of selection and linkage.I. General considerations; heterotic models. *Genetics.* 49:49-67.
- Li X.N., Grenett H., Benza R.L., Demissie S., Brown S.L., Tabengwa E.M., Gianturco S.H., Bradley W.A., Fless G.M. (1997); Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 expression by hypertriglyceridemic VLDL and Lp(a) in cultured human endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 17:3215-23.
- Livshits G., Vainder M., Graff E., Blettner M., Schettler M., 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.* 9:353-70.
- Lucotte G., Hazaout S. (1996); Y chromosome DNA haplotypes in basques. *J Mol Evol.* 42:472-5.

- Ma J., Hennekens C.H., Ridker P.M., Stampfer M.I. (1999); A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 33:1347-52.
- Mansfield M.W., Stickland M.H., Grant P.J. (1995); Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in caucasian patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 74(3):842-7.
- Manzano C., Aguirre A., Irondo M., Martin M., Osaba L., de la Rúa C. (1996); Genetic polymorphisms of the Basques from Gipuzkoa: genetic heterogeneity of the Basque population. *Ann Hum Biol.* 23:285-96.
- Marchetti G., Patracchini P., Papacchini M., Ferrati M., Bernardi F. (1993); A polymorphism in the 5' region of coagulation factor VII gene (F7) caused by an inserted decanucleotide. *Hum Genet.* 90:575-6.
- Marchetti G., Patracchini P., Gemmati D., DeRosa V., Pinotti M., Roderigo G., Casonato A., Girolami A., Bernardi F. (1992); Detection of two missense mutations and characterization of a polymorphism in the factor VII gene (F7). *Hum Genet.* 89:497-502.
- Marchetti G., Gemmati D., Patracchini P., Pinotti M., Bernardi F. (1991); PCR detection of a repeat polymorphism within the F7 gene. *Nucleic Acids Research.* 19(16):4570
- 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.
- Mariani G., Conard F., Bernardi F., Bertina R.M., Vicente Garcia V., Prydz H., Samama M., Sandset P.M., Poupolo M.V., Poso R., et al (1999a); Oral contraceptives highlight a genotype-specific association between serum phospholipids and activated factor VII. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 19:2024-8.
- Mariani G., Bernardi F., Bertina R., Vicente García V., Prydz H., Samama M., Sandset P.M., Di Nucci G.D., Testa M.G., Bendz B., et al (1999b); Serum phospholipids are the main environmental determinants of activated factor VII in the most common FVII genotype. *Haematologica.* 84:620-6.
- Martin F., Prandini M.H., Thevenon D., Marguerie G., Uzan G. (1993); The transcription factor GATA-1 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene. *J Biol Chem.* 268(29):21606-12.
- Martínez-Laso J., De Juan D., Martínez-Quiles N., Gómez-Casado E., Arnaiz-Villena A. (1995); The contribution of the HLA-A, -B, -C, and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques. *Tissue Antigens.* 45:237-45.
- McCallum P.K., Meade T.W. (1999); Haemostatic function, arterial disease and the prevention of arterial thrombosis. *Baillière's Clinical Haematology.* 12(3):577-99.
- Meade T.W., Mellows S., Brozovic M. (1986); Haemostatic function and the ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* ii:533X-537.
- Meiklejohn D.J., Urbaniak S.J., Greaves M. (1999); Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PI<sup>A2</sup>): no association with platelet fibrinogen binding. *British Journal of Haematology.* 105:664-6.
- Mitsumori K., Terai A., Oka H., Segawa T., Ogura K., Yoshida O., Ogawa O. (1999); Androgen receptor CAG repeat length polymorphism in benign prostatic hyperplasia (BPH): correlation with adenoma growth. *Prostate.* 1(41):253-7.
- Moor E., Silveira A., van't Hof F., Suontaka A.M., Eriksson P., Blömbäck M., Hamsten A. (1995); Coagulation factor VII mass and activity in young men with myocardial infarction at a young age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15:655-64.



