



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultat de Biociències  
Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i d'Ecologia  
Doctorat en Biodiversitat

# **ADN MITOCONDRIAL I RISC CARDIOVASCULAR**

**Miriam Umbria Vivancos**

Tesi doctoral  
2019

Directores:  
Maria Pilar Aluja Paris  
Cristina Pereira Santos  
Tutora:  
Maria Pilar Aluja Paris



Treball finançat per el Ministerio de Economía, Indústria y Competitividad (CGL2014-53781-r), la Generalitat de Catalunya (2009 SGR 566, 2014 SGR 1420, 2017 SGR 1630) i GENDIAG.EXE.



# ADN mitocondrial i risc cardiovascular

Memòria presentada per Miriam Umbria Vivancos per optar al títol de Doctora en Biodiversitat del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Directores de tesis:

- Dra. Cristina Maria Pereira dos Santos, Professora Agregada de la Unitat d'Antropologia Biològica del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia.
- Dra. M<sup>a</sup> Pilar Aluja Paris, Professora Titular de la Unitat d'Antropologia Biològica del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia.

Tutora doctorat:

- Dra. M<sup>a</sup> Pilar Aluja Paris, Professora Titular de la Unitat d'Antropologia Biològica del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia

Dra. M<sup>a</sup> Pilar Aluja Paris

Dra. Cristina Pereira Santos

Miriam Umbria Vivancos



## AGRAÏMENTS

A les Dras. Maria Pilar Aluja i Cristina Santos, per confiar en mi. Sense les seves correccions, experiència i consells no hagués estat possible fer aquesta tesi.

A l'equip de Gendiag.exe, per contribuir a una part de la financiació que ha permès el desenvolupament d'aquest el projecte. Gràcies per el vostre interès, implicació i assessorament.

Al personal del Sevei de Genòmica i Bioinformàtica de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la vostra feina dia rera dia, i no dir mai que no.

Als meus companys de feina, per les vostres recomanacions, recolzament i amistat.





## RESUM

La cardiopatia isquèmica, en concret l'infart de miocardi, i els accidents cerebrovasculars són dues de les principals causes de mortalitat en tot el món, amb un total de 15,2 milions de morts l'any 2016. A nivell espanyol, aquestes dues malalties continuen sent una de les principals causes de morbimortalitat, no obstant, en el moment d'iniciar la present tesi doctoral, no hi havia cap treball actualitzat publicat enfocat en l'anàlisi de la mortalitat i morbiditat cardiovascular en totes les comunitats autònomes d'Espanya i la seva evolució en els darrers anys. Les malalties cardiovascular es caracteritzen per tenir una etiologia multifactorial, resultant de la confluència de factors de risc ambientals i genètics. D'acord amb aquestes dades, s'estima que l'heretabilitat de les malalties cardiovasculars arriba a ser del 40-55%, el que suggereix que es probable que els factors hereditaris contribueixin de manera important a la susceptibilitat futura de patir un esdeveniment cardiovascular.

En els últims anys, diversos estudis s'han enfocat cap a l'enteniment del paper dels determinants genètics nuclears i, en menor mesura, mitocondrials, en les malalties cardiovasculars per a prevenir esdeveniments clínics. Malgrat que la majoria dels estudis han intentat predir el risc cardiovascular mitjançant l'ús de puntuacions de risc genètic basades en variants nuclears, fins ara cap estudi ha dut a terme una puntuació de risc utilitzant el genoma mitocondrial. La mitocòndria té un paper rellevant en les malalties cardiovasculars no només per l'aportació energètica que fa a través de la fosforilació oxidativa en la producció d'ATP, sinó que a més, constitueix la principal font de generació d'espècies reactives de l'oxigen. Aquest orgànuł conté el seu propi material genètic, que degut a l'adaptació a les condicions climàtiques i ambientals sofertes al llarg de les diferents migracions de l'espècie humana des d'Àfrica, ha adquirit una sèrie de mutacions estables que permeten caracteritzar les poblacions humanes segons el seu origen geogràfic. Els diferents conjunts de polimorfismes característics de cada població han donat lloc als haplogrups mitocondrials. Degut al seu origen adaptatiu, els diferents haplogrups poden condicionar les característiques metabòliques individuals, fent variar el funcionament de la cadena respiratòria generant diferències entre individus. Aquestes diferències s'han relacionat amb la predisposició de desenvolupar diferents malalties, entre les que es troba l'infart de miocardi i l'accident cerebrovascular. No obstant, en el genoma mitocondrial també existeixen variants, que no són específiques de cap haplogrup en concret, però que són comunes en la població a causa de l'elevada taxa de mutació del genoma mitocondrial. Aquestes variants no es relacionen directament amb l'infart de miocardi o l'accident cerebrovascular, però també poden ocasionar una sèrie de defectes funcionals a la mitocòndria o actuar sinèrgicament amb altres variants patològiques, i d'aquesta manera influir en la susceptibilitat a les malalties cardiovasculars.

Els objectius plantejats en aquesta tesi són els següents: 1) analitzar el comportament de la mortalitat i morbiditat hospitalària de les malalties cardiovasculars de major rellevància

a l'estat Espanyol; 2) determinar l'existència d'una possible associació entre la variació de la regió control del genoma mitocondrial i la susceptibilitat a desenvolupar un infart de miocardi o un accident cerebrovascular; i 3) valorar si la incorporació de les variants mitocondrials a una puntuació de risc genètic, emprant marcadors nuclears, millora la capacitat de discriminació i predicció del risc cardiovascular.

La metodologia així com la presentació dels resultats i la discussió s'han organitzat en 4 capítols dirigits a respondre els diversos objectius. En el capítol 1 s'ha realitzat un estudi epidemiològic descriptiu que respon a la necessitat d'actualitzar, a nivell nacional, les dades de mortalitat i morbiditat dels principals subtipus de malaltia cardiovascular, per edat i sexe, en totes les comunitats autònomes d'Espanya al llarg dels últims 15 anys. Els resultats obtinguts mostren que les malalties cardiovasculars continuen sent una de les principals causes de morbimortalitat a Espanya; no obstant, també s'observa una disminució de les taxes de mortalitat estandarditzades per edat que s'explica tant per les millores de l'assistència sanitària i el desenvolupament de fàrmacs i tècniques de tractament, com per a els canvis poblacionals d'estil de vida saludables, i d'envelliment de la població. Aquests resultats ens demostren que s'ha de potenciar la recerca de la malaltia cardiovascular a diferents nivells si el seu objectiu és el de prevenir les taxes de mortalitat i morbiditat cardiovascular, i en aquest sentit, el paper de la genètica, inclosa la mitocondrial, és molt important.

Tenint això en ment, s'ha plantejat analitzar l'ADN mitocondrial en individus residents a Castella i Lleó provinents d'un estudi transversal, observacional i descriptiu. Per aquest motiu, en el capítol 2 d'aquesta tesi s'ha investigat l'associació entre els haplogrups mitocondrials i dues malalties cardiovasculars, l'infart de miocardi i l'accident cerebrovascular, així com els factors de risc cardiovasculars clàssics. En la primera anàlisi es va dissenyar un estudi cas-control emprant 211 individus amb antecedents d'infart de miocardi, 154 individus amb antecedents d'accident cerebrovascular i els seus corresponents controls aparellats per edat, sexe i origen geogràfic. En la segona, només es van utilitzar els individus del grup control per poder analitzar l'associació amb els factors de risc clàssics. Les dades obtingudes van mostrar evidències suggestives de que l'haplogrup H pot actuar com un factor de risc genètic per a l'infart de miocardi. A més, en relació als factors de risc clàssics, els resultats també suggerien una funció beneficiosa de l'haplogrup J contra la hipertensió. Per tant, aquests resultats podrien proporcionar alguna orientació alhora de predir el risc genètic d'aquestes malalties en diferents poblacions humanes.

En el capítol 3, per a la mateixa població de Castella i Lleó, es va analitzar el paper de les mutacions fixades i en heteroplasmia de la regió control de l'ADN mitocondrial que podrien actuar com a factors de risc independents als haplogrups. En aquest cas, també es van observar diferències significatives entre casos i controls, mostrant que les variants m.16.145G>A i m.16.311T>C podien comportar-se com possibles factors de risc en el desenvolupament de l'accident cerebrovascular, mentre que les variants m.72T>C, m.73A>G i m.16.356T>C podien actuar com a possibles factors genètics de protecció front a l'infart de miocardi. Respecte a l'anàlisi de les heteroplàsmies, es va detectar un elevat percentatge d'heteroplasmia puntual en els controls del grup infart de miocardi. Aquests resultats demostren quin el possible paper de les variants de la regió control de l'ADN mitocondrial sobre la patogènesis de l'infart de miocardi i l'accident cerebrovascular, així com la importància d'incloure aquesta regió reguladora en els estudis d'associació genètica.

Tenint en compte els resultats obtinguts, i atesa la manca d'estudis que utilitzen les variants mitocondrials en les puntuacions de risc cardiovasculars, es va portar a terme una darrera anàlisi (capítol 4) per tal d'avaluar la magnitud de la informació genètica nuclear i mitocondrial en la millora de la capacitat de discriminació de les malalties cardiovasculars per sobre d'una puntuació únicament basada en informació clínica. La puntuació de risc es va crear segons el model additiu que suma els al·lels de susceptibilitat de 11 SNPs nuclears (rs10455872, rs10507391, rs17222842, rs9315051, rs12526453, rs1333049, rs17465637, rs501120, rs6725887, rs9818870 i rs9982601), i les 5 posicions mitocondrials descrites anteriorment (m.16145G>A; m.16311T>C; m.16356T>C; m.72T>C i m.73A>G), que es van genotipar en 301 casos i 221 controls. El resultat de l'àrea sota la corba (AUC) per a la puntuació desenvolupada només amb variables clíniques (model 1) va ser de 0,697. La puntuació obtinguda de la combinació dels marcadors nuclears i les variables clíniques (model 2), va augmentar significativament l'AUC a 0,722. L'addició de les variants mitocondrials al model 2 va augmentar significativament l'AUC a 0,774. Aquests resultats mostren que l'ús de la informació genètica mitocondrial millora la capacitat de discriminació de les malalties cardiovasculars més enllà de la del conjunt dels factors de risc clàssic i els SNPs nuclears en aquesta població.

En resum, els resultats presentats en aquesta tesi posen de manifest la influència de les variants mitocondrials en les malalties cardiovasculars. Aquest, és el primer treball en avaluar l'ús d'una puntuació de risc que incorpora el genoma mitocondrial i que aconsegueix millorar significativament la capacitat de discriminació dels esdeveniments cardiovasculars.



## ABSTRACT

Coronary heart disease, specifically myocardial infarction and stroke are two of the main causes of mortality worldwide, with a total of 15.2 million deaths in 2016. In Spain, these two diseases continue to be one of the main causes of mortality and morbidity. However, at the beginning of this doctoral thesis, there was no update and published work focusing on the analysis of cardiovascular mortality and morbidity in all the autonomous communities of Spain and their evolution in recent years. Cardiovascular epidemiology is characterized by having a multifactorial aetiology, resulting from the confluence of environmental and genetic risk factors. According to these data, it is estimated that the heritability of cardiovascular diseases reaches 40-55%, suggesting that it is probable that hereditary factors strongly contribute to the future susceptibility of a premature cardiovascular event.

In recent years, several studies have focused on understanding the role of nuclear and, to a lesser extent, mitochondrial genomes, in cardiovascular diseases to prevent clinical events. Although most studies have tried to predict cardiovascular risk using a genetic risk score based on nuclear variants, so far no risk score was developed using the mitochondrial genome. Mitochondria play an important role in cardiovascular diseases not only for its energy contribution through oxidative phosphorylation in the ATP production but also as the main source of generation of reactive oxygen species. This organelle contains its own genetic material, which, due to the adaptation to climatic and environmental conditions suffered throughout the different migrations of the human species from Africa, has acquired a series of stable mutations that allow characterizing human populations according to their geographic origin. The different sets of characteristic polymorphisms of each population have resulted in mitochondrial haplogroups. Due to their adaptive origin, haplogroups have different individual metabolic characteristics, varying the function of the respiratory chain and generating differences between individuals. These differences have been related to the predisposition to develop different diseases, among which is myocardial infarction and stroke. However, in the mitochondrial genome there are also variants, that do not designate any specific haplogroup, but that are continually introduced to the population due to the high mutation rate of the mitochondrial genome. These variants are not directly related to myocardial infarction or stroke, but they can also cause a series of functional defects in mitochondria or can act synergistically with other pathological variants, and thus influence susceptibility to cardiovascular disease.

The main goals of this thesis are summarized in the following three points: 1) to analyse the state of mortality and hospital morbidity from the most relevant cardiovascular diseases in Spain; 2) to determine the possible association of control region variants of the mitochondrial genome with the susceptibility to develop a myocardial infarction and stroke; and 3) to assess whether the incorporation of mitochondrial variants in a genetic risk score, based in nuclear SNPs, improves the ability to discriminate and predict cardiovascular risk.

The methods as well as the presentation of the results and the discussion were organized in 4 chapters aimed to answer the defined objectives. In chapter 1, a descriptive epidemiological study that responds to the need to update the mortality and morbidity data of the main subtypes of cardiovascular disease, by age and sex, in all the Spanish autonomous communities over the last 15 years has been carried out. The results obtained show that cardiovascular diseases continue to be one of the main causes of mortality and morbidity in Spain. However, there is also a decrease in standardized mortality rates by age, which is explained by improvements in healthcare and the development of drugs and treatment techniques, as well as the population changes in healthy lifestyle, and the aging population. These results demonstrate that research of cardiovascular disease at different levels should be promoted if its objective is to prevent cardiovascular mortality and hospital morbidity rates, and in this sense, the role of genetics, including mitochondrial genetics, is very important.

Bearing this in mind, mitochondrial DNA has been considered for analysis in individuals residing in the Spanish autonomous community of Castile and Leon who come from cross-sectional, observational and descriptive study. For this reason, in chapter 2 of this thesis the link between mitochondrial haplogroups and two cardiovascular diseases, myocardial infarction and stroke, and the classic cardiovascular risk factors, was investigated. In a first analysis, a case-control study was designed using 211 individuals with a history of myocardial infarction, 154 individuals with a history of stroke, and their corresponding controls, matched for age, sex and geographical origin. In the second one, only control individuals group were used to analyse the association with classic risk factors. The data obtained showed suggestive evidence that haplogroup H can act as a genetic risk factor for myocardial infarction. Additionally, in relation to classic risk factors, the results also suggested a beneficial role of haplogroup J against hypertension. Therefore, these results could provide some guidance when predicting the genetic risk of these diseases on different human populations.

In chapter 3, for the same Castile and Leon population, the role of fixed and heteroplasmy mutations of the mitochondrial DNA control region, which act as independent risk factors from haplogroups, was analysed. In this case, significant differences were also observed, reporting that the variants m.16.145G> A and m.16.311T> C could act as possible risk factors in the development of stroke, while variants m.72T>C, m.73A> G and m.16.356T> C could act as possible beneficial genetic factors for myocardial infarction. Regarding the analysis of heteroplasmy, the results detected a high percentage of point heteroplasmy, among which was variant m.73A>G, in the controls individuals of the myocardial infarction group. These results demonstrate the possible role of variants of the mitochondrial DNA control region on the pathogenesis of myocardial infarction and stroke, as well as the importance of including this regulatory region in genetic association studies.

Taking into account the results obtained, and given the lack of studies using mitochondrial variants in cardiovascular risk scores, a final analysis (chapter 4) was carried out in order to evaluate the magnitude of the nuclear and mitochondrial genetic information in improving the ability to discriminate cardiovascular diseases beyond a score based solely on clinical information. The risk score was created based on the additive model that adds the susceptibility alleles from the 11 nuclear SNPs (rs10455872, rs10507391, rs17222842,

rs9315051, rs12526453, rs1333049, rs17465637, rs501120, rs6725887, rs9818870 and rs9982601), and the 5 mitochondrial positions described above (m.16145G> A; m.16311T> C; m.16356T> C; m.72T> C and m.73A> G), that were genotyped in 301 cases and 221 controls. The result of the area under the curve (AUC) for the score developed only with clinical variables (model 1) was 0.697. When the nuclear score was combined with the clinical variables (model 2), the new score significantly increased the AUC to 0.722. The addition of mitochondrial variants to model 2 significantly increased the AUC to 0.774. These results show that, in this population, the use of mitochondrial genetic information improves the ability to discriminate cardiovascular diseases beyond the set of classic risk factors and nuclear SNPs.

In summary, the results presented in this thesis show the influence of mitochondrial variants on cardiovascular diseases. This is the first work to evaluate the use of a risk score that incorporates the mitochondrial genome and that significantly improves the ability to discriminate cardiovascular events.