- 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. *Arteriosclerosis*. 67:143
- Muna W.F.T. (1993); Cardiovascular disorders in Africa. *World Health Statistics Quarterly*. 46:125-33.
- Murray C.J.L., López A.D. (1997); Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *The Lancet*. 349:1269-76.
- National Center for Health Statistics., Adams PF, Benson V. (1990); Current estimates from the national heart interview survey, United States, 1989. Vital and health statistics. Washington: U.S. Government printing Office: DHHS Publishers (PHS).
- Nei M. (1987); Molecular evolutionary genetics. New York, NY, USA: Columbia University Press.
- Nei M. (1977); F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Human Genet*. 41:225-33.
- Norusis MJ. (1992); SPSS. Advanced Statistics. Chicago: SPSS.
- Nyholt D.R. (2001); Genetic case-control association studies - correcting for multiple testing. *Hum Genet*. 109:564-5.
- O'Hara P.J., Grant F.J., Haldeman B.A., Gray C.L., Insley M.Y., Hagen F.S., Murray M.J. (1987); Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin k-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:5158-62.
- Ohta T. (1982); Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79:1940-1944.
- Ott J. (1989); Statistical properties of the haplotype relative risk. *Genetic Epidemiology*. 6:127-30.
- Paffenbarger R.S., Hale W.E. (1975); Work activity and coronary heart mortality. *N Engl J Med*. 292:545-50.
- Peck L.J., Wang J.C. (1985); Transcriptional block caused by a negative supercoiling induced structural change in an alternating CG sequence. *Cell*. 40(1):129-37.
- Pedersen N.L., Mc Lean G.E., Plomin R., Nesselroade J.R., Berg S., de Faire U. (1991); The Swedish adoption/twin study. An update. *Acta of Medical Gemellology*. 40:7-20.
- Petersen L.C., Sanne V., Hedner U. (1995); Regulation of the extrinsic pathway system in health and disease: The role of factor VIIa and tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis Research*. 79(1):1-47.
- Peyruchaud O., Nurden A., Bourre F. (1995); Bilateral linkage between a new deletion polymorphism in intron 21 of the GP IIb gene and the HPA-3b (Bak<sup>b</sup>) determinant. *British Journal of Haematology*. 91:747-51.
- Pinotti M., Toso R., Girelli D., Bindini D., Ferraresi P., Papa M.L., Corrocher R., Marchetti G., Bernardi F. (2000); Modulation of factor VII levels by intron 7 polymorphisms: population and in vitro studies. *Blood*. 95(11):3423-8.
- Polednak AP. (1989); Cardiovascular diseases. Oxford.
- Pollak E.S., Hung H.L., Godin W., Overton G.C., High K.A. (1996); Functional characterization of the human factor VII -flanking region. *J Biol Chem*. 271(3):1738-47.