# ÍNDEX DE CONTINGUTS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 LA MITOCÒNDRIA.....  | 3         |
| 1.1.1. Origen, estructura i funció de la mitocòndria.....  | 3         |
| 1.1.2. Bioenergètica mitocondrial .....  | 5         |
| 1.1.3. Sistema genètic mitocondrial.....   | 8         |
| 1.1.3.1. Estructura i organització de l'ADN mitocondrial .....   | 8         |
| 1.1.3.2. Manteniment de l'ADN mitocondrial: replicació i transcripció.....                               | 11        |
| 1.1.3.3. Característiques de l'ADN mitocondrial .....  | 14        |
| 1.1.4. Variants genètiques de l'ADN mitocondrial.....  | 14        |
| 1.1.4.1. Variants definitòries d'haplogrups.....   | 15        |
| 1.1.4.2. Variants polimorfismes no definitòries d'haplogrup .....  | 20        |
| 1.1.4.3. Mutacions somàtiques.....   | 21        |
| 1.2. MALALTIA CARDIOVASCULAR.....  | 23        |
| 1.2.1. Epidemiologia de la malaltia cardiovascular.....  | 24        |
| 1.2.1.1. Mortalitat cardiovascular a Europa .....  | 26        |
| 1.2.1.2. Morbiditat cardiovascular a Europa .....  | 27        |
| 1.2.2. Factors de risc de la malaltia cardiovascular.....  | 29        |
| 1.2.2.1. Factors de risc modificables per la CI i l'ACV.....   | 29        |
| 1.2.2.2. Factors de risc no modificables per la CI i l'ACV.....  | 33        |
| Variants nuclears .....  | 34        |
| Variants mitocondrials .....   | 37        |
| 1.3. RISC CARDIOVASCULAR.....  | 39        |
| 1.3.1. Predicció del risc utilitzant factors de risc clàssics.....                                       | 40        |
| 1.3.2. Ús de la genètica en la discriminació i predicció del risc.....                                   | 42        |
| 1.3.2.1. Creació d'una puntuació de risc genètic o GRS .....   | 43        |
| 1.3.2.2. Millora en l'estimació del risc cardiovascular.....   | 44        |
| <b>2. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL I OBJECTIUS.....</b>  | <b>49</b> |
| 2.1. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL.....   | 51        |
| 2.2. OBJECTIUS .....   | 53        |
| <b>3. METODOLOGIA, RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>3.1. CAPITOL 1: Cardiovascular disease in Spain – Descriptive epidemiologic study 2000-2015 .....</b> | <b>57</b> |
| 3.1.1. Materials and methods.....  | 59        |
| Study design .....   | 59        |

|  |            |
|--|------------|
| Variable definition.....   | 59         |
| Data Analysis .....  | 60         |
| 3.1.2. Results .....   | 60         |
| Extent of cardiovascular diseases in Spain: Mortality and hospital morbidity .....   | 60         |
| Distribution by age and sex.....   | 63         |
| Temporal tendency.....   | 64         |
| Geographical differences: comparison between CCAA .....  | 68         |
| 3.1.3. Discussion.....   | 72         |
| <b>3.2. CAPITOL 2: Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: a case-control study in Castile and Leon (Spain) population .....</b> | <b>75</b>  |
| 3.2.1. Material and methods .....  | 77         |
| Sample collection and DNA extraction .....   | 77         |
| MtDNA amplification and sequencing .....   | 77         |
| Data Analysis .....  | 78         |
| 3.2.2. Results .....   | 79         |
| Association between mtDNA haplogroups and MI .....   | 79         |
| Association between mtDNA haplogroups and stroke.....  | 81         |
| Association between mtDNA haplogroups and CV risk factors .....  | 82         |
| 3.2.3. Discussion.....   | 83         |
| Association between mtDNA haplogroups and MI and stroke .....  | 83         |
| MtDNA haplogroups and cardiovascular risk factors .....  | 84         |
| <b>3.3. CAPITOL 3: The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction .....</b>                        | <b>87</b>  |
| 3.3.1. Material and methods .....  | 89         |
| Subjects .....   | 89         |
| MtDNA sequence analysis and heteroplasmy authentication.....   | 89         |
| Data Analysis .....  | 90         |
| 3.3.2. Results .....   | 91         |
| Analysis of fixed and heteroplasmic mtDNA mutations with stroke .....  | 91         |
| Analysis of fixed and heteroplasmic mtDNA mutations with MI.....   | 95         |
| Distribution of mtDNA mutations between haplogroups .....  | 96         |
| 3.3.3. Discussion.....   | 97         |
| <b>3.4. CAPITOL 4: New mitochondrial genetic risk score improve discrimination capacity of cardiovascular events .....</b>   | <b>101</b> |
| 3.4.1. Material and methods .....  | 103        |
| Subjects .....   | 103        |

|  |            |
|--|------------|
| Selection of genetic variants, genotyping and multilocus risk score generation.....  | 104        |
| Estimation of individual risk scores .....   | 104        |
| Statistical analysis .....   | 105        |
| 3.4.2. Results .....   | 105        |
| Sample characteristics .....   | 105        |
| Utility of nuclear and mitochondrial GRS in discrimination capacity of CVD.....  | 107        |
| 3.4.3. Discussion .....  | 108        |
| <b>4. DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>  | <b>111</b> |
| 4.1. Situació de la mortalitat i morbiditat cardiovascular a Espanya.....  | 113        |
| 4.2. Relació entre la variació de la regió control del genoma mitocondrial i la<br>susceptibilitat a desenvolupar un IM o un ACV.....                        | 114        |
| 4.3. Potencial de les variants mitocondrials en la millora de la capacitat de<br>discriminació del risc cardiovascular. Nou score genètic mitocondrial ..... | 117        |
| <b>5. CONCLUSIONS.....</b>   | <b>121</b> |
| <b>6. BIBLIOGRÀFIA.....</b>  | <b>125</b> |
| <b>7. ANNEX 1.....</b>   | <b>153</b> |
| <b>8. ANNEX 2 .....</b>  | <b>157</b> |
| <b>9. ANNEX 3 .....</b>  | <b>227</b> |



01 ■

Introducció



## 1.1. LA MITOCÒNDRIA

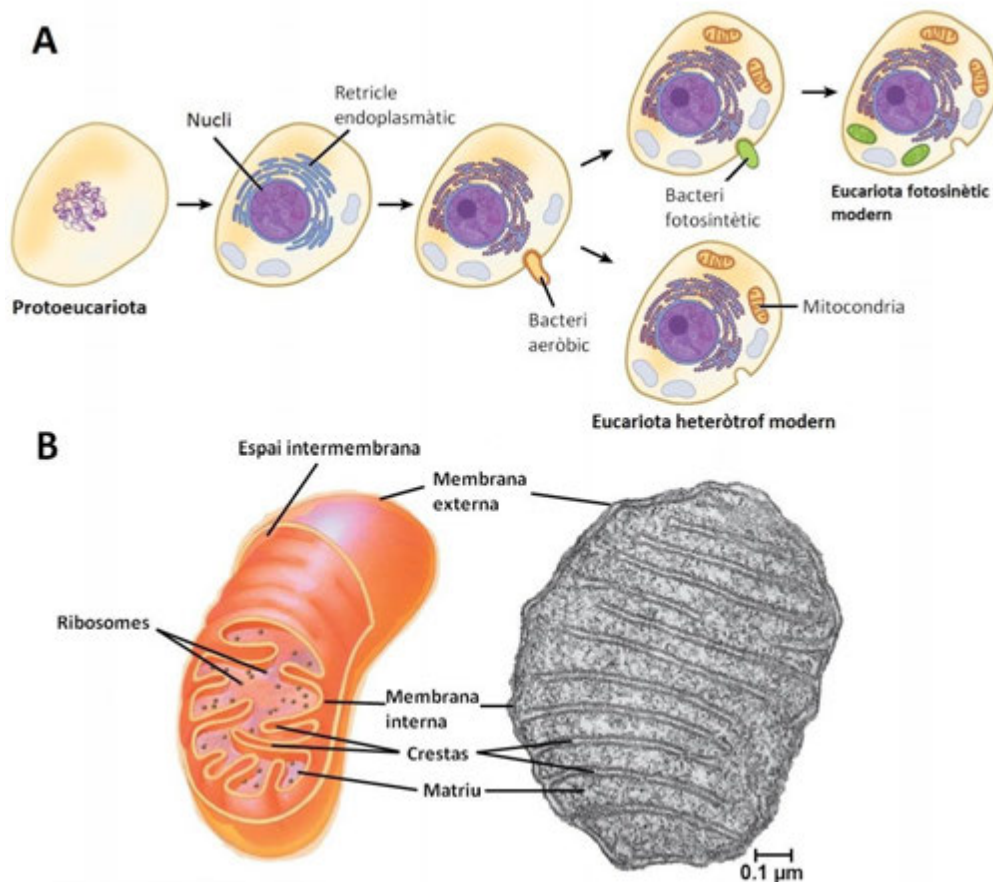
### 1.1.1. Origen, estructura i funció de la mitocòndria

Las mitocòndries, del grec mito (fil) i chondros (grànul), són orgànuls citoplasmàtics que juguen un paper energètic essencial en el metabolisme cel·lular. El possible origen de les mitocòndries s'explica per primera vegada a través de la teoria de l'Endosimbiosi o Endosimbiosi seriada, popularitzada per Lynn Margulis l'any 1967, tot i que el moment exacte en que va succeir encara es troba sota debat (Pittis and Gabaldon 2016). Aquesta teoria planteja essencialment que alguns dels orgànuls de les cèl·lules eucariotes, en particular les mitocòndries i els plastidis, varen ser, en el seu moment procariotes de vida lliure ( $\alpha$ -protobacteris i cianobacteris, respectivament). Aquests probablement després d'haver estat englobats o fagocitats, no varen ser digerits i pel contrari, es varen acoblar establint una relació dependent amb la cèl·lula "predadora" (Figura 1A). Una va guanyar la capacitat d'utilitzar l'oxigen per a produir energia, mentre que l'altre va guanyar protecció contra els depredadors. Alguns autors situen el pas d'endosimbiont a orgànul en el moment en que el proteobacteri va adquirir la capacitat d'intercanviar ADP i ATP amb el citosol de la cèl·lula hoste, integrant-se d'aquesta manera en el metabolisme cel·lular.

La mida de les mitocòndries oscil·la entre els 0,5 i 1  $\mu\text{m}$  de diàmetre i fins a 10  $\mu\text{m}$  de longitud. Com herència del procés simbiòtic, les mitocòndries consten de dues membranes: una *externa*; llisa i permeable a ions, metabòlits i molts polipèptids, i una *membrana interna*, més selectiva degut el seu elevat contingut de fosfolípid cardiolipina (Paradies et al. 2018). Aquesta membrana es replega cap a l'interior formant les denominades *crestes mitocondrials*, el que permet definir dos compartiments dins la mitocòndria: la matriu i l'espai intermembrana (Figura 1B). És a la *matriu mitocondrial* on es localitza el genoma mitocondrial (ADNmt), i en menor quantitat, ions inorgànics i diversos substrats. Entre ambdues membranes (externa i interna) queda delimitat l'*espai intermembrana*, que es diferencia per tenir una elevada concentració de protons a conseqüència del bombeig dels mateixos portat a terme pels enzims del sistema de la fosforilació oxidativa (*OXPHOS*;



*Oxydative Phosphorylation System*), localitzat a la membrana interna mitocondrial [per a revisió veure Lenaz i Genova (2007)].



**Figura 1. Mitocòndria.** A. Origen endosimbiòtic. B. Estructura i morfologia (modificat de OpenStax, Biology. OpenStax CNX. 7 nov. 2018 <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@11.6>).

A l'interior de les mitocondries tenen lloc processos tant imprescindibles com l'homeòstasi del calci (Giorgi et al. 2018), la producció d'energia i la regulació de les espècies reactives de l'oxigen (*ROS*; *Reactive Oxygen Species*) a través de la fosforilació oxidativa. L'activitat mitocondrial del sistema *OXPHOS* té una gran importància biomèdica, tant per la generació de *ROS*, com per a la regulació de la mort cel·lular programada o apoptosi mitjançant l'activació de cascades proteiques (Ghezzi and Zeviani 2018).

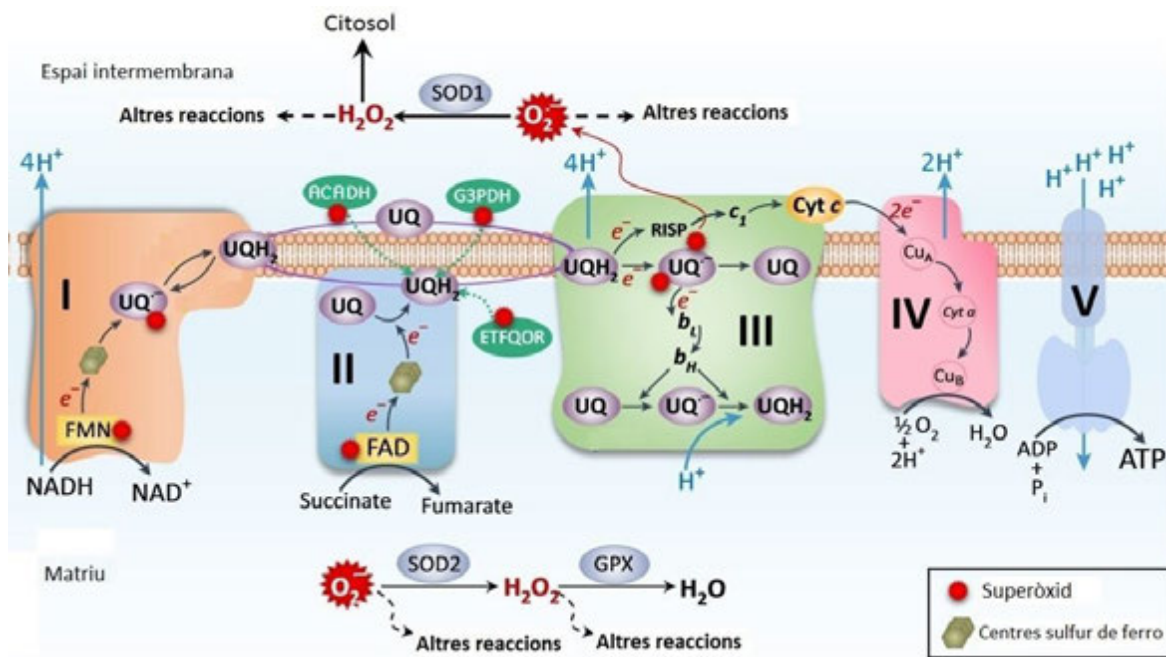
A la mitocondria també es desenvolupen importants rutes metabòliques com el cicle de la urea, el cicle dels àcids carboxílics, la  $\beta$  oxidació dels àcids grassos i la biosíntesi de les pirimidines (McBride et al. 2006). A més, són orgànuls que presenten una gran capacitat adaptativa als microtúbuls. Aquests són capaços de desplaçar-se a través del citoplasma i adquirir la morfologia i localització cel·lular més eficient per respondre a les demandes energètiques del teixit on es localitzen (Tilokani et al. 2018).

A les neurones, que tenen grans extensions citoplasmàtiques, el tràfic mitocondrial augmenta les possibilitats d'interacció entre les mitocondries i altres orgànuls cel·lulars com el reticle endoplasmàtic i el citoesquelet mitjançant moviments de fusió i fissió. En canvi, en

els cardiomiòcits adults, les mitocòndries conformen una xarxa fixa que rodeja els miofilaments contràctils que controla les bases dels mecanismes de contracció de les fibres del múscul cardíac (Dorn 2018). La interacció entre les mitocòndries i la resta de components del citosol poden modular la respiració mitocondrial (Ghosh et al. 2017), demostrant quina és la importància del funcionament dels sistemes complexos respecte la transferència d'energia, la compartimentació metabòlica i l'acoblament entre enzims i orgànuls, alhora que realitzar funcions específiques segons els requisits particulars cel·lulars. En aquest sentit, el cor, el cervell i el múscul esquelètic són teixits "essencials" que requereixen d'un subministrament continu d'energia, nutrients i rentat dels productes metabòlics generats (Szeto 2018).

### 1.1.2. Bioenergètica mitocondrial

La fosforilació oxidativa és un sistema de respiració cel·lular acoblada a la obtenció d'energia en forma d'adenosin trifosfat (ATP) (Figura 2).



**Figura 2. Representació del sistema de fosforilació oxidativa.** A la imatge s'observen els complexos de la cadena de transport d'electrons I, II, III, IV i V. Les fletxes blaves senyalen el flux de protons, les fletxes negres marquen el pas dels electrons a través dels complexos. ACADH: Acil-CoA deshidrogenasa, Cyt c: citocrom c, ETFQOR: flavoproteïna de transferència d'electrons oxidoreductasa, FMN: flavina mononucleòtid, G3PDH: gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, GPX: glutatió peroxidasa, SOD: superòxid dismutasa, UQ: ubiquinona, UQ<sup>-</sup>: semiquinona, UQH<sub>2</sub>: ubiquinol (modificat de Wang and Hekimi 2016).

Aquest sistema és probablement un dels components cel·lulars més coneguts des d'un punt de vista bioquímic, genètic, molecular i estructural, i la seva importància rau en el fet que és la principal font d'energia en les cèl·lules eucariotes. Es calcula que el 90% de l'energia en forma d'ATP és produïda mitjançant aquest procés. A més, juga un paper clau en el control de l'estat redox de la cèl·lula i destacades vies metabòliques i de senyalització (Enriquez 2016).

La OXPHOS consisteix en una cadena organitzada de complexos multiproteics incrustats a la membrana interna mitocondrial (Figura 2). El conjunt de complexos I, II, III i IV es coneix amb nom de cadena de transport d'electrons (ETC; *Electron Transport Chain*), mentre que un cinquè complex (complex V o ATP-sintasa), encarregat de catalitzar la síntesi d'ATP, no es pròpiament un component de la cadena. La ETC consta, a més, de varis complexos "auxiliars" que actuen com a molècules transportadores d'electrons; el coenzim Q, localitzat en el nucli lipídic de la membrana interna mitocondrial i el citocrom C, que resideix a l'espai intermembrana (Cogliati et al. 2018).

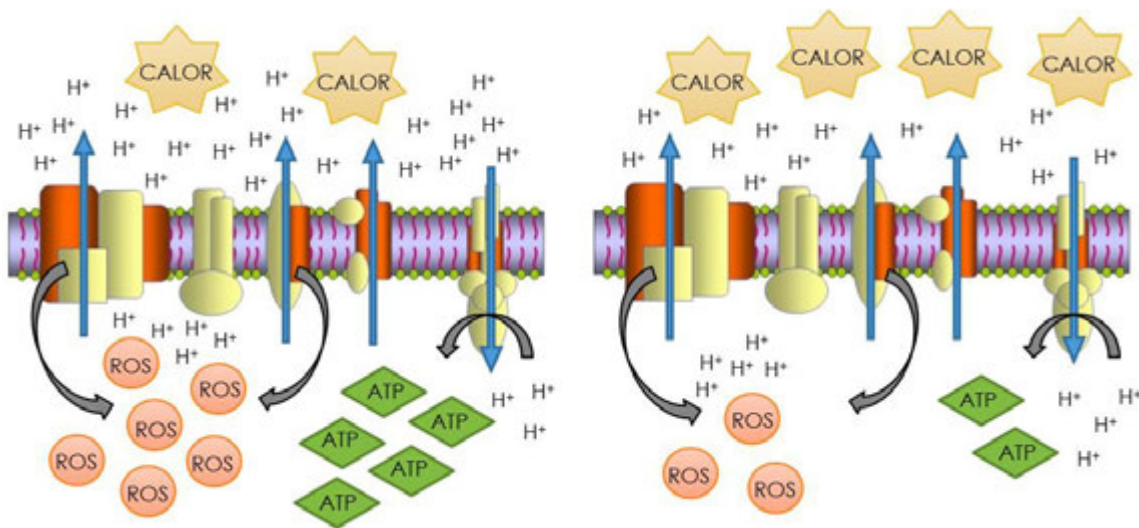
Durant la fosforilació oxidativa s'oxida la nicotinamina adenina dinucleòtid i la flavina adenina dinucleòtid en les seves formes reduïdes, NADH i FADH<sub>2</sub>, respectivament. Aquest dos coenzims, generats durant la glicòlisi i l'oxidació dels àcids grassos (NADH) i el cicle dels àcids cítrics (FADH<sub>2</sub>), són el fuel necessari per a convertir l'oxigen molecular en aigua gràcies al seu elevat potencial de transferència, és a dir, que són capaços d'alliberar una gran quantitat d'energia un cop finalitza la seva oxidació. L'energia derivada del pas de protons a través dels complexos a l'espai intermembrana genera un gradient electroquímic ( $\Delta\mu$ ) que indueix a que els protons retornin a la matriu mitocondrial a través del complex V o ATP sintasa, la qual associa el bombeig de protons a la síntesi d'ATP a partir de l'ADP i fosfats inorgànics (Walker 2013). El dispositiu es coneix amb el nom d'acoblament quimiosmòtic (Mitchell 1961). D'aquesta manera el consum d'oxigen de la ETC està acoblat a la fosforilació de l'ADP per l'ATP aprofitant el gradient electroquímic.

La funció mitocondrial és responsable de la major part del consum d'oxigen dins la cèl·lula. Els intermediaris en els processos de reducció de l'oxigen s'anomenen radicals lliures, els quals són molècules que contenen un electró no aparellat (radical) i són capaces d'existir amb independència (lliures). Els radicals lliures que deriven del metabolisme de l'oxigen són coneguts amb el nom de ROS (Prescott and Bottle 2017).

Tot i l'eficiència del sistema OXPHOS per a produir ATP, la mitocòndria és la principal font cel·lular generadora de ROS (Diebold and Chandel 2016). En efecte, s'estima que un 95% del ROS generat en condicions cel·lulars normals deriva de la fuga d'electrons dels complexos que conformen la ETC (Turrens 2003). Els ROS produïts pels processos cel·lulars són l'anió superòxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i el radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ). Quant els electrons passen a través dels complexos, un petit percentatge (1-2%) es filtren a l'oxigen molecular, resultant en la formació del radical  $\cdot\text{O}_2^-$ , que és el precursor de la majoria d'aquestes espècies.

Sota condicions fisiològiques, el complex I i el complex III de la ETC són les principals fonts d' $\cdot\text{O}_2^-$  (Chen and Zweier 2014). En el complex I, els dos segments més representatius involucrats en la producció de l'anió, són: el cofactor FMN i el segment localitzat en el lloc d'unió de la semiubiquinona ( $\text{UQ}\cdot^-$ ) (Treberg et al. 2011), tot i que altres estudis han demostrat que els centres de Fe-S també podrien jugar un paper secundari en la generació de ROS (Huang et al. 2016a). En el complex III de la ETC, tot el cicle Q està involucrat en la producció de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Dudylyna et al. 2018). Tanmateix, diversos estudis també evidencien el lligam entre la sobreproducció de  $\cdot\text{O}_2^-$  i el complex II de la ETC (Quinlan et al. 2012), i amb el complex IV només sota condicions d'hipòxia (Prabu et al. 2006).

En definitiva, la generació de ROS en la mitocondria depèn de diversos factors com la disponibilitat de NADH i FADH<sub>2</sub> o la concentració d'oxigen (Kalogeris et al. 2014). Altres factors que intervenen en control de la producció de ROS són la disfunció endotelial, les proteïnes desacoblants i les citocines (Cardenas 2018; Chen et al. 2018). La activació de les proteïnes desacoblants, que actuen com a transportadors de la membrana interna mitocondrial permeten que alguns protons puguin retornar a la matriu a través d'una via independent al canal protònic de l'ATP sintasa, causant un lleu desacoblament dels components de la cadena, i que en definitiva es generi menys ATP (Busiello et al. 2015). Per a que la cèl·lula mantingui els nivells d'ATP necessita seguir bombejant protons per mantenir el gradient electroquímic, de manera que l'excés d'energia generat per les reaccions que succeeixen a l'ETC s'acaba alliberant en forma de calor. Així doncs, el desacoblament de l'ETC implica una reducció de l'eficiència del sistema OXPHOS, el que es reflexa en una menor generació de ROS i una menor síntesi d'ATP (Figura 3).



**Figura 3. Eficiència d'acoblament OXPHOS.** A l'esquerra un sistema OXPHOS acoblat i a la dreta un sistema OXPHOS desacoblat (modificat de Gómez-Duran et al. 2011).

El desacoblament d'OXPHOS no només està involucrat en el control del ROS, sinó que també ho està en la termogènesis (Kadenbach 2003). L'eficiència amb la que el gradient electroquímic genera ATP es coneix amb el nom d'eficiència d'acoblament. D'aquesta manera, es parla d'un sistema molt acoblat o molt eficient energèticament quan les mitocondries acoblant eficientment el flux d'electrons al bombeig de protons i el retorn d'aquests a la matriu per la síntesi d'ATP, generant molta energia, però poc calor, i per tant, més ROS. En canvi, els sistemes mitocondrials menys eficients són aquells amb més pèrdues en forma de calor, menys síntesi d'ATP i menys producció de ROS (Krzywanski et al. 2011) (Figura 3). Aquest mecanisme, com es comentarà més endavant, ha estat fonamental en el procés d'adaptació al clima per part de la nostra espècie.

### 1.1.3. Sistema genètic mitocondrial

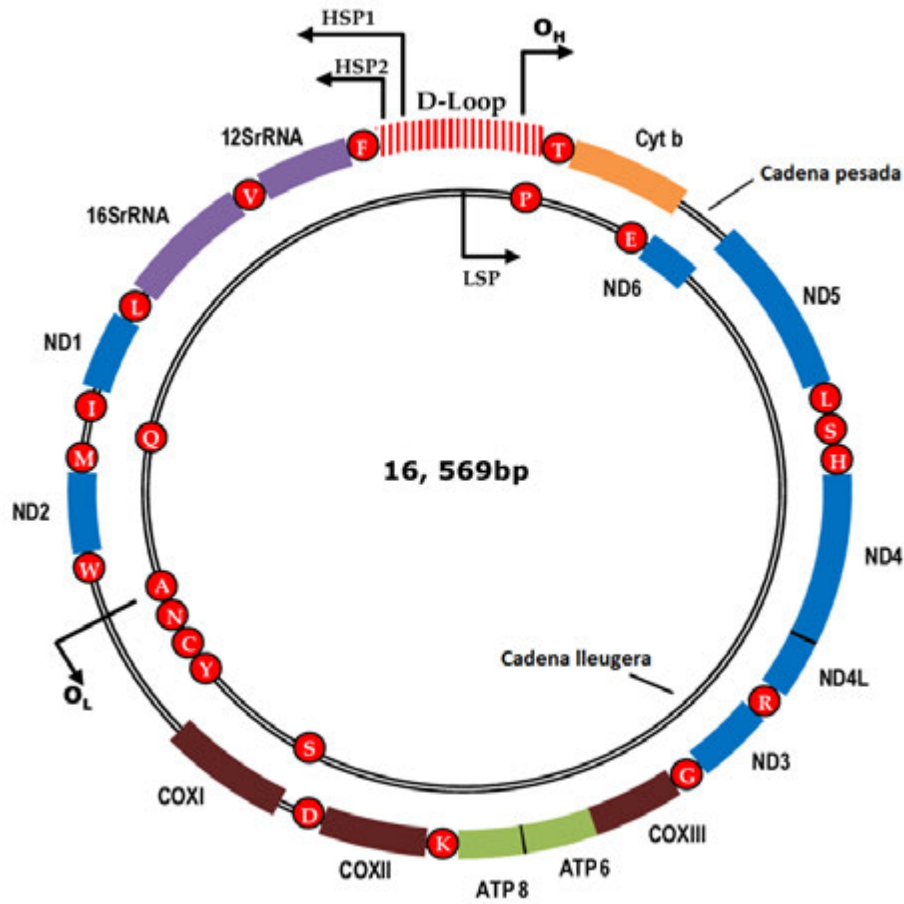
#### 1.1.3.1. Estructura i organització de l'ADN mitocondrial

És el passat de la mitocòndria com organisme autònom el que permet explicar algunes de les característiques més representatives d'aquest orgànul, com el fet de que posseeixi el seu propi genoma. L'ADN mitocondrial (ADNmt) es localitza a la matriu mitocondrial juntament amb tota la maquinària necessària per replicar, transcriure i traduir la informació genètica en una estructura denominada nucleoide (Lee and Han 2017). No obstant, les mitocòndries no són del tot autònomes i depenen del genoma nuclear per portar a terme l'expressió del seu sistema genètic (Sepuri et al. 2017).

L'ADNmt humà és una molècula circular en forma de doble cadena de 16.569 pb cada una, però amb un pes molecular diferent: la cadena pesada (H; *Heavy Strand*) rica en guanina; i la cadena lleugera (L; *Light Strand*) rica en citosina. La seqüència de l'ADNmt es coneix en la seva totalitat (Anderson et al. 1981) i actualment la revisió de la seqüència original (rCRS; *revised Cambridge Reference Sequence*), realitzada per Andrews et al. (1999) és la més utilitzada com a seqüència de referència ([NC\\_012920.1](#)).

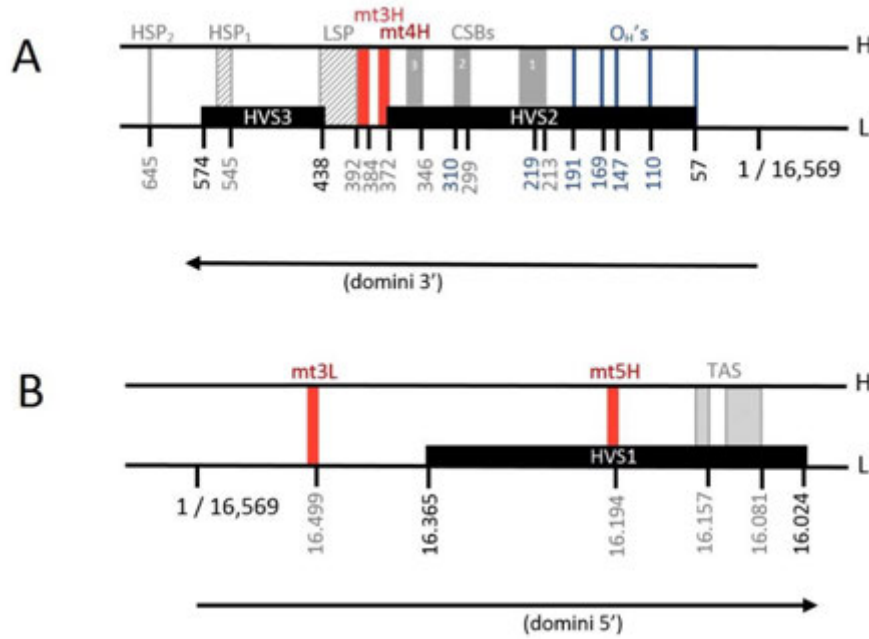
La característica estructural més destacada del genoma mitocondrial és la disposició dels seus gens, situats un a continuació del altre, ja que no té introns i només un 7% correspon a regions no codificants (Figura 4). L'ADNmt es compon d'una regió no codificant que inclou un bucle de desplaçament (D-loop; *Displacement Loop*) i una regió codificant. Aquesta última conté informació per a 37 gens que codifiquen per 2 subunitats (12S i 16S) de l'ARN ribosomal (ARNr), 22 ARN de transferència (ARNt) i 13 polipèptids que formen part dels complexos I, III, IV i V de la ETC. Vint-i-vuit dels gens mitocondrials (2 ARNr, 14 ARNt i 12 polipèptids) es localitzen a la cadena H o pesada, mentre que els 9 gens restants (8 ARNt i 1 polipèptid) ho fan a la cadena complementària (L o lleugera).

De fet, el proteoma mitocondrial consta de 1.500 polipèptids, dels qual només els 13 mencionats són codificats directament per l'ADNmt. En concret, 7 subunitats del complex I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 i ND6), 1 subunitat del complex III (CYB), 3 subunitats del complex IV (CO1, CO2 i CO3) i 2 subunitats del complex V (ATP6 i ATP8). El genoma nuclear codifica per tota la resta de proteïnes mitocondrials implicades en la replicació i transcripció incloent: les 4 subunitats del complex II, les subunitats de la DNA polimerasa  $\gamma$  (POL- $\gamma$ ), la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM) i B2 (TFB2M), els factors d'elongació (TEFM) i terminació (MTERF1), així com els enzims metabòlics mitocondrials (D'Souza and Minczuk 2018). Aquests elements es reconeixen gràcies a una seqüència líder localitzada a l'extrem N-terminal que funcionen com a senyals de direccionament i finalment són transportats a les mitocòndries (Wiedemann and Pfanner 2017).



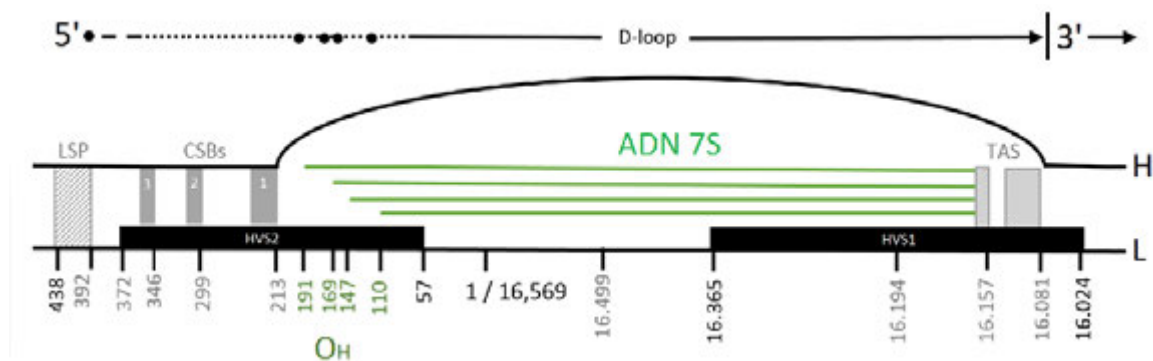
**Figura 4. Genoma mitocondrial humà.** Es mostra la localització dels següents gens: subunitats del complex I en color blau: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 i ND6. El citocrom b (Cyt b) del complex III en color taronja. Les subunitats del complex IV en color marró: COXI, COXII i COXIII. Les subunitats de l'ATP-sintasa o complex V: ATP6 i ATP8 en color verd. Els gens per als ARnt es designen amb codi d'una lletra i estan representats amb un cercle vermell. Els ARNr 16S i 12S estan representats en color lila. Les fletxes indiquen els promotors de transcripció de la cadena pesada (HSP) i la lleugera (LSP) de l'ADNmt i els orígens de replicació  $O_H$  i  $O_L$  per a la cadena pesada i lleugera, respectivament (modificat de Mohamed Yussof 2015).

L'ADNmt també conté una regió no codificant anomenada regió control (RC) que compren 1.122 pb (posicions 16.024-576) i se situa entre el gen que codifica per l'ARNt<sup>Pro</sup> i l'ARNt<sup>Phe</sup>. La RC s'anomena així perquè inclou l'origen de replicació de la cadena pesada ( $O_H$ ), les seqüències conservades relacionades amb l'origen de la replicació de la cadena pesada (CSB I, CSB II i CSB III), els promotors de la transcripció de les cadenes pesada i lleugera (HSP i LSP, respectivament), els elements reguladors de l'expressió gènica, com els llocs d'unió de TFAM i la seqüència associada a la terminació (TAS; *Termination Associated Sequence*). A més, aquesta regió destaca per concentrar les regions més polimòrfiques de l'ADNmt, les regions hipervariables: HVRI (posicions 16.024-16.365), HVRII (posicions 73-340) i HVRIII (posicions 438-576) (Anderson et al. 1981) (Figura 5).



**Figura 5. Regió control de l'ADNmt.** A. Regió control 576-1: inclou les regions hipervariable 2 (HVS2) i 3 (HVS3), els promotors de transcripció de la cadena pesada (HSP) i la lleugera (LSP), tres seqüències conservades (CSB1, CSB2, CSB3), l'origen de replicació per a la cadena pesada ( $O_H$ ) i els elements de control: mt3H i mt4H. B. Regió control 16.024-16.569: inclou la regió hipervariable 1 (HVS1), la seqüència associada a la terminació (TAS) i els elements de control: mt3L i mt5H (font: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/GenomeLocI>).

En la RC de moltes molècules d'ADNmt també podem identificar una regió de triple cadena d'aproximadament 650 pb anomenada ADN 7S segons les seves propietats de sedimentació. La formació d'aquesta nova cadena durant la replicació de l'ADNmt provoca un desplaçament (o D-loop) de la cadena H o pesada quan s'hibrida amb la cadena L o lleugera (Nicholls and Minczuk 2014) (Figura 6).



**Figura 6. D-loop.** Estructura detallada de la regió control i D-loop de l'ADNmt. S'indiquen les posicions dels extrems principals 5' de l'ADN 7S (verd) (modificat de Nicholls and Minczuk 2014).

El D-loop s'estén des de l' $O_H$  (en l'extrem 5' del l'ADN 7S) fins la seqüència associada a la terminació (TAS) (en l'extrem 3' de l'ADN 7S), i entre les múltiples funcions que es creu que té, s'inclouen la d'actuar com un lloc de reclutament de les proteïnes involucrades en l'organització de l'ADNmt en nucleoides, la de mantenir la concentració de grups dNTP al

llarg del cicle cel·lular i la de funcionar com un component clau de la replicació de l'ADNmt (Nicholls and Minczuk 2014).

En definitiva, l'organització de l'ADNmt li atorga unes característiques genètiques pròpies que el diferencien de les de l'ADN nuclear (ADNn). Així doncs, les particularitats que presenta l'estructura genètica i l'organització de l'ADNmt tindran conseqüències molt importants en el seu processament (Yasukawa and Kang 2018), fent de la RC una zona d'especial rellevància per al manteniment, replicació i transcripció de l'ADNmt.