- Porreca E., Di Febo C., Amore C., Di Castelnuovo A., Baccante G., Donati M.B., Cucurullo F., Iacoviello L. (2000); Effect of lipid-lowering treatment on factor VII profile in hyperlipidemic patients. *Thromb Haemost.* 84(5):789-93.
- Rando J.C., Pinto F.C., González A.M., Henández M., Larruga J.M., Cabrera V.M., Bandelt H.J. (1998); Mitochondrial DNA analysis of Northwestern African populations reveals genetic exchanges with European, Near-Eastern, and Sub-Saharan populations. *Ann Hum Genet.* 62:531-50.
- Rauramaa R., Vaisanen S., Nissinen A., Rankinen T., Penttila I., Saarikoski S., Toumilehto J., Gagnon J., Perusse L., Bouchard C. (1997); Physical activity, fibrinogen plasma level and gene polymorphisms in postmenopausal women. *Thromb Haemost.* 78(2):840-4.
- Raymond M., Rousset F. (1995); GENEPOP (1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered.* 86:248-9.
- Reed T., Quiroga J., Selby J.V., et al. (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.
- Regnes H.H., Peacock R., Dunning A.M., Talmud P., Humphries S. (1992); Genetic relationship between the 3' VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphisms: haplotype analysis in individuals of European and Sout Asian origin. *Ann Human Genet.* 56:11-33.
- Renfrew C. (1991); Before Babel: speculations on the origins of linguistic diversity. *Cambridge Archeol J.* 1:3-23.
- Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C.C. (1983); Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics.* 105:767-79.
- Riccio A., Lund L., Sartorio R., Lania A., Andreassen P.A., Dano K., Blasi F. (1988); The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 gene. *Nucleic Acids Research.* 16:2805-24.
- Richards M., Corte-Real H., Forster P., Macaulay V., Wilkinson-Herbort H., Demaine D., Papiha D., Hedges R., Bandelt H.J., Sykes B. (1996); Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am J Hum Genet.* 59:185-203.
- Ridker P.M., Baker M.T., Hennekens C.H., Stampfer M.J., Vaughan D.E. (1997a); Alu-repeat polymorphism in the gene coding for Tissue-Type Plasminogen Activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biology.* 17:1687-90.
- Ridker P.M., Hennekens C.H., Schmitz C., Stampfer M.J., Lindpaintner K. (1997b); PI<sup>A1/A2</sup> polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *The Lancet.* 349(8):385-8.
- Ridker P.M., Hennekens C.H., Stampfer M.I., Manson J.E., Vaughan D.E. (1994); Prospective study of endogenous tissue plasminogen activator and risk of stroke. *Lancet.* 343:940
- Risch N. (2000); Searching for genes in complex diseases: lessons from systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 105(11):1503-6.
- Risch N., Merikangas K. (1996); The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 273:1516-7.
- Rokitansky, C.V. (1852); A manual of pathologic anatomy. London: The Sydenham Society. p.265
- Rosenberg RD, Aird WC. (1998); Haber E, editors. Medicina cardiovascular molecular. Barcelona: Scientific American, Inc. Traducció espanyola: Medical Trends, SL. 8, Trombosis. p. 95-109.

- Ross R., Glomset J.A. (1973); Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science*. 180:1332
- Rothenburg S., Koch-Nolte F., Rich A., Haag F. (2001); A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(16):8985-90.
- Ruan C., Gu J., Wang X., Chu X., Pan J. (1993); Application of GPIIIa Gene Taq I Polymorphism to Determination of Carrier Status in Glanzmann's Thrombasthenia Families of Chinese Origin. *Thromb Haemost*. 69(1):64-9.
- Ruan J., Peyruchaud O., Nurden A., Bourre F. (1998); Linkage of four polymorphisms on the  $\text{f1b}$  gene. *British Journal of Haematology*. 102:622-5.
- 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
- Rupert J.L., Devime D.V., Monsalve M.V., Hochachka P.W. (1999);  $\alpha$ -Fibrinogen allele frequencies in Peruvian Quechua, a high-altitude native population. *American journal of physical anthropology*. 109:181-6.
- Sacchi E., Tagliabue L., Scoglio R., Baroncini C., Coppola R., Bernardi F., Manucci P.M. (1996); Plasma factor VII levels are influenced by a polymorphism in the promoter region of the FVII gene. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 7(2):114-7.
- Sadler L.A., Blanton S.H., Daiger S.P. (1991); Dinucleotide repeat polymorphism at the human tissue plasminogen activator gene (PLAT). *Nucleic Acids Research*. 19(21):6058
- Said R., Faure H. (1990); Ki-Zerbo J, editors. General history of Africa. Paris: UNESCO, Chronological framework: African pluvial and glacial epochs. p. 146-66.
- Saitou N., Nei M. (1973); The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*. 4:406-25.
- Schmidt H., Schmidt R., Niederkorn K., Horner S., Becsagh P., Reinhart B., Schumacher M., Weinrauch V., Kostner G.M. (1998);  $\alpha$ -Fibrinogen gene polymorphisms (C148-T) is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 18(3):487-92.
- 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.
- Scozzari R., Cruciani F., Malaspina P., Santolamazza P., Ciminelli B.M., Torroni A., Modiano D., Wallace D.C., Kidd K.K., Olckers A., et al (1997); Differential structuring of human populations for homologous X and Y microsatellite loci. *Am J Hum Genet*. 61(3):719-33.
- Simoni L., Guerresi P., Pettener D., Barbujani G. (1999); Patterns of gene flow inferred from genetic distances in the Mediterranean region. *Hum Biol*. 71:399-415.
- Sing C.F., Moll P. (1990); Genetics of atherosclerosis. *Annual Review of Genetics*. (24):171-87.
- Sing C.F., Orr J.D. (1978); Analysis of genetic and environmental sources of variation in serum cholesterol in Tecumseh, Michigan. IV. Separation of polygene from common environmental effects. *Am J Hum Genet*. 30:491-504.
- Smith E.B., Thompson W.D. (1994); Fibrin as a factor in atherogenesis. *Thrombosis Research*. 73(1):1-19.