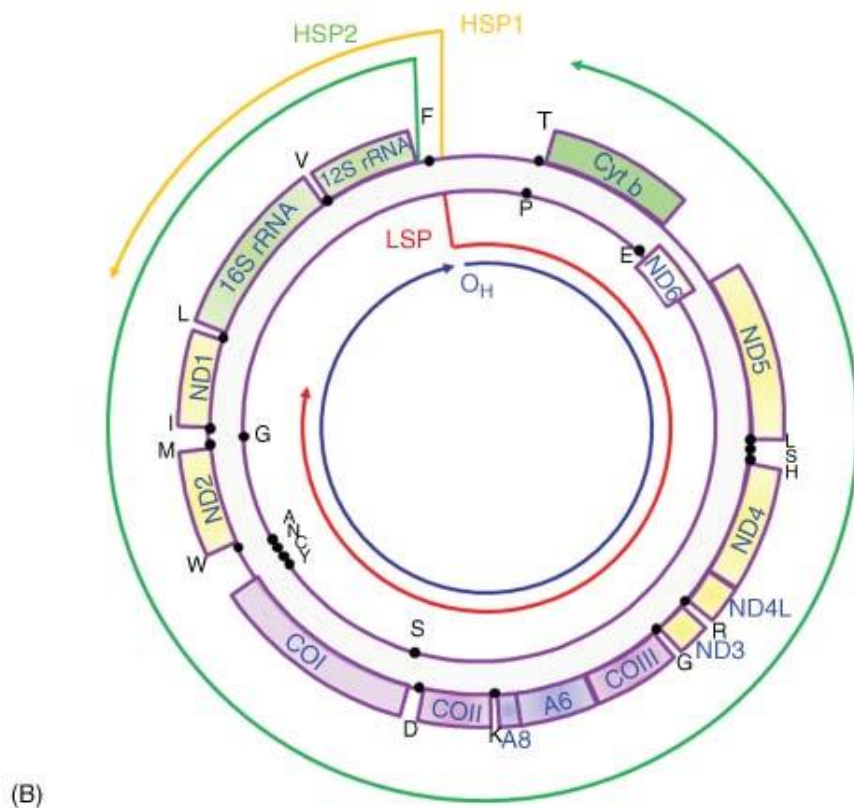
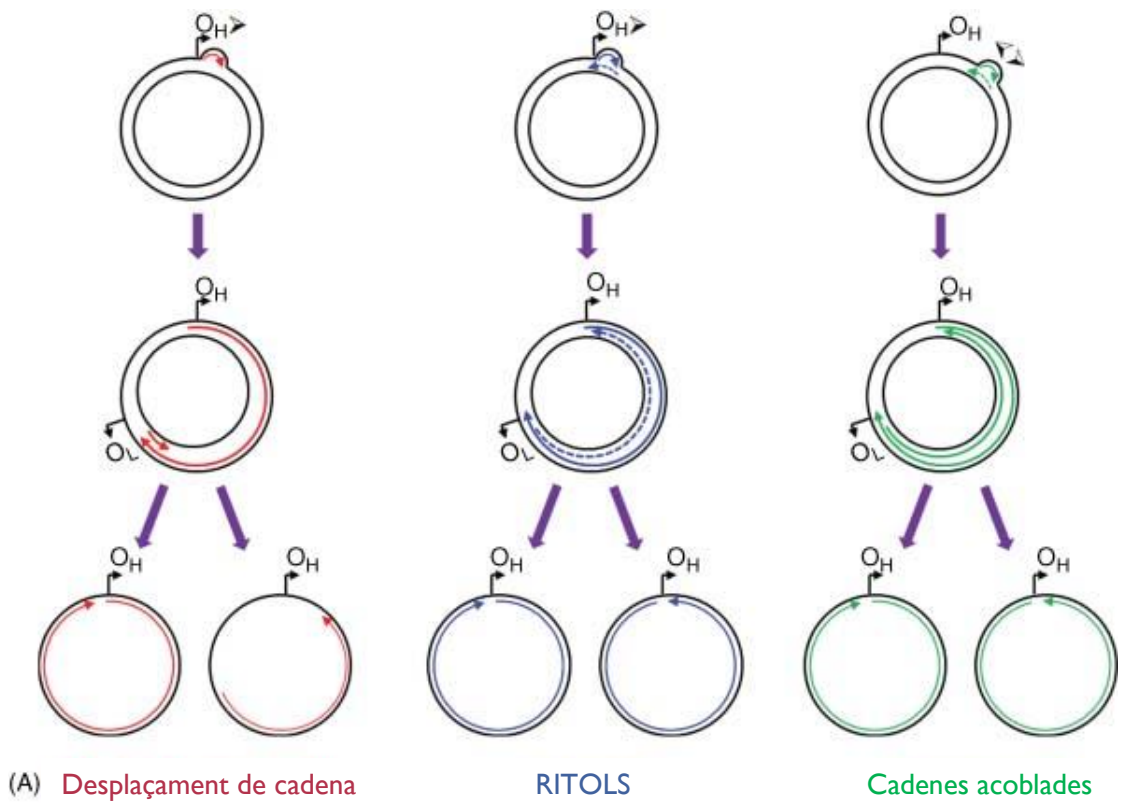
### 1.1.3.2. Manteniment de l'ADN mitocondrial: replicació i transcripció

La replicació coordinada i l'expressió del genoma mitocondrial és un procés clau per el manteniment de la homeòstasis cel·lular. La replicació del genoma mitocondrial és un fenomen que ocorre de manera independent a la divisió cel·lular, ja que tant sols esta determinat per el requeriment energètic de la cèl·lula.

Actualment, existeixen dos models de replicació de l'ADNmt (Figura 7). El model de *desplaçament de cadena*, basat en una replicació asimètrica i asincrònica (Clayton 1982), en el qual la replicació s'inicia en l'O<sub>H</sub> per a la cadena pesada o H. Segons aquest model, la replicació comença amb la síntesi d'un petit ARN iniciador (ARN 7S) a partir del promotor de la cadena lleugera o LPS, que es perllonga per l'acció de l'ADN POL- $\gamma$  específica de la mitocòndria. La transició de síntesi de l'ARN a síntesi d'ADN es produeix al voltant de la regió CSB II (Crews et al. 1979; Kang et al. 1997; Pham et al. 2006). L'elongació de l'ADN, que queda unit a l'ADN motlle, acaba desplaçant la cadena pesada o H per formar una triple hèlix (D-loop) (Figura 6). Sovint, una gran part de la síntesi de l'ADNmt acaba prematurament un cop ha avançat unes 650 bases des del seu origen fins la regió TAS, donant lloc a l'ADN 7S. Actualment, es desconeixen les causes que provoquen aquesta terminació prematura (Pereira et al. 2008), però a la regió TAS s'han identificat diversos punts d'unió a proteïnes, com la proteïna de terminació de la transcripció MTERF (Hyvarinen et al. 2007) o el paper de l'helicasa TWINKLE en aquesta regió (Jemt et al. 2015), que es creu que podrien estar-hi involucrades. Per tant, es possible que la replicació de l'ADNmt es reguli a nivell de la preterminació en lloc de la iniciació. Si pel contrari, la síntesi de la cadena pesada o H continua, es considera que la síntesi de l'ADNmt entra en un cicle complet de replicació. En aquest cas, quan el bucle de desplaçament arriba a l'origen de replicació de la cadena lleugera (O<sub>L</sub>), localitzat entre els ARNt<sup>Cys</sup> i ARNt<sup>Asn</sup>, comença la replicació de la cadena lleugera o L en el sentit contrari. D'aquesta manera, ambdós cadenes es sintetitzen de manera continua.

Més recentment, Holt et al. (2000) varen proposar un model alternatiu basat en l'acoblament bidireccional de cadenes (model de cadenes acoblades) que finalment va donar lloc a l'anomenat model *RITOLS* (*RNA incorporation throughout the lagging strand*) (Yasukawa et al. 2006). En aquest model, la replicació de l'ADNmt succeiria de manera simètrica i simultània en ambdós cadenes, produint uns intermediaris de replicació, híbrids d'ARN-ADN, en un procés similar a la replicació de l'ADNn. A més, va permetre assignar múltiples orígens de replicació de la cadena pesada en una regió a prop de l'O<sub>H</sub> (Bowmaker et al. 2003) (Figura 7A). Actualment no existeixen evidències experimentals suficient que permetin descartar ningun dels dos models, existint una gran controvèrsia (Cluett et al. 2018).





**Figura 7. Representació dels models de replicació i transcripció de l'ADNmt.** A. Models actuals de replicació. Les línies contínues i discontinues representen l'ADN i l'ARN, respectivament. B. Model de transcripció (modificat de Saccone and Gadaleta 2017).

Independentment del mecanisme, la maquinària implicada en la replicació de l'ADNmt inclou: la POLRMT que forma el cebador necessari per iniciar la síntesi de la cadena H; les dues subunitats que formen part de l'ADN polimerasa mitocondrial (Pol- $\gamma$ A i Pol- $\gamma$ B), responsable de la síntesi d'ADN en processos de replicació i reparació; una helicasa (TWINKLE), encarregada de la ruptura d'enllaços d'hidrogen de les dues cadenes del ADNmt, permetent l'acció de Pol- $\gamma$ ; i la proteïna d'unió a l'ADN de cadena senzilla mtSSBP, encarregada de cobrir i estabilitzar la cadena desplaçada (cadena pesada o H), incrementant la fidelitat i progressió de la Pol- $\gamma$  i bloquejant l'acció de la POLRMT (Falkenberg 2018).

La transcripció de l'ADNmt s'origina a partir de tres promotors - LSP, per la cadena lleugera o L, i l'HSP1 i HSP2, per la cadena pesada o H - que condueixen l'expressió dels transcrits (D'Souza and Minczuk 2018). D'una banda, la cadena pesada transcriu dues unitats de transcripció; la primera d'elles, que es transcriu més freqüentment, comença en el lloc d'iniciació HSP1 i acaba en l'extrem 3' del gen de ARNr 16S, per l'acció del factor de terminació (MTERF) (Shokolenko and Alexeyev 2017), i per tant, és responsable de la síntesi dels ARNr 12S i 16S, del ARNt<sup>Phe</sup> i del ARNt<sup>Val</sup>. El segon procés de transcripció, molt menys freqüent, comença en el punt d'iniciació HSP2, prop de l'extrem 5' del gen ARNr 12S i produeix un ARN policistrònic que correspon a gairebé la totalitat de la cadena pesada. Els ARNm de 12 pèptids i 12 ARNt s'originen per processament d'aquest ARN policistrònic. D'altra banda, la cadena lleugera o L, es transcriu a partir d'una única unitat de transcripció que s'inicia en LSP, donat lloc a 8 ARNt i a l'únic ARNm (ND6) codificat per aquesta cadena (Figura 7B).

En mamífers, l'inici de la transcripció requereix l'associació de la POLRMT i els factors de transcripció mitocondrial A (TFAM) i B2 (TFB2M). TFAM és una proteïna d'unió a l'ADN que, a més de l'activació de la transcripció, també empaqueta l'ADNmt en el nucleòide (Kukat et al. 2015). L'evidència mostra que TFAM recluta la POLRMT en el lloc del promotor, mentre que TFB2M modifica l'estructura de POLMRT per induir l'obertura del promotor i permet la fusió de tots els components implicats per iniciar la transcripció (Posse and Gustafsson 2017). Durant l'elongació, la POLRMT requereix de la intervenció del factor d'elongació de la transcripció (TEFM) (Minczuk et al. 2011), en canvi, per la terminació requereix la presència d'MTERF1 (Shokolenko and Alexeyev 2017). Curiosament, la transcripció de la cadena lleugera o L s'atura prematurament al voltant del bloc CSB II de la RC, com a resultat de la formació d'un quàdruplex G híbrid entre el nou l'ARN i la cadena pesada o H (Agaronyan et al. 2015). Aquest esdeveniment es produeix a prop de l'O<sub>H</sub> de la cadena pesada i genera el cebador per iniciar la replicació d'acord al model asimètric. En base a aquests fets, Agaronyan et al (2015) varen proposar que la transcripció i la replicació són mútuament excloents, ja que el factor TFEM serveix com un interruptor molecular en la regió CSB II, que modula la formació del cebador per la replicació i augmenta la progressió de l'elongació. Aquest mecanisme pot ser essencial per regular el nombre de còpies de l'ADNmt i pot tenir implicacions en les funcions i patologies mitocondrials.

Així doncs, el manteniment i l'expressió de l'ADNmt es pot regular en almenys 4 nivells diferents: (a) en el moment d'iniciar la transcripció a partir del LSP, perquè la transcripció és un requisit per la formació del cebador de la replicació; (b) durant la terminació o processament del transcrit LSP en la regió CSB II, que controla l'inici de la replicació de l'ADNmt; (c) en el moment de la terminació prematura de la replicació, a la regió TAS, donant lloc a la formació de l'ADN 7S; i (d) controlant el grau de compactació de

l'ADNmt es pot arribar a regular la fracció de molècules que es troben disponibles per iniciar la replicació (Gustafsson et al. 2016).

### 1.1.3.3. Característiques de l'ADN mitocondrial

Entre les característiques de l'ADNmt en destaca la seva herència exclusiva materna, característica que confereix la possibilitat d'estudiar llinatges al llarg del temps a partir dels ancestres materns de les poblacions (Breton and Stewart 2015). No obstant, recentment aquesta teoria s'ha posat en dubte al documentar-se 17 casos inèdits d'herència mitocondrial paterna (Luo et al. 2018). Tanmateix, l'ADNmt es present amb un gran nombre de còpies en les cèl·lules humanes (rang: 1.000 i 10.000 còpies per cèl·lula, amb 2-10 molècules d'ADN per mitocòndria) (Zhang et al. 2013), confirmant que existeix una variació en el nombre de còpies depenent el teixit on es localitzen les mitocòndries (Tilokani et al. 2018). El genoma mitocondrial també es caracteritza per tenir una taxa de mutació més alta (aproximadament 100 vegades) que la del genoma nuclear. S'ha acceptat prèviament que l'entorn altament oxidatiu (Richter et al. 1988) i la baixa eficàcia dels mecanismes de reparació en la mitocòndria (Bogenhagen 1999) són responsables d'aquesta taxa, no obstant, recentment diversos estudis han qüestionat aquests mecanismes i suggereixen que la mutació és una propietat endògena de la replicació de l'ADNmt (Melvin and Ballard 2017). Aquest fet propicia l'existència d'una població heterogènia dins de la mateixa cèl·lula, e inclús dins de la mateixa mitocòndria, fenomen que es coneix amb el nom d'heteroplàsmia (Stewart and Chinnery 2015). Amb la millora dels mètodes de seqüenciació, es va detectar que l'heteroplàsmia és més freqüent del que es pensava (Floros et al. 2018), i no és necessàriament un estat relacionat amb patologies (Ramos et al. 2013). A més, a través d'aquesta característica especial de l'ADNmt, s'ha pogut trencar el "dogma" de l'absència de recombinació en aquest ADN, ja que els nous resultats reforcen l'evidència de que la recombinació del genoma mitocondrial ha estat present al llarg de tota la història evolutiva de la nostra espècie (Perera et al. 2018).

### 1.1.4. Variants genètiques de l'ADN mitocondrial

Durant els últims anys s'ha postulat que l'elevada taxa de mutació de l'ADNmt es deu a la combinació entre la susceptibilitat als mutàgens i la baixa eficàcia dels mecanismes de reparació en les mitocòndries. Es pot afirmar que la producció de ROS en concentracions fisiològiques està vinculat amb la modulació de vies de senyalització i de l'expressió gènica, permeten l'activació de factors de creixement i promovent la proliferació, diferenciació i la migració cel·lular (Garlid et al. 2013). No obstant, l'alliberament incontrolat de ROS pot conduir a l'oxidació de components cel·lulars com proteïnes, lípids i ADN (Edeas 2011), creant un entorn altament mutagen en la matriu mitocondrial. Per tant, el desequilibri oxidatiu podria donar lloc a una disfunció mitocondrial i com a conseqüència, causar danys cel·lulars importants i malalties associades (Wallace and Chalkia 2013) (Figura 8).

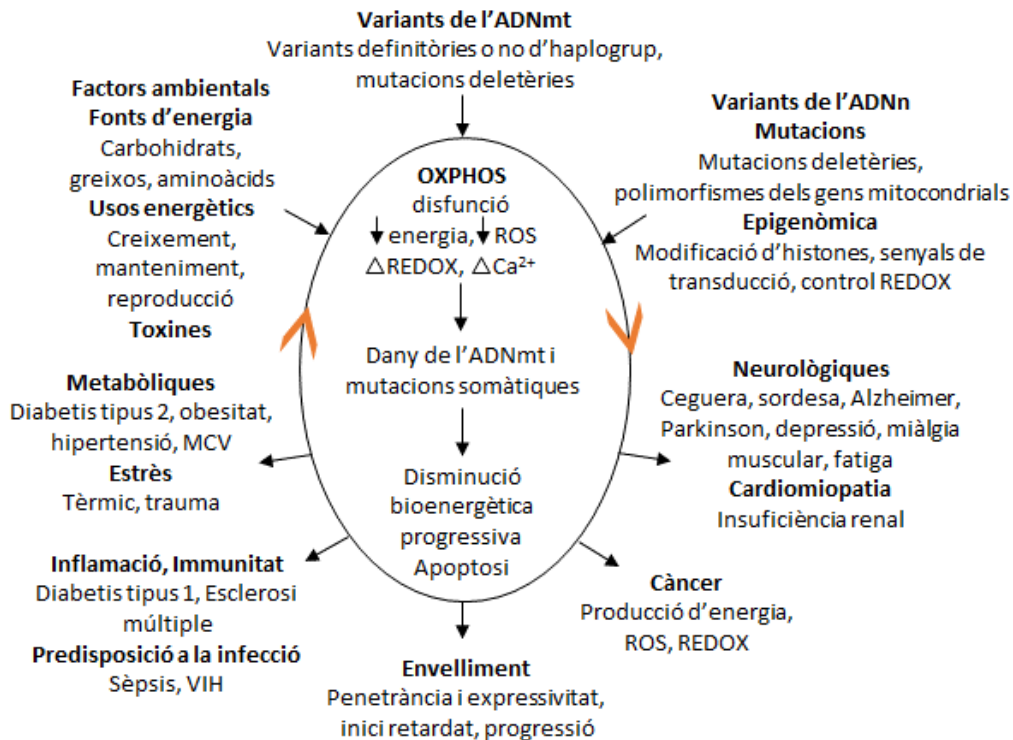


Figura 8. Exemple d'etiologia mitocondrial de les malalties complexes (modificat de Wallace and Chalkia 2013).

Tot i així, encara que tant les ROS com les pròpies variants de l'ADNmt juguin un paper important en l'envelliment i en el desenvolupament de determinades malalties, la hipòtesi sobre el dany directe a l'ADNmt per part de les ROS es cada vegada més criticada (Batic et al. 2015; Greaves et al. 2014; Ju et al. 2014; Pinto and Moraes 2015; Valente et al. 2016; Wanagat et al. 2015). De manera que l'evidència actual suggereix que els errors de replicació i reparació podrien ser la causa principal de l'elevada taxa de mutació de l'ADNmt (Melvin and Ballard 2017).

Moltes de les variacions de l'ADNmt en forma de delecions, insercions o substitucions, s'han associat prèviament amb diferents malalties relacionades amb l'estrès oxidatiu, entre les quals en destaquen les malalties cardiovasculars (MCV) (Panth et al. 2016; Sam et al. 2005; Taverne et al. 2013). El compendi de variacions de l'ADNmt humà es pot trobar a MITOMAP (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>). Existeixen tres classes de variacions en l'ADNmt que poden tenir rellevància clínica: les variants definitòries d'haplogrup, les variants polimòrfiques que no defineixen cap haplogrup, i les mutacions somàtiques que s'acumulen en els teixits a través de l'edat (Lott et al. 2013).

#### 1.1.4.1. Variants definitòries d'haplogrup

L'elevada taxa de mutació de l'ADNmt, així com l'elevada influència de la deriva genètica en el mateix, provoca que algunes de les variants mitocondrials perdurin estables i s'heretin de generació en generació. Aquest fet ha permès reconstruir la història evolutiva de les poblacions humanes i els seus moviments migratoris (Kivisild 2015), els quals són una

de les causes de la variabilitat mitocondrial a partir de la selecció natural de mutacions que confereixen una avantatge evolutiva en l'adaptació a noves condicions geogràfiques i ambientals.

Aquestes variants es varen acumular al llarg dels llinatges e irradiar durant l'expansió humana fora d'Àfrica. Per tant, cada continent i regió geogràfica estan associats a una matriu distintiva de tipus de seqüències d'ADNmt, el que permet subdividir les poblacions en una sèrie d'agrupacions amb característiques genètiques comuns. Els diferents conjunts de polimorfismes característics de cada població han donat lloc als anomenats *haplogrups mitocondrials*. Aquest fet implica que els polimorfismes que defineixen cada haplogrup mitocondrial es van produir exclusivament en les línies antecessores de totes les variants que l'integren.

A la figura 9 es mostra la distribució dels diferents haplogrups mitocondrials segons la nomenclatura que s'utilitza actualment al Phylotree (<http://www.phylotree.org>) (van Oven and Kayser 2009), la qual s'ha determinat a través de rigorosos anàlisi de tot el genoma mitocondrial en multitud de poblacions d'arreu del món. Segons la teoria de les migracions, l'arbre de l'ADNmt humà s'inicia a l'Àfrica ~200.000 anys abans del present (AP) (Hublin et al. 2017), moment en el que es va originar la divergència del macrohaplogrup L\*, format per els llinatges específics de l'Àfrica subsahariana: L0-L6. De l'haplogrup present en el nord-est d'Àfrica L3\*, en varen sorgir dos llinatges nous, l'M i l'N (62.000 – 95.000 anys AP) (Fu et al. 2013), que varen ser els únics en evolucionar fora d'Àfrica originant la present variació de l'ADNmt a Europa, Àsia, Amèrica i Oceania.

D'una banda, el macrohaplogrup M es va estendre per el sud-est asiàtic i Oceania formant els haplogrups M\*(incl. Q), M7, M8 (incl. C i Z), M9 (incl. E), G i D. D'altra banda, el macrohaplogrup N es va expandir cap al pròxim orient i Europa originant els haplogrups N\* (incl. O i S), N1 (incl. I), N2 (incl. W), N9 (incl. Y), A, X i el submacrohaplogrup R (format per R\* [incl. P], R0 [incl. HV: V i H], JT [incl. J i T], R9 [incl. F], B i U [incl. K] (van Oben and Kayser, 2009).

Els haplogrups U, HV, JT, N1, N2 i X són avui en dia els més comuns a Europa, al sud-oest d'Àsia i al nord d'Àfrica (Soares et al. 2010); els haplogrups R5-R8, M2-M6 i M4'67 es troben restringits al sud d'Àsia (Chaubey et al. 2007), mentre que els haplogrups A-G, Z i M7-M9 en són més comuns a l'est (Stoneking and Delfin 2010). A Oceania els haplogrups B i E són freqüents a Polinèsia, l'arxipèlag Malai, Taiwan i Madagascar, mentre que al continent australià en destaquen els haplogrups M14, M15, M27-M29, Q, O, P i S (Nagle et al. 2017). Finalment, alguns subgrups d'A, B, C, D i X varen migrar cap al continent americà per a fundar les poblacions natives americanes (Kivisild 2015).

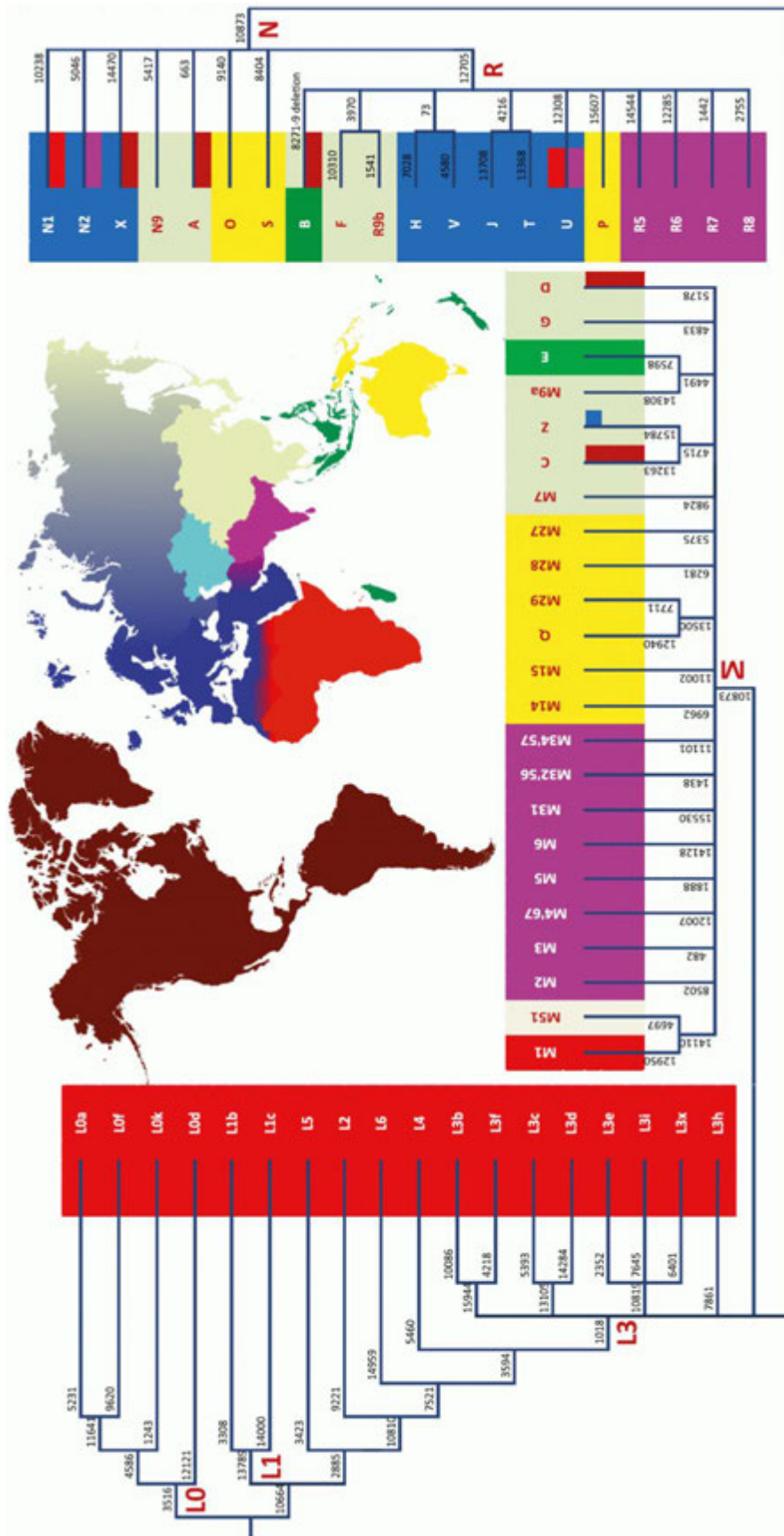


Figura 9. Relacions filogenètiques dels principals haplogrups. La distribució de cada haplogrup coincideix aproximadament amb les poblacions de determinades àrees geogràfiques (Kivisild 2015).

## Filogènia Europea

Les anàlisis existents indiquen que la majoria dels llinatges de l'ADNmt a Europa es van originar després de l'última glaciació (Posth et al. 2016), fent de l'HV, l'U i el JT els clústers dels haplogrups mitocondrials més freqüents a Europa en l'actualitat (Rishishwar and Jordan 2017).

El clúster majoritari és l'HV, el qual conté els haplogrups HV\* (incl. V) i H. D'entre ells, l'haplogrup H compren aproximadament el 45% de la variació total de l'ADNmt en la major part d'Europa, amb menors freqüències al sud i a l'est, d'aproximadament el 20% en la zona de Turquia i el Caucas, el 17% a Iran i <10% en els països del golf pèrsic (Roostalu et al. 2007). Fins ara, s'han descrit més de 90 subhaplogrups d'H; sent els més comuns l'H1, l'H3 i l'H5, els quals també mostren una distribució regional característica. En aquest sentit, l'H1 és el subgrup més comú a Europa, i representa aproximadament la meitat dels llinatges d'H a l'Europa Occidental (Roostalu et al. 2007). Les freqüències més elevades d'H1 es troben entre els bascos (27,4%) i altres poblacions del nord de la Península Ibèrica (Behar et al. 2012). Més enllà d'aquesta regió, també s'han observat freqüències superiors al 10% d'aquest subgrup a França, Cerdanya, les Illes Britàniques i els Alps, i del 5% en gairebé la resta del continent (Achilli et al. 2004). En aquesta mateixa línia, H3 representa la segona fracció més gran de l'haplogrup H i presenta una distribució molt similar a H1, però és generalment de dues a tres vegades menys freqüent.

Els altres clústers majoritaris són l'U i el JT, que en conjunt representarien un ~40% de la població europea. L'haplogrup U comprèn aproximadament la meitat d'aquest percentatge i es distribueix des de l'Índia fins a Portugal, i des del nord del continent europeu fins al nord d'Àfrica (Achilli et al. 2005). L'haplogrup U també se subdivideix en diferents subhaplogrups; U1, U5, U6 i un quart subgrup, que alhora es divideix en U2, U3, U4'9, U7 i U8 (incl. K), els quals també mostren patrons amb freqüències específiques de regió en les poblacions actuals. Els subhaplogrups U1 i U3 es restringeixen a les regions del pròxim orient i el Caucas (Derenko et al. 2013), mentre que U4 i U5 ho fan a Europa, presentant freqüències que oscil·len entre 2-6% i 5-15%, respectivament, en la majoria de les regions. U4 és més freqüent en els països bàltics, mentre que U5 ho és al nord d'Europa (U5a) i al nord d'Espanya (U5b) (Malyarchuk et al. 2010). El subhaplogrup U6 també es troba limitat a les regions properes a la Mediterrània, i presenta un pic de freqüència al nord d'Àfrica (Secher et al. 2014), mentre que U8 és el més freqüent al nord-oest d'Europa (9-14%), mediterrani oriental (20%) i al pròxim orient (12%) (González et al. 2006). Els subhaplogrups U2 i U7 són els menys comuns (0,5%-2%), tot i que es distribueixen de manera molt homogènia en la major part d'Àsia central, pròxim orient, Europa, i nord d'Àfrica (Malyarchuk et al. 2008; Sahakyan et al. 2017).

Finalment, el clúster JT compren els haplogrups J i T (Ruiz-Pesini et al. 2004). L'haplogrup J es distribueix de manera uniforme per tot Europa i representa aproximadament el ~10% de la població, tot i que les freqüències més elevades s'han observat a Aràbia Saudi (21%) (Abu-Amero et al. 2008). Aquest es ramifica en dos subclúster principals: el J1 i el J2, ambdós definits per canvis en el citocrom b (Carelli et al. 2006). L'haplogrup T, que conforma el ~7% de la població europea, també es compon de dos branques principals, el subhaplogrup T1 i el T2 (SanGiovanni et al. 2009). Ambdues branques presenten distribucions molt diferents, diametralment oposades en la majoria de regions europees.

### *Diferències bioenergètiques entre haplogrups mitocondrials*

La filogènia mitocondrial tendeix a mostrar una major proporció de mutacions no sinònimes en les branques més recents, és a dir, que el ràtio dN/dS (mutacions no sinònimes respecte sinònimes) és menor en les seqüències africanes que en les europees (Kivisild et al. 2006). Una de les hipòtesis que s'ha proposat per explicar aquest fenomen se centra en el clima com a pressió selectiva (Ruiz-Pesini et al. 2004), el qual va ser una de les barreres ambientals més importants a superar durant la migració des de l'Àfrica subsahariana fins a Euràsia. D'acord amb aquesta idea, l'aparició de canvis en la seqüència de l'ADNmt van provocar una reducció de l'eficiència d'acoblament del sistema OXPHOS que tindria com a conseqüència un increment en la producció de calor en detriment de la generació d'ATP. Aquest fet suposaria un avantatge adaptatiu per a les poblacions humanes en un ambient fred, així com el requeriment d'una dieta més alta en calories (Wallace 2013a). No obstant, també suggereix que els haplogrups mitocondrial podrien jugar un paper molt important incrementant o disminuint la probabilitat de desenvolupar certes malalties (veure apartat: 1.2.2.2. Factors de risc no modificables per la CI i l'ACV, *haplogrups i malaltia cardiovascular*). En aquest sentit, els resultats obtinguts en els últims anys suggereixen que els haplogrups mitocondrials afecten de manera diferent el muntatge i l'estabilitat de la ETC (Chen et al. 2012; Kalogeris et al. 2014; Kenney et al. 2014a; Kenney et al. 2014b; Malik et al. 2014; Marcuello et al. 2009; Martinez-Redondo et al. 2010), i que els teixits particularment dependents del metabolisme oxidatiu, és a dir, el múscul cardíac o el sistema nerviós central, són especialment vulnerables a les alteracions de la funció mitocondrial (Gómez-Durán et al. 2010).

Un exemple d'aquesta teoria el trobem en els individus portadors de l'haplogrup J. Els SNPs característics d'aquest haplogrup provoquen un desacoblament de la ETC, de manera que es genera menys quantitat d'ATP a canvi de produir més energia en forma de calor (Ruiz-Pesini et al. 2004). Alhora, això comporta una menor producció de ROS que els hi atorga un efecte protector cap a malalties associades amb un elevat estrès oxidatiu. En diferents estudis realitzats en població europea s'ha constatat que els portadors de l'haplogrup J presenten una major longevitat en comparació a la resta de la població (De Benedictis et al. 1999; Niemi et al. 2003; Ross et al. 2001). Mitjançant l'ús de cíbrids transmitocondrials (cèl·lules que posseeixen el mateix genoma nuclear i que només es diferencien en el genoma mitocondrial), Gómez-Durán et al. (2010) varen trobar diferències en els nivells d'ADNmt i ARNmt, la síntesi de proteïnes mitocondrials, l'activitat i quantitat de citocrom oxidasa, el consum d'oxigen i el potencial de membrana interna entre cíbrids portadors dels haplogrups H i U en comparació als J, la qual cosa els associava amb la predisposició a patir malalties d'origen multifactorial (Gómez-Durán et al. 2010). Per tant, la causa d'aquestes diferències entre els haplogrups H i J recau probablement en les seves diferències de comportament a nivell energètic, ja que els portadors de l'haplogrup H són més eficient energèticament que els portadors de l'haplogrup J (Krzywanski et al. 2016). No obstant, la major generació d'ATP implica l'existència d'uns nivells més elevats de ROS, que en principi podrien ser perjudicial per a la supervivència cel·lular.

Més enllà de les diferències energètiques i la producció de ROS, ser portadors d'un determinat haplogrup també pot tenir altres conseqüències que impliquen l'alteració de l'expressió d'algunes de les principals rutes cel·lulars com les de l'apoptosi, la immunitat o la inflamació (Kenney et al. 2014a; Malik et al. 2014). En els estudis de Kenney et al. (2014a), els cíbrids J varen mostrar un increment dels nivells d'expressió relacionats amb la



proliferació cel·lular i la inflamació, disminuint els nivells d'expressió dels gens relacionats amb la ruta de l'apoptosi, al comparar-los amb els nivells dels híbrids H. Aquestes diferències també es varen poder observar al comparar els nivells d'expressió dels híbrids portadors d'un haplogrup europeu (H) en front a híbrids portadors d'un haplogrup africà (L), posant de manifest la influència del genoma mitocondrial i les seves variants polimòrfiques sobre l'expressió de gens nuclears (Kenney et al. 2014b).

#### 1.1.4.2. Variants polimòrfiques no definitòries d'haplogrup

Les variants mitocondrials que no designen cap haplogrup en específic, s'introdueixen contínuament a la població a causa de l'elevada taxa de mutació de l'ADNmt. Sovint són variants que mostren una heterogenicitat clínica considerable, ja que poden funcionar com al·lells de risc per a malalties complexes comuns o bé poden arribar a desenvolupar trastorns monogenètics.

Per una banda, existeixen polimorfismes de l'ADNmt que poden arribar a modular la susceptibilitat de les malalties multifactorials o complexes. La forma més comuna d'aquest tipus de variants és el canvi de base o SNP, ja que aquestes són relativament freqüents en la població general i tenen una baixa penetrància (Wang et al. 2012). Aquestes variants es caracteritzen perquè poden tenir un petit efecte additiu o multiplicatiu sobre el risc d'aquestes malalties, causant una sèrie de defectes funcionals en la mitocondria o actuant sinèrgicament amb altres variants patològiques, però per si mateixes no causen la malaltia. Els canvis en la regulació metabòlica constitueixen la base de les malalties comuns (Wallace 2013b), entre les que podríem destacar l'obesitat, la diabetis o les MCV (veure apartat: 1.2.2.2. Factors de risc no modificables per la CI i l'ACV, *SNPs i malaltia cardiovascular*), que en conjunt, representen la major causa de mortalitat i morbiditat en els països industrialitzats. Aquest fet ens indica que les mateixes variants podrien contribuir al risc de desenvolupar diferents malalties mentre aquestes comparteixin mecanismes mitocondrials comuns (Stewart and Chinnery 2015).

D'altra banda, hi ha mutacions rares i altament penetrants de l'ADNmt que són la causa principal dels trastorns mitocondrials hereditaris multisistèmics. Un dels primers exemples d'associació descoberts per Wallace et al. (1988a) va ser el canvi m.11.778G>A i la neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON). Altres exemples d'aquest tipus de mutacions, són la m.8.344A>G associada al fenotip d'epilèpsia mioclònia i malaltia de la fibra vermella esquinçada (MERRF) (Shoffner et al. 1990; Wallace et al. 1988b) o la m.3.243A>G associada al fenotip d'encefalopatia mitocondrial, acidosis làctica i episodis semblants a un accident cerebrovascular (MELAS) (Goto et al. 1990). Actualment, el nombre de mutacions patogèniques de l'ADNmt documentades sobrepassen el centenar (MITOMAP 2019), afectant pràcticament a tots els teixits del cos, però fonamentalment aquells amb una major dependència energètica (Park and Larsson 2011). Una de les característiques principals d'aquests tipus de mutacions és que no totes actuen amb la mateixa gravetat, ni donen lloc a un procés similar. Degut a la segregació meiótica aleatòria mitocondrial, es poden generar cèl·lules emparentades que presentin percentatges significativament diferents d'ADNmt mutat i tinguin diferents graus d'afectació, contribuint encara més a la variabilitat de les característiques clíniques i la gravetat de la malaltia (Ruiz-Pesini et al. 2007; Wallace 2013b).

#### 1.1.4.3. Mutacions somàtiques

L'ADNmt, amb l'edat, també acumula mutacions en els teixits. Tot i que sovint aquestes mutacions s'associen a l'envelliment, les mutacions somàtiques sorgeixen al produir-se un dany a l'ADN que no es repara, ja es degui a errors durant la replicació de l'ADN o bé com a conseqüència de factors endògens o exògens, com ara les ROS, el fum del tabac o la llum ultraviolada (Itsara et al. 2014).

S'ha demostrat que les mutacions clínicament rellevants de l'ADNmt poden romandre en els teixits durant llargs períodes (Goldsmith 2013; Li et al. 2015), i per tant, es possible que moltes de les mutacions somàtiques detectades en adults es remuntin al moment del desenvolupament embrionari o l'inici de la vida postnatal (Ramos et al. 2016). A més, l'evidència suggereix que la seva acumulació pot modular l'envelliment i la longevitat, erosionant progressivament la funció mitocondrial i donant lloc a malalties degeneratives, un cop superat cert llindar (Ross et al. 2013).



## 1.2. MALALTIA CARDIOVASCULAR

Les malalties cardiovasculars (MCV) són un grup de desordres del cor i dels vasos sanguinis entre els quals, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), s'inclou:

- la cardiopatia coronària: malaltia dels vasos sanguinis que irriguen al cor. Entre les quals en destaquen l'angina de pit, l'infart de miocardi (IM) i la mort sobtada cardíaca.
- les malalties cerebrovasculars: malalties dels vasos sanguinis que irriguen el cervell, com l'accident cerebrovascular (ACV) i la isquèmia cerebral transitòria, independentment de l'origen aterotrombòtic o hemorràgic de les mateixes.
- les arteriopaties perifèriques: malalties dels vasos sanguinis que irriguen els membres superiors i inferiors.
- la cardiopatia reumàtica: lesions del múscul cardíac i de les vàlvules cardíques degudes a la febre reumàtica, una malaltia causada per bacteris estreptococs.
- les cardiopaties congènites: malformacions del cor presents des del naixement; i,
- les trombosis venoses profundes i embòlies pulmonars: coàguls de sang (trombes) en les venes de les cames, que poden desprendre's (èmbols) i allotjar-se en els vasos del cor i els pulmons.

Altres MCV inclouen tumors del cor; tumors vasculars del cervell; trastorns del múscul cardíac (cardiomiopatia); malalties de les vàlvules cardíques i trastorns del revestiment del cor.

Amb freqüència, diferents revistes i publicacions especialitzades utilitzen de forma intercanviable termes com “arteriopatia coronària”, “cardiopatia coronària” i “cardiopatia isquèmica”. No obstant, cal matisar que es parla de:

- a) arteriopatia coronària o coronariopatia (CAD; *coronary artery disease*), per referir-nos a qualsevol malaltia de les artèries coronaries, amb o sense repercussió cardíaca;

- b) cardiopatia coronària (CHD, *coronary heart disease*), per referir-nos a la cardiopatia isquèmica secundària a l'arteriopatia coronària, i
- c) cardiopatia isquèmica (IHD, *ischemic heart disease*), per referir-nos a qualsevol cardiopatia secundària a isquèmia cardíaca, sigui aquesta o no d'origen coronari.

En la major part dels casos la cardiopatia isquèmica obeeix a una arteriopatia coronària, però correspon en realitat a un concepte més ampli, que engloba també els casos, infreqüents però reals, de cardiopatia isquèmica secundària a estenosis valvular aòrtica o a anèmia.

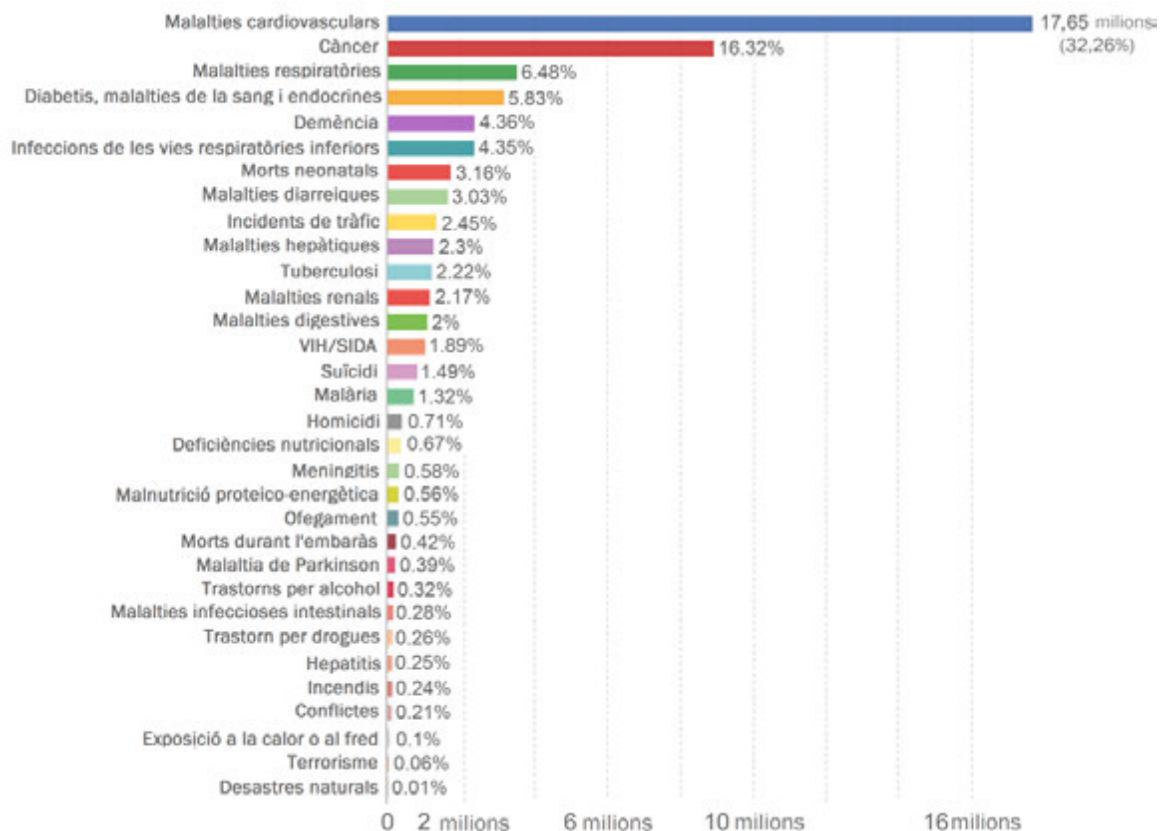
Tenint present aquests termes, les dades de mortalitat i morbiditat ens indiquen que les principals formes de MCV són la cardiopatia isquèmica (CI) d'origen coronari i l'accident cerebrovascular (ACV). Aquestes dues malalties acostumen a ser fenòmens aguts que es deuen sobretot a obstruccions que impedeixen que la sang flueixi cap al cor o el cervell. La causa més freqüent d'aquesta obstrucció és l'aterosclerosi, condició en que s'engruixeix la paret de l'artèria, com a resultat d'una acumulació focal de lípids intra i extracel·lulars, la formació de cèl·lules espumoses i la reacció de les cèl·lules inflamatores (limfòcits). Aquests processos provoquen l'estrenyiment (estenosis) de les parets dels vasos sanguinis que irriguen el cor o el cervell. Quan la estenosis és molt greu, pot causar un desequilibri entre les necessitats d'oxigen i la seva aportació al miocardi o al cervell. La falta d'oxigenació en aquests òrgans dona lloc a l'IM i als ACV isquèmics, encara que els AVC en menor mesura (aproximadament el 21%) també poden deure's a hemorràgies dels vasos cerebrals o coàguls de sang.

### 1.2.1. Epidemiologia de la malaltia cardiovascular

Les últimes dades publicades per les Nacions Unides indiquen que la població mundial ha crescut dràsticament en els últims segles, arribant a mitjans de l'any 2016 a sobrepassar els 7.300 milions de persones. L'augment de la població ha vingut acompanyada, en la gran majoria de països, d'un augment en la qualitat de vida, i per tant, d'un augment en l'esperança de vida. Com a conseqüència, les causes de mort en tot el món estan canviant.

L'any 2016 van morir al voltant de 55 milions de persones a nivell global. Un 70% d'aquestes morts s'atribueixen a les malalties cròniques de llarg termini com poden ser les MCV, el càncer, les malalties respiratòries o la diabetis. Aquestes malalties no només dominen les xifres de mortalitat a nivell mundial sinó que també ho fan en el països amb els ingressos més elevats, on les morts a causa de les malalties infeccioses o desnutrició solen ser molt baixes en termes relatius.

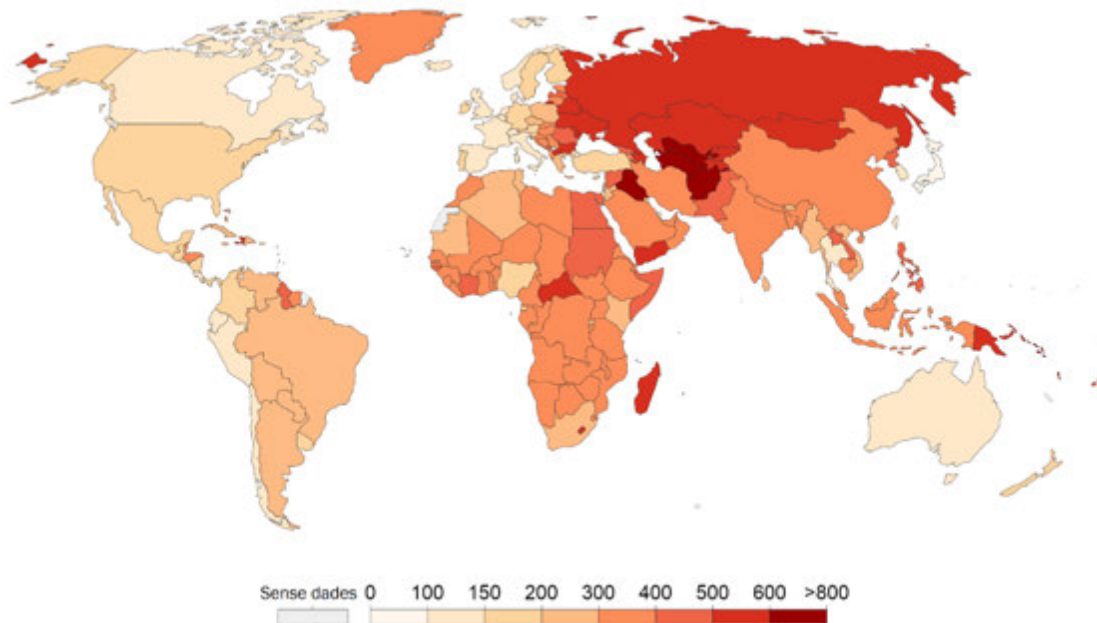
La MCV va ser la principal causa de mortalitat a nivell mundial l'any 2016, responsable de 17,6 milions de morts (32,26% del total de morts) (Figura 10).



**Figura 10. Nombre anual de morts a nivell mundial, 2016.** Les dades es refereixen a la causa específica de mort, que es distingeix tant dels factors de risc ambientals com dels genètics (font: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>).

S'estima que al voltant del 63% (11 milions) de les morts per MCV l'any 2016 es van produir en persones de 70 anys o més. Les persones de 50 a 69 anys d'edat representen aproximadament un 30% (5,1 milions) de les morts, mentre que les de 15 a 49 anys d'edat representen el 7-8% (1,3 milions) restant. Per tant, les taxes de mortalitat són significativament més altes en el grup de major edat.

A la figura 11 podem observar les taxes de mortalitat, a nivell mundial, per MCV estandarditzades en funció de l'edat. L'estandardització de l'edat ajusta les taxes brutes de mortalitat per eliminar la influència de les diferents estructures d'edat de la població i, per tant, permet realitzar comparacions més significatives entre països i al llarg del temps. En general, les taxes d'Europa oriental, Àsia i Àfrica tendeixen a ser significativament més elevades que les d'Amèrica del Nord i Europa occidental i septentrional (Suècia, Noruega, Finlàndia, Estònia, Letònia, Lituània, Islàndia, Regne Unit, Irlanda i Dinamarca), mostrant una forta divisió entre Est i Oest. Les taxes de mortalitat estandarditzades per edat més baixes (<100 per 100.000 habitants) s'observen a Japó. L'extrem més elevat de l'escala es troba a Afganistan que tindria una taxa de 830 morts per cada 100.000 habitants.



**Figura 11. Taxa de mortalitat cardiovascular estandarditzada per edat a nivell mundial, 2016.** Les taxes es mesuren tenint en compte el nombre de morts per cada 100.000 individus en ambdós sexes (font: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>).

#### 1.2.1.1. Mortalitat cardiovascular a Europa

Les últimes dades publicades per la Xarxa Europea del Cor (EHN; *European Health Network*) (Wilkins et al. 2017) assenyalen que les MCV són la principal causa de mortalitat d'Europa en el seu conjunt, responsables de més de 3,9 milions de morts a l'any, o el 44,45% de totes les morts. En els homes, les MCV representen 1,8 milions de morts (40,28% de totes les morts), mentre que en les dones són responsable de 2,1 milions de morts (48,91% de totes les morts) (Taula 1).

**Taula 1:** Nombre total de defuncions per causa i sexe

| Sexe  | Regió  | Totes les causes | Cardiopatia isquèmica | Accident cerebrovascular | Altres MCV |
|-------|--------|------------------|-----------------------|--------------------------|------------|
| Homes | Europa | 4.475.990        | 862.219               | 405.415                  | 535.495    |
| Dones | Europa | 4.370.306        | 877.216               | 583.158                  | 677.162    |

**Font:** OMS (<http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/>)

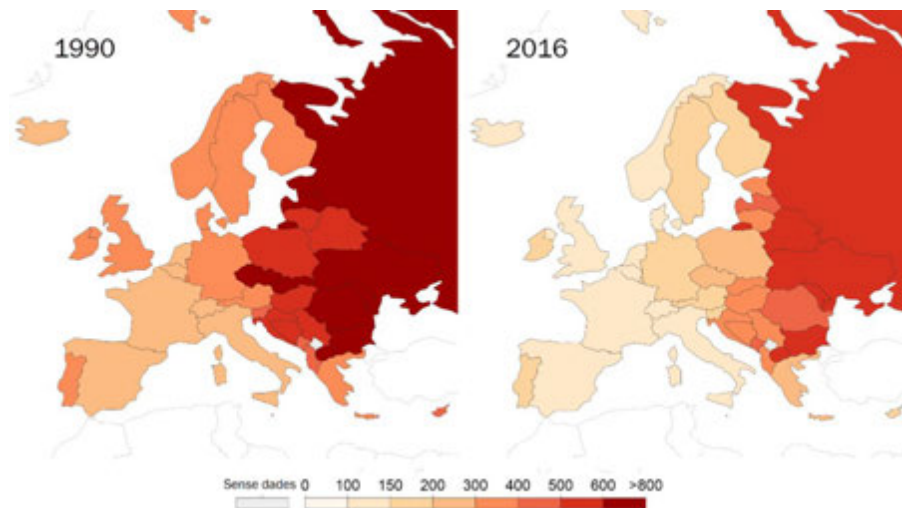
**Notes:** Altres MCV es defineix com totes les malalties circulatòries diferents de la cardiopatia isquèmica i l'accident cerebrovascular.

La CI és la principal causa de mortalitat a Europa, responsable de 862.000 morts a l'any (19,26% de totes les morts) entre els homes i 877.000 morts (20,07%) entre les dones cada any. L'ACV és la segona causa de mort més freqüent a Europa, amb 405.000 morts (9,06%) en els homes i 583.000 (13,34%) en les dones cada any (Taula 2).

### Taxa de mortalitat

En tots els països europeus sobre els quals l'OMS disposa de dades, les taxes de mortalitat per CI i ACV estandarditzades per edat són més altes en els homes que en les dones, i han disminuït amb els anys en ambdós sexes (Wilkins et al. 2017).

Des del període comprès entre 1990 i 2016, s'observen grans disparitats geogràfiques, amb taxes de mortalitat relativament elevades de CI i ACV a Europa oriental i central, i taxes més baixes a Europa septentrional, occidental i meridional. Les taxes de mortalitat per CI i ACV estandarditzades per edat han disminuït en la majoria dels països d'Europa del Nord i occidental (Figura 12).



**Figura 12.** Taxa de mortalitat cardiovascular estandarditzada per edat a Europa l'any 1990 i 2016. Les taxes es mesuren tenint en compte el nombre de morts per cada 100.000 individus en ambdós sexes (font: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>).

#### 1.2.1.2. Morbiditat cardiovascular a Europa

##### Incidència

L'estudi de la càrrega global de la malaltia, conegut com GBD de les seves sigles en anglès (*Global Burden Disease*), calculen que al 2015 van haver-hi al voltant d'11,3 milions de nous casos de MCV a Europa: 5,4 milions d'homes i 5,8 milions de dones (Taula 2).

**Taula 2:** Incidència de la MCV, la CI i l'ACV a Europa, per sexe, en el 2015

| Sexe  | Regió  | MCV       | Cardiopatia isquèmica | Accident cerebrovascular |
|-------|--------|-----------|-----------------------|--------------------------|
| Homes | Europa | 5.441.564 | 2.968.582             | 675.872                  |
| Dones | Europa | 5.842.358 | 2.784.341             | 879.493                  |

**Font:** Base de dades GBD (2015) <http://www.healthdata.org/gbd/data>

**Notes:** Les dades de CI es basen en dades de vigilància, dades d'enquestes, consultes ambulatories i hospitalàries per a l'angina de pit i el primer infart agut de miocardi. Les dades sobre ACV es basen en les dades de l'enquesta i les dades hospitalàries del pacient hospitalitzat per al primer ACV agut.



Poc més de la meitat de tots els nous casos es van deure a la CI (51%), amb un nombre lleugerament major entre els homes (2,97 milions) que entre les dones (2,78 milions). Per contra, la incidència de l'ACV, que va representar gairebé 1,6 milions (14%) de tots els nous casos de MCV a Europa, va ser lleugerament major en les dones (880.000) que en els homes (680.000) (Taula 2).

Entre 1990 i 2015, la majoria dels països europeus van reportar un augment en el nombre de nous casos de MCV (Wilkins et al. 2017). La incidència es va incrementar en un 19%, passant a tenir 9.4 milions de nous casos l'any 1990 a 11,3 milions l'any 2015.

### Prevalença

La prevalença d'una malaltia es refereix al nombre de persones d'una població que actualment viuen amb la malaltia, o en el cas d'afeccions cardiovasculars, al nombre de persones vives en l'actualitat que han sofert un esdeveniment cardiovascular. L'any 2015, més de 85 milions de persones a Europa vivien amb MCV; el 48% dels casos (41,2 milions) havien afectat a homes i el 52% (44,1 milions) en dones (Taula 3). Les afeccions cardiovasculars amb una major prevalença van ser la malaltia vascular perifèrica i la CI. La malaltia vascular perifèrica va representar 15,3 milions de casos (37% de totes les MCV) entre els homes i 21 milions de casos (48% de totes les MCV) entre les dones, mentre que la CI va ser responsable de gairebé 17 milions de casos (41% de totes les MCV) en els homes i una mica més de 13 milions de casos (30% de totes les MCV) en les dones (Taula 3).

**Taula 3:** Prevalença de las ECV a Europa, per sexe, en el 2015

| Sexe  | Regió  | MCV        | Cardiopatia isquèmica | Accident cerebrovascular | Malaltia vascular perifèrica |
|-------|--------|------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------|
| Homes | Europa | 41.240.109 | 16.980.048            | 3.465.250                | 15.301.400                   |
| Dones | Europa | 44.089.112 | 13.306.789            | 4.399.956                | 21.034.502                   |

**Font:** Base de dades GBD (2015) <http://www.healthdata.org/gbd/data>

**Notes:** Les dades de CI es basen en dades de vigilància, dades d'enquestes, consultes ambulatories i hospitalàries per a l'angina de pit i el primer infart agut de miocardi. Les dades sobre ACV es basen en les dades de l'enquesta i les dades hospitalàries del pacient hospitalitzat per al primer ACV agut. Les dades de la malaltia vascular perifèrica es basen en dades de l'enquesta de visites ambulatories/de pacients hospitalitzats.

En els últims 25 anys, hi ha hagut un augment en el nombre absolut de casos de MCV a Europa. Entre els homes, el nombre de casos va augmentar un 34% entre 1990 i 2015, i en les dones un 29%. En canvi, l'anàlisi de la taxa de prevalença de la MCV estandarditzada per edat per cada 100.000 habitants, revela una lleugera disminució en el conjunt d'Europa. Entre 1990 i 2015, la taxa va disminuir un 9% i un 5% en homes i dones, respectivament.

### 1.2.2. Factors de risc de la malaltia cardiovascular

El terme «factor de risc» es defineix com a un element mesurable que té relació causal amb un augment de freqüència d'una malaltia i constitueix un factor predictiu independent i significatiu del risc de sofrir la malaltia d'interès (O'Donnel and Elosua 2008).

En aquest sentit, les MCV es caracteritzen per tenir una etiologia multifactorial. La falta de comprensió de les respostes genètiques individuals a aquestes malalties, corrobora el fet que el desenvolupament de les MCV està influenciat per la combinació de factors genètics i ambientals en diferent percentatge (aprox. el 75% de les MCV pot atribuir-se a factors de risc convencionals), en funció dels diferents estudis (Krzywanski et al. 2011). La presència simultània de varis factors té un efecte no només additiu, sinó multiplicatiu del risc de cada factor per separat. Per això, l'abordatge més correcte de la prevenció cardiovascular requereix una valoració global de tots els factors de risc (Yusuf et al. 2004).

Actualment han estat identificats més de 300 factors de risc relacionats amb la MCV (Lacey et al. 2017). Els principals factors de risc establerts es caracteritzen per complir tres criteris: tenir una alta prevalença en moltes poblacions; un impacte independent significatiu en el risc de malaltia; i que el seu tractament i control resultin en una reducció del risc.

Els factors de risc per a la MCV generalment es divideixen en extrínsecs o modificables, ja sigui per canvis en l'estil de vida, ús de tractaments farmacològics o mitjançant el control d'altres factors de risc als que sí hi tenim té accés (per exemple; la prevenció de la hipertensió, la hipercolesterolèmia o la diabetis), i en intrínsecs o no modificables, és a dir, aquells que no poden ser controlats o modificats (per exemple; l'edat, el gènere o la predisposició genètica) i (McPhee et al. 2011).

Els factors de risc de la CI més estudiats i reconeguts són l'edat, el sexe, la predisposició genètica, la hipertensió arterial, la dislipèmia, la diabetis, el tabaquisme i l'obesitat. L'ACV comparteix bastants factors de risc anteriorment exposats, en major o menor grau d'associació amb la CI (Yusuf et al. 2004), amb la diferencia de que, en el cas de l'ACV, la hipertensió és el factor més important. De fet, diversos estudis suggereixen que la reactivitat de les artèries intracranials i extracranials a determinats factors de risc podria ser diferent (Bang et al. 2005; D'Armiento et al. 2001; Guo et al. 2003; Wei et al. 2007).

#### 1.2.2.1. Factors de risc modificables per la CI i l'ACV

##### *Hipertensió arterial (HTA)*

La hipertensió és quantitativament el factors de risc més important relacionat amb la MCV prematura; per sobre del tabac, la dislipèmia i la diabetis (Sugiyama et al. 2015). L'increment dels nivells de pressió arterial de forma continua i sostinguda pot causar afebliment i estenosis en els vasos sanguinis, el que farà que sigui més probable que s'obstrueixin a causa d'un coàgul o fragments d'una placa d'ateroma. En diversos estudis s'ha observat que la variació a llarg termini de la pressió arterial és un factor predictiu d'esdeveniments cardiovasculars (CV) d'alt risc (Stevens et al. 2016), sent responsable de gairebé el 51% de les morts per ACV i del 45% de les morts per CI (Tibazarwa and Damasceno 2014). No obstant, l'HTA pot reduir-se eficaçment en resposta als canvis en l'estil de vida com la pèrdua de pes, l'augment de l'activitat física i la reducció de la ingesta de sal i alcohol, així com per la utilització de fàrmacs antihipertensius (Wilkins et al. 2017).

Es considera que la mortalitat per ACV i CI s'incrementa de forma progressiva i lineal a partir de xifres de pressió arterial sistòlica (PAS) >115 i pressió arterial diastòlica (PAD) >75 mmHg (Yano et al. 2018), però tenint en compte que la pressió arterial pot variar segons el grau d'activitat física, l'edat o altres factors que inclouen la condició dels ronyons i els nivells hormonals, al llarg dels anys aquests límits s'han anat corregint (Maiques Galán et al. 2016). Actualment, la guia de la Societat Espanyola d'Hipertensió considera que una persona sofreix HTA quan la PAS és  $\geq 140$  mmHg o la PAD és  $\geq 90$  mmHg (Gijón-Conde et al. 2018).

La prevalença de l'HTA tendeix a ser més elevada en els països de l'Europa central i oriental i més baixa en els països del nord i del sud d'Europa, sent més comuna en homes que en dones (Wilkins et al. 2017). A Espanya, és aproximadament del 43% (IC95%; 41,2-44,0) (Menéndez et al. 2016).

### **Dislipèmia**

La dislipèmia es refereix als nivells anormals de lípids en sang, inclòs el colesterol de lipoproteïnes d'alta densitat (cHDL), el colesterol de lipoproteïnes de baixa densitat (cLDL) i els triglicèrids, entre altres. Diversos estudis han establert el paper decisiu de la dislipèmia, especialment de la hipercolesterolèmia, en el desenvolupament de les MCV a través del seu efecte en la promoció de la formació de plaques arterials, que alhora augmenten el risc d'aterosclerosi (Zárate et al. 2016). No obstant, els nivells de colesterol poden reduir-se eficaçment amb l'augment de l'activitat física, canvis en la dieta com la reducció de la ingesta de greixos saturats, i amb fàrmacs hipolipemians com les estatines i els inhibidors PCSK9 (Wilkins et al. 2017).

- **Colesterol total i colesterol LDL (cLDL):**

Des de la dècada dels cinquanta (Dawber et al. 1951) es coneix quina és la importància dels nivells de colesterol plasmàtic elevats en el risc de patir una CI en edats mitjanes i avançades (Lewington et al. 2007). Els estudis més recents indiquen que la reducció de cLDL és eficaç per prevenir els esdeveniments coronaris i l'ACV de tipus isquèmic. A més, es va demostrar que proporcionava beneficis addicionals quan s'aconseguia reduir els nivells per sota de 70 mg/dl (Cannon et al. 2015). No obstant, el paper del cLDL no està tan clarament establert per l'ACV de tipus hemorràgic (Baigent et al. 2010).

A Espanya, la guia ESC/EAS 2016 sobre el tractament de les dislipèmies aconsella tenir concentracions de colesterol total per sota de 200 mg/dl i de cLDL per sota de 130 mg/dl (Catapano et al. 2016). La prevalença estima que gairebé un 58% de la població presenta valors de colesterol total  $\geq 200$  mg/dl i que un 18% supera els 240 mg/dl (Cordero and Fácila 2015).

- **Colesterol HDL (cHDL):**

Els nivells de cHDL es correlacionen independentment e inversament amb la presència de la MCV atès el paper que desenvolupen en el transport invers de colesterol i el control de la inflamació (Farrer 2018). No obstant, els resultats més recents dels estudis genètics i la investigació clínica no permeten establir un llindar de control predeterminat de cHDL (Kosmas et al. 2018), ja que la seva funcionalitat dependrà tant de factors genètics,

ambientals -com de l'estil de vida-, i pot ser modificada per l'entorn oxidatiu de la resposta en fase aguda (Navab et al. 2011). Per tant, la guia sobre el tractament de les dislipèmies no proposa cap objectiu terapèutic específic per el cHDL, tot i que si recomana presentar concentracions >40 mg/dl en homes i >48 mg/dl en dones (Catapano et al. 2016).

- **Triglicèrids**

Els nivells elevats de triglicèrids són un factor independent i significatiu de risc CV, tot i que semblen tenir una relació menys consistent que la hipercolesterolèmia (Catapano et al. 2016). Degut a que els triglicèrids poden ser degradats per la majoria de cèl·lules a diferència del colesterol, és més probable que el contingut de colesterol de les lipoproteïnes riques en triglicèrids (colesterol romanent) sigui la causa de l'aterosclerosi i la MCV (Varbo et al. 2013). Per tant, les concentracions de triglicèrids baixes o moderades (150-199 mg/dl) presenten una major associació amb el risc CV que les concentracions elevades ( $\geq 200$  mg/dl) (Nordestgaard and Varbo 2014). En aquest sentit, la guia de prevenció tampoc no proposa cap objectiu terapèutic específic per les concentracions de triglicèrids plasmàtics, tot i que recomanen assolir concentracions <150mg/dl perquè indiquen menor risc; o en el cas de presentar valors més elevats, que es busqui la presència d'altres factors de risc (Catapano et al. 2016).

### *Diabetis mellitus (DM)*

La DM es diagnostica per la presència d'alts nivells de sucre en la sang en dejú, que pot provocar dany als vasos sanguinis, augmentant directament el risc de MCV (Juarez-Rojas et al. 2018) i l'exacerbació dels efectes d'altres factors de risc, com els de l'augment de la pressió arterial, l'augment dels nivells de colesterol, el tabaquisme i l'obesitat (IHME 2016). En els subjectes amb DM, el risc a desenvolupar una MCV augmenta entre 2 a 4 vegades en comparació amb una població d'edat i sexe similar, sent la combinació de diabetis i ACV la major causa de morbimortalitat a nivell mundial (Tun et al. 2017). A més, també s'ha observat que els nivells d'hemoglobina glucosilada (HbA1c) >8% en pacients diabètics i >6% sense diabetis, també incrementen el risc CV (Cavero-Redondo et al. 2017).

Tot i que la gestió de la hiperglucèmia mitjançant mesures dietètiques i canvis d'estil de vida disminueix la probabilitat d'un esdeveniment macrovascular, sovint se sol necessitar d'un tractament farmacològic per assolir els objectius terapèutics (Brenner et al. 2001; Filippatos et al. 2017). Els criteris diagnòstics de DM s'estableixen per la presència dels signes clàssics de la hiperglucèmia (poliúria, polidípsia o pèrdua de pes inexplicada) i una glucèmia en dejú  $\geq 126$  mg/dl o bé una glucèmia  $\geq 200$  mg/dl passades 2 hores després de la sobrecàrrega oral amb 75 g de glucosa. També per presentar un nivells d'HbA1c >7% (Rydén et al. 2014).

En els últims 30 anys, la prevalença de DM ha augmentat en un 28% en tota Europa. Tant en homes com en dones, la diabetis va ser notablement més comuna en els països de l'Europa central i oriental en comparació a la resta. A Espanya, la prevalença d'adults amb DM de tipus 2 és del 11% (Wilkins et al. 2017).

### *Tabaquisme*

Existeix una clara evidència de l'efecte advers del tabac sobre la salut cardiovascular, sent responsable d'aproximadament el 50% de les morts per MCV evitables en fumadors (Alberg et al. 2014). És important senyalar que hi ha una relació lineal entre el risc de malaltia coronària i l'ACV i el nombre de cigarrets consumits (Hackshaw et al. 2018). No obstant, el tabaquisme passiu també representa un factor de risc per les MCV, de manera que les polítiques "sense fum", dissenyades per protegir a les poblacions dels efectes del tabaquisme passiu estan ara molt esteses a Europa (Piepoli et al 2016). Entre els seus nombrosos efectes, fumar pot augmenta la pressió arterial i la tendència de la sang a coagular-se, promou l'aterosclerosi a través de la inflamació de les artèries, redueix els nivells plasmàtics de cHDL i disminueix la tolerància a l'exercici (Messner and Bernhard 2014).

L'abandó del tabac redueix considerablement el risc (~30%) de sofrir diferents malalties vasculars (Critchley and Capewell 2012), ja que la disminució del risc és proporcional a la durada del cessament de l'hàbit de fumar (Wannamethee et al. 2000). Les últimes dades publicades per la OMS (IHME 2016) mostren que en els últims 35 anys, la prevalença del tabaquisme ha disminuït en gairebé tots els països europeus i en ambdós sexes, tot i que l'hàbit continua sent major entre els homes. A Espanya, la prevalença a disminuït un 37% en els homes i un 10,6% en les dones (Wilkins et al. 2017).

### *Obesitat i sobrepès*

El patró d'obesitat central, caracteritzat per els dipòsits de greix abdominal, s'associa més estretament amb la progressió accelerada de l'aterosclerosi, taxes més elevades de remodelació ventricular i un major risc d'IM i ACV (Kachur et al. 2017). No obstant, no existeix actualment una posició clara sobre si el sobrepès (IMC 25-30 kg/m<sup>2</sup>) i la obesitat (IMC >30 kg/m<sup>2</sup>) han de ser considerats com un factors de risc independent, atès que els seus principals efectes sobre la salut cardiovascular estan intervinguts pel risc de la síndrome metabòlica (hipertensió, hipercolesterolèmia, diabetis..), per la qual cosa l'absència d'aquests factors de risc en els individus obesos podria no estar associada amb un major risc de mortalitat.

Malgrat tot, s'ha despertat un gran interès en les determinacions antropomètriques de risc, detectant que l'augment de l'IMC i el perímetre abdominal es relacionen amb un risc significativament major de mortalitat i morbiditat cardiovascular (Adegbija et al. 2015; Khan et al. 2018). El líndars establerts a partir dels quals es recomanen la reducció de pes consideren un perímetre abdominal  $\geq 94$ -102 cm en homes i  $\geq 80$ -88 cm en dones (Piepoli et al. 2016).

L'obesitat ha experimentant un increment en les últimes dècades. A Espanya, la prevalença de sobrepès estimada és del 39,3% (IC95%; 35,7-42,9%); la d'obesitat del 21,6% (IC95%; 19,0-24,2%), i augmenta amb l'edat (Aranceta-Bartrina et al. 2016). No obstant, cada vegada és més freqüent en l'adolescència (Gungor 2014). Entre les possibles causes s'inclouen les relatives tant a l'alimentació com al dèficit de l'activitat física (Garcia et al. 2018).

### 1.2.2.2. Factors de risc no modificables per la CI i l'ACV

#### *Edat i sexe*

El risc cardiovascular s'incrementa amb l'edat (sobretot a partir dels 50 anys) (Gransbo et al. 2016) i és superior en els homes (Bots et al. 2017). Encara que les xifres variïn considerablement inclús dins d'una mateixa regió, la incidència de CI augmenta després dels 45 anys en els homes i dels 55 anys en les dones, i en el cas de l'ACV aquesta incidència es duplica aproximadament cada 10 anys a partir dels 55 anys en ambdós sexes (Mitrousi et al. 2013). L'edat té una notable influència sobre la resta de factors de risc; en gent jove, el gènere i el tabaquisme són els factors de risc principals, mentre que en la població d'edat més avançada la hipertensió, la hipercolesterolèmia i la diabetis tenen major importància (Lind et al. 2018).

Les dones habitualment desenvolupen una CI uns 10 anys més tard que els homes, però a partir dels 65 anys el seu pronòstic és significativament pitjor, ja que elles presenten major freqüència de mort cardiovascular (Wilson 2013). Per tant, sovint el desenvolupament de la CI en les dones s'associa amb la menopausa i amb el nombre e intensitat dels factors de risc. L'ACV també constitueix la primera causa de mort en la dona, encara que la taxa estandarditzada per edat és superior en els homes (George et al. 2015). De la mateixa manera, s'ha vist que les seqüeles restants després d'un ACV són majors i més discapacitants en les dones, sobretot com més edat tinguin (Kelly-Hayes et al. 2003).

#### *Origen ètnic*

Múltiples estudis de cohorts transversals i prospectius han reconegut que les diferències en l'origen ètnic afecten a la prevalença i salut cardiovascular (Kaul et al. 2011; Meeks et al. 2016; Owolabi et al. 2017; Shaikh et al. 2018). Per exemple, es sabut que els nord-americans d'origen africà tendeixen a presentar xifres més elevades de pressió arterial, i que les seves taxes de mortalitat per ACV són més altes (Owolabi et al. 2017; Sharrief et al. 2016). En canvi, a Europa la prevalença de diabetis és major entre els grups ètnics minoritaris, com els grups d'origen africà, turc, marroquí, i en particular, del sud d'Àsia (Kaul et al. 2011) en comparació amb la resta de poblacions europees natives del país d'adopció (Meeks et al. 2016). Una de les explicacions que s'han suggerit és que aquests fenòmens poden estar relacionats amb els diferents estils de vida, com el consum de determinats d'aliments o els nivells educatius (Perini et al. 2018), així com per l'actuació dels factors de risc ambientals i genètics (Shaikh et al. 2018; Snijder et al. 2017).

#### *Factors genètics*

Recentment els progressos en la comprensió de la genètica molecular subjacent a la patogènia de l'aterosclerosi, la pressió arterial, el metabolisme dels lípids plasmàtics i la diabetis, entre altres, ha reafirmat el caràcter poligènic i multifactorial d'aquestes patologies, i a integrat a l'instrumental diagnòstic una sèrie de determinacions de mutacions o polimorfismes genètics. D'acord amb aquestes dades, s'estima que l'heretabilitat de les MCV arriba a ser del 40-55% (Elosua et al. 2009), el que suggereix que es probable que els factors de risc hereditaris contribueixin de manera important a la susceptibilitat futura de patir un esdeveniment cardiovascular.

En les principals línies de recerca de l'àrea de la genètica cardiovascular destaquen els estudis d'associació entre variants de l'ADN nuclear i mitocondrial i diversos tipus de malaltia cardiovascular o fenotips característics de cada patologia. El propòsit de la genètica en la identificació de la població en risc, no és només prevenir la discapacitat en pacients amb malaltia cardiovascular sinó també modificar els factors de risc per prevenir els esdeveniments cardiovasculars, i això és aplicable tant als pacients amb malaltia cardiovascular establerta com aquells en prevenció primària.

Es creu que una proporció substancial de la etiologia de la CI d'origen coronari i l'ACV és atribuïble a la variació genètica comuna (freqüència al·lèlica >5%) (Yang et al. 2010; Zeyl 2007; Zuk et al. 2014). Els estudis d'associació del genoma complet (GWAS; *Genome-Wide Association Studies*) han estimat que el risc genètic representa probablement entre un 40-55% de la susceptibilitat a partir una CI (Elosua et al. 2009; Zdravkovic et al. 2002), i entre un 16-40% per a un ACV, depenent del subtipus (Bevan et al. 2012).

La identificació de variants que estiguin sòlidament associades amb un major percentatge de risc de desenvolupar una CI o un ACV són de gran interès, però quins gens i quins SNPs s'haurien d'incloure en el perfil de risc genètic? Abans de l'any 2007, els estudis de camp van utilitzar el coneixement de la fisiopatologia de les MCV per identificar gens "candidats" potencials. La combinació de petits estudis recollits en un metaanàlisi (Casas et al. 2006) va conduir a la identificació d'un nombre de gens candidats relacionats amb les àrees del metabolisme lipídic (p. ex. APOE, APOC3 i LPL).

A partir de l'any 2007, moment en que les millores tecnològiques varen permetre que els GWAS abordessin aquesta qüestió, els GWAS varen identificar molts SNPs nuclears, i mitocondrials en menor quantitat, desconeguts fins aleshores amb associacions estadísticament significatives. Va destacar una publicació simultània de tres estudis GWAS que van identificar la primera variant genètica nuclear associada al risc de CI (~30%) en el cromosoma 9p.21 (Helgadottir et al. 2007; McPherson et al. 2007; WTCCC 2007). Aquesta associació va ser confirmada per múltiples estudis en múltiples grups ètnics (Humphries et al. 2010; Samani et al. 2007). A més, posteriorment varis grups van replicar aquesta troballa fins estendre l'associació a altres fenotips vasculars, incloent l'aterosclerosi coronària (Ye et al. 2008), l'arteriopatia perifèrica (Helgadottir et al. 2008) i l'ACV (Smith et al. 2009).

- **Variants nuclears:**

A partir d'aquest moment, un total de 11 variants nuclears per a la CI d'origen coronari van ser identificades per diversos grups, incloent el *Welcome Trust Cas-Control Consortium*, el *Cardiogenics Consortium*, i el *Myocardial Infarction Genetics Consortium* (Erdmann et al. 2009; Gudbjartsson et al. 2009a; Kathiresan et al. 2009; Samani et al. 2007; Tregouet et al. 2009). Amb la finalitat d'explorar el potencial dels estudis de seqüenciació i genotipat a gran escala per a la identificació de variants relacionades amb el desenvolupament de la CI i l'IM, es varen crear grans consorcis, com el *CARDIoGRAM (Coronary Artery Disease Genome Wide Replication and Meta-analysis)* i el consorci genètic *C4D (Coronary Artery Disease)*, que l'any 2011 varen poder confirmar gairebé totes les variants prèviament descrites en els anteriors estudis i varen descobrir 17 noves posicions mitjançant l'ús de metanàlisi (Schunkert et al. 2011; C4D 2011). *CARDIoGRAM* i *C4D* varen acordar integrar els seus recursos (*CARDIoGRAMplusC4D*), aconseguint descobrir 15 noves

variants l'any 2013 (Deloukas et al. 2013) i 8 més l'any 2015 (Nikpay et al. 2015), després d'examinar més de 60.000 casos i més de 120.000 controls.

Recentment, CARDIoGRAMplusC4D ha ampliat la seva mida mostral i descobert 34 noves variants de risc per a la CI (Howson et al. 2017; Nelson et al. 2017; Webb et al. 2017). En general, la combinació de les dades publicades ha donat lloc al descobriment de més de 200 variants genètiques nuclears que s'associen significativament ( $p \leq 5.0 \times 10^{-8}$ ) amb la CI d'origen coronari (Do et al. 2015; Howson et al. 2017; Khera and Kathiresan 2017; Nelson et al. 2017) i 60 que s'associen amb l'IM (MacArthur et al. 2017).

En relació a l'ACV, també s'han identificat diverses variants genètiques, sobretot aquelles mutacions en gens relacionats amb la coagulació. *MetaStroke* és una de les col·laboracions genètiques més grans centrada en l'estudi de l'ACV de tipus isquèmic, que inclou 15 cohorts europees, nord-americanes i australianes de casos i controls. Després de la detecció de mutacions potencialment patògenes, *MetaStroke* va confirmar una associació entre l'ACV de tipus isquèmic i els SNPs del gen ABO (rs505922), els quals s'associaven amb els nivells de les proteïnes de coagulació von Willebrand Factor i el factor 8 (Williams et al. 2013).

Fins ara, els GWAS de grups europeus han identificat poques variants que s'associen robustament amb l'ACV (Bellenguez et al. 2012; Chauhan et al. 2016; Gudbjartsson et al. 2007; Gudbjartsson et al. 2009b; Holliday et al. 2012; Kilarski et al. 2014; Malik et al. 2016; Pulit 2016; Traylor et al. 2014; Traylor et al. 2017; Woo et al. 2014). En la majoria dels casos, les associacions amb aquesta malaltia es van atribuir a diferents subtipus d'ACVs isquèmics; com l'ACV per aterosclerosi de l'arteria gran (LAS; *Large-artery Atherosclerotic Stroke*) (Bellenguez et al. 2012; Holliday et al. 2012; Pulit 2016; Traylor et al. 2014), l'ACV cardioembòlic (CES; *Cardio-Embolic Disease*) (Gudbjartsson et al. 2007; Gudbjartsson et al. 2009b) i l'ACV causat en els vasos sanguinis petits (SVS; *Small-Vessel Stroke*) (Chauhan et al. 2016; Traylor et al. 2017), o als ACVs de tipus hemorràgic (Woo et al. 2014). No obstant, alguns SNPs es van associar amb dos o més subtipus d'ACV (Kilarski et al. 2014; Malik et al. 2016; Pulit 2016; Williams et al. 2013) o amb qualsevol ACV (isquèmic o hemorràgic) (Chauhan et al. 2016). L'últim estudi multiètnic publicat, que inclou més de 500.000 individus (67.162 casos i 454.450 controls), ha identificat 22 noves variants de risc; 9 relacionades amb qualsevol dels dos tipus d'ACV, 8 per a qualsevol subtipus d'ACV, 3 per LAS i 2 per CES (Malik et al. 2018). En total hi ha 86 variants genètiques nuclears que s'associen significativament ( $p \leq 5.0 \times 10^{-8}$ ) amb l'ACV (MacArthur et al. 2017).

Tots els resultats dels estudis GWAS relacionats amb la CI, l'ACV i els seus factors de risc, s'han inclòs en un catàleg (*GWAS catalog*) per a facilitar-ne l'accés als investigadors i clínics (MacArthur et al. 2017). Actualment, hi ha més de 700 SNPs (gener 2019) associats a MCV ( $p \leq 5.0 \times 10^{-8}$ ) publicats en el catàleg GWAS (Figura 13). No obstant, el nombre d'SNP identificats quan s'introdueix el terme "cardiovascular disease" ascendeix per sobre dels 70.000 si s'amplia el nivell de significació estadística.





**Figura 13. Diagrama dels SNP nuclears associats a MCV distribuïts per cromosoma.** El diagrama mostra totes les associacions publicades (712) a gener de 2019, amb un valor  $p \leq 5.0 \times 10^{-8}$ . Es pot consultar a <https://www.ebi.ac.uk/gwas/diagram#>; activant només les malalties cardiovasculars es pot visualitzar els SNPs i la seva informació.

Els mecanismes fisiopatològics exactes que hi ha darrera de la gran majoria de polimorfismes genètics comuns obtinguts del cribratge dels GWAS són encara desconeguts. En molts casos, la cerca de variants funcionals s'ha vist dificultada perquè la majoria dels SNPs que s'han associat amb la MCV es localitzen en regions no codificants i es desconeixen els seus gens diana (MacArthur et al. 2017). En aquest sentit, s'ha observat que més del 90% de les interaccions genètiques dels SNP on s'ha detectat associació no s'involucren amb el gen més proper i gairebé el 40% dels SNPs poden interactuar amb almenys dos gens,

complicant la interpretació dels seus mecanisme d'acció (Montefiore et al. 2018). No obstant, la majoria de les variants intergèniques són properes a les regions promotores dels gens, el que indica que poden regular la seva expressió. Entre els gens més representatius amb els que s'ha pogut clarificar la importància funcional dels SNPs hi trobem: gens involucrats amb el metabolisme lipídic (MIA3, LPA, APOE, APOB, LPL, CETP, SORT1), la coagulació (PAI-1, GP IIb/IIIa, F2, F5) i diferents aspectes de la funció endotelial com els que comprometen l'estabilitat de la placa d'ateroma (ALOX5AP, PHACTR1, CDKN2A/2B, CXCL12, WDR12, NOS3, MTHFR, PPAR, ADAMTS) (Ghosh et al. 2015).

- **Variants mitocondrials:**

#### Haplogrups i malaltia cardiovascular

Es considera que les mutacions de l'ADNmt que defineixen els diferents haplogrups no són patològiques en sí mateix, sinó que confereixen unes característiques metabòliques a cadascun d'ells que els permet modular de manera diferent les funcions biològiques més importants (Kzywanski et al. 2016).

La rellevància clínica dels haplogrups mitocondrials ha estat demostrada repetidament a través d'estudis de casos i controls en una ampla varietat de malalties degeneratives com les MCV, tant en poblacions europees (Castro et al. 2006; Chinnery et al. 2010; Fernandez-Caggiano et al. 2013; Fernández-Caggiano et al. 2012; Finnila et al. 2001; Hagen et al. 2013; Hudson et al. 2014; Kofler et al. 2009; Martikainen and Majamaa 2010; Palacin et al. 2011; Rosa et al. 2008; Serrano et al. 2018) com en asiàtiques (Cai et al. 2015; Nishigaki et al. 2007a; 2007b; Sawabe et al. 2011; Yang et al. 2014), i sobre alguns factors de risc cardiovascular clàssics com la hipertensió, l'obesitat o la diabetis en ambdues poblacions (Ebner et al. 2015; Gonzalez et al. 2012; Nardelli et al. 2013; Poulton et al. 2002; Rea et al. 2013; Zhu et al. 2009). En la mateixa línia d'evidència, la producció de ROS sembla jugar un paper important en la patogènesis de l'aterosclerosi y les MCV (Chang et al. 2010; Peluso et al. 2012).

En població europea l'haplogrup H s'ha associat amb l'infart de miocardi precoç (Palacin et al. 2011) i també actua com a factor de risc en el desenvolupament de la CI (Fernández-Caggiano et al. 2012), la cardiomiopatia dilatada (Fernandez-Caggiano et al. 2013), la cardiomiopatia hipertròfica (Hagen et al. 2013) i el desenvolupament de l'estenosi aòrtica greu (Serrano et al. 2018). Així mateix, una de les mutacions definitiva de l'haplogrup H (mt. 7028 C>T) ha estat relacionada amb l'accident cerebrovascular (ACV) (Rosa et al. 2008). Per el contrari, els portadors de l'haplogrup J presenten un menor risc de sofrir una CI o una cardiomiopatia (Fernández-Caggiano et al. 2012; Hagen et al. 2013). Recentment, Hudson et al. (2014) va reportar que l'haplogrup U podria augmentar el risc de desenvolupar un ACV, associació que també van determinar Finnila et al. (2001) i Martikainen and Majamaa et al. (2010). Per la seva part, l'haplogrup T també s'ha associat amb la cardiomiopatia hipertròfica (Castro et al. 2006) i l'arteriopatia coronària (Kofler et al. 2009). No obstant, de la mateixa manera que en altres patologies, hi ha estudis en que no s'observen diferències significatives en la distribució dels haplogrups i el risc a desenvolupar una MCV o determinats factors de risc com la diabetis (Mitchell et al. 2017; Chinnery et al. 2010; 2007; Mohlke et al. 2005).

SNPs i malaltia cardiovascular

Els estudis més recents que han observat una vinculació entre certes MCV i mutacions específiques de l'ADNmt (amb efectes negatius o beneficiosos) inclouen substitucions (Abu-Amero et al. 2010; Gawel et al. 2008; Hudson et al. 2014; Liou et al. 2004; Mueller et al. 2011; Sazonova et al. 2015; Wang et al. 2015), deleccions (Levitsky et al. 2003), duplicacions (Cardena et al. 2013) i la detecció d'heteroplasmies puntuals i de longitud (Golubenko et al. 2016; Mitrofanov et al. 2016; Sazonova et al. 2016; Sobenin et al. 2013), tant en la regió codificant com en la RC de l'ADNmt. En particular, les mutacions de l'ADNmt localitzades a la RC semblen tenir particular rellevància, ja que, com s'ha explicat anteriorment, poden influir en la regulació de l'expressió gènica de l'ADNmt.

Dos d'aquests estudis han associat la variant mitocondrial m.16.189T>C amb l'arteriopatia coronària en poblacions del centre d'Europa (Mueller et al. 2011) i d'Àrabia Saudita (Abu-Amero et al. 2010). De fet, per aquesta mateixa mutació també s'ha observat associació amb l'IM (Abu-Amero et al. 2010) i l'ACV (Liou et al. 2004) en població d'Àrabia Saudita i de Taiwan, respectivament. Curiosament, l'ACV de tipus hemorràgic també sembla estar fortament associat amb la variant m.16.319G>A (Gawel et al. 2008). D'altra banda, Cardena et al. (2013) varen descriure una duplicació de 15 pb entre els nucleòtids 16.018 i 16.032 que podria alterar l'estabilitat o estructura secundària de l'ARNt<sup>Pro</sup> en pacient amb cardiomiopatia. A més, la m.16.566G>A i l'heteroplasmia m.16.093T/C també s'han associat amb aquesta malaltia (Sazonova et al. 2016).

En general, aquestes disparitats en els resultats dels estudis d'associació podrien produir-se perquè les mutacions de l'ADNmt en la RC no estan directament lligades a cap forma de patologia, però podrien ser capaces d'influir en la funció mitocondrial provocant canvis en el nombre de còpies de l'ADNmt i induint profunds efectes, tant en l'expressió de les transcripcions de gens amb codificació mitocondrial com en les activitats enzimàtiques de la ETC (complexes I, III i IV) (Huang et al. 2016a; Ide et al. 2001; Tsutsui et al. 2008). Per tant, la capacitat d'una mutació per influir en el desenvolupament de las MCVs està directament relacionada amb la seva freqüència i la gravetat del seu impacte en la funció mitocondrial.

### 1.3. RISC CARDIOVASCULAR

El risc cardiovascular (RCV) estableix la probabilitat de patir un esdeveniment cardiovascular en un termini determinat, generalment 5 o 10 anys. No obstant, també es pot referir al risc coronari o risc cerebrovascular quan es vol calcular la probabilitat de desenvolupar només una d'aquestes malalties. El càlcul del RCV és interessant des d'un punt de vista clínic perquè permet als metges establir les prioritats de prevenció cardiovascular i valorar d'una manera més eficient la introducció del tractament hipolipemiant o antihipertensiu en els pacients que no han patit un esdeveniment cardiovascular (Pieppoli et al. 2016). Al llarg del temps, els mètodes utilitzats per a calcular el RCV, la prevenció de las MCVs i el control dels seus principals factors de risc han quedat plasmats en guies de pràctica clínica i de prevenció de la MCV, les quals no han tingut en compte incloure l'evidència genètica en el càlcul del risc cardiovascular. Les directrius i recomanacions d'aquestes guies varien en funció de l'àmbit geogràfic al que fan referència. A Espanya, les prioritats de prevenció utilitzades són les adaptades de les recomanacions de les Societats Europees de Cardiologia i d'Aterosclerosi (ESC/EAS; *European Society of Cardiology / European Atherosclerosis Society*) (Piepoli et al. 2016), les quals classifiquen el risc en 4 categories: risc molt alt ( $\geq 10\%$ ), risc alt ( $\geq 5-10\%$ ), risc moderat ( $\geq 1-5\%$ ) i baix risc ( $< 1\%$ ). No obstant, els punts de tall d'aquestes categories poden variar ( $\geq 15\%$ ,  $10-14,9\%$ ,  $5-9,9\%$  i  $< 5\%$ ) depenent la funció de risc que es vulgui utilitzar en el càlcul (Marrugat et al. 2003a; Marrugat et al. 2003b).

Aquestes guies estableixen que els pacients amb un RCV alt o molt alt requereixen un seguiment més estret i una intervenció més intensa, precisant, en la majoria de les ocasions, un tractament farmacològic per alguns dels factors de risc si no s'aconsegueix una reducció estable del risc amb mesures d'actuació sobre l'estil de vida. La presència d'un o diversos factors de risc indica un RCV moderat, sempre que el risc coronari no superi el límit del 5% o 10% (depenent l'equació) de risc als 10 anys. Aquestes persones requereixen una vigilància especial per comprovar l'evolució del seu RCV i un tractament basat en mesures dietètiques. Quan existeixi una elevació important d'un factor de risc, encara que el seu risc coronari no

sigui alt, sí que ha de considerar-se el tractament amb fàrmacs. Finalment, quan no existeix cap factor de risc, es cataloga a la persona amb un RCV baix. En aquests casos són necessàries les mesures de prevenció i promoció de la salut recomanades per a la seva edat i sexe.

Encara que existeixen diversos models per estimar el RCV, en general, podem classificar-los en mètodes qualitius i quantitius. El primer mètode consisteix en quantificar diversos factors de risc, que poden ser positius o negatius, de forma individual i fer-ne una suma. Són models més fàcils d'utilitzar, no obstant, s'ha comprovat