Smith F.B., Lee A.J., Fowkes F.G.R., Price J.F., Rumley A., Lowe G.D.O. (1997); Hemostatic factors as predictors of ischemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 17:3321

Snowden C., Houlston R., Laker M.F., Kesteven P., Alberti K.G., Humphries S.E. (1992); Plasma fibrinogen levels and fibrinogen genotype in non-insulin dependent diabetics. *Dis Markers*. 10(3):159-67.

Spalteholz, W. (1965); Atlas de anatomía humana. 2. Barcelona, Madrid, Buenos Aires, Rio de Janeiro, México, Montevideo: Editorial Labor. 2.

Spielman R.S., Mc Ginnis R.E., Ewens W.J. (1993); Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*. 52:506-16.

Stampfer M.J., Malinow M.R., Willett W.C., Newcomer L.M., Upson B., Ullmann D., Tishler P.V., Hennekens C.H. (1992); A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*. 268:877-81.

Stary H.C. (1992); Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch Pathol Anat*. 421:277-90.

Steeds R., Adams M., Smith P., Channer K., Samani N.J. (1998); Distribution of Tissue Plasminogen Activator insertion/deletion polymorphism in myocardial infarction and control subjects. *Thromb Haemost*. 79:980-4.

Stephens M., Smith N.J., Donnelly P. (2001); A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 68:978-89.

Stoffel M., Bell G.I. (1992); Microsatellite polymorphism in the human platelet glycoprotein IIIa gene (GP3A) on chromosome 17. *Nucleic Acids Research*. 20(5):1172

Strandberg L., Lawrence D., Ny T. (1988); The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *Eur J Biochem*. 176:609-16.

Tamaki S., Iwai N., Nakamura Y., Tsujita Y., Kinoshita M. (1999); Variation of the factor VII gene and ischemic heart disease in japanese subjects. *Coronary Artery Disease*. 10(8):601-6.

Thomas A.E., Lamlum H., Humphries S.E., Green F.R. (1994); Linkage Disequilibrium Across the Fibrinogen Locus As Shown by Five Genetic Polymorphisms, G/A<sup>-455</sup> (*HaeIII*), C/T<sup>-148</sup> (*HindIII/AluI*), T/G<sup>+1689</sup> (*AvaII*), and BcII ( -Fibrinogen) and *TaqI* ( -Fibrinogen), and Their Detection by PCR. *Human Mutation*. 3:79-81.

Thomas W., Drayna D. (1992); A polymorphic dinucleotide repeat in intron 1 of the human tissue plasminogen activator gene. *Human Molecular Genetics*. 1(2):138

Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D.M. (1995a); The European Concerted Action on Thrombosis Angina Pectoris Study Group. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *New England Journal of Medicine*. 332:635-41.

Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D.M., Haverkate F., van de Loo J.C.W. (1995b); Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med*. 332:635

Tishkoff S.A., Pakstis A.J., Stoneking M., Kidd J.R., Destro-Bisol G., Sanjantila A., Lu R., Deinard A.S., Sirugo G., Jenkins T., et al (2000); Short tandem-repeat polymorphism/*Alu* haplotype variation at the PLAT locus: implications for modern humans origins. *Am J Hum Genet*. 67:901-25.

Tishkoff S.A., Dietzsch E., Speed W., Pakstis A.J., Kidd J.R., Cheung K., Bonn -Tamir B., Santachiara-Benerecetti A.S., Moral P., Krings M., et al (1996a); Global patterns of linkage disequilibrium at the CD4 locus and modern human origins. *Science*. 271(8):1380-7.

- Tishkoff S.A., Ruano G., Kidd J.R., Kidd K.K. (1996b); Distribution and frequency of a polymorphic *Alu* insertion at the plasminogen activator locus in humans. *Hum Genet.* 97:759-64.
- Tomàs i Abadal L, Domingo i Albós A. (1999); Enciclopèdia de medicina i salut. Barcelona: Enciclopèdia Catalana, Aparell cardíoc-vascular, sang.
- Vaisanen S., Rauramaa R., Penttilä I., Rankinen T., Gagnon J., Pérusse L., Chagnon M., Bouchard C. (1997); Variation in Plasma Fibrinogen over One Year: Relationships with Genetic Polymorphisms and Non-genetic Factors. *Thromb Haemost.* 77(5):884-9.
- Vaisanen S., Rauramaa R., Rankinen T., Gagnon J., Couchard C. (1996); Physical activity, fitness, and plasma fibrinogen with reference to fibrinogen genotypes. *Med Sci Sports Exerc.* 9:1165-70.
- Valveny Llobet, M.N. (2000); Factors de risc genètic per a la cardiopatia isquèmica. polimorfismes en gens del metabolisme lipoproteic [Tesi Doctoral]. Universitat de Barcelona.
- van der Boom J., de Knijff P., Haverkate F., Bots M., Meijer P., de Jong P., Hofman A., Kluit C., Grobbee D. (1997); Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Circulation.* 95:2623-7.
- Villa-Garcia M., Li L., Riely G., Bray P.F. (1994); Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human  $\alpha_3$  integrin gene. *Blood.* 83(3):668-76.
- Virchow R. (1856); Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin. Frankfurt-am- Main: Meidinger Sohn and Company, Phlogose und thrombose im gefasssystem. p. 458
- Weir BS. (1996); Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984); Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38:1358-70.
- Weiss C, Jelkman W. ; Schmidt RF, Thews G, (1993); editors.Fisiología humana. 24th ed. Madrid: Interamericana. Mc Graw-Hill. 18, Funciones de la sangre. p. 434-74.
- Weiss E.J., Bray P.F., Tayback M. (1996); A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med.* 334:1090
- WHO. (1994); World Health Statistical Annual. Geneva: WHO.
- Wöfl S., Martínez C., Rich A., Majzoub A. (1996); Transcription of the human corticotropin-releasing hormone gene in NPLC cells is correlated with Z-DNA formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:3664-8.
- Wright S. (1965); The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution.* 19:395-420.
- Zimrin A.B., Gidwitz S., Lord S., Schwartz E., Bennet J.S., White II G.C., Poncz M. (1990); The Genomic Organization of platelet Glycoprotein IIIa. *J Biol Chem.* 265(15):8590-5.
- Zito F., Di Castelnuovo A., Amore C., D'Orazio A., Donati M.B., Iacoviello L. (1997); Bcl I polymorphism in the fibrinogen beta-chain gene is associated with the risk of familial myocardial infarction by increasing plasma fibrinogen levels. A case-control study in a sample of GISSI-2 patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(12):3489-94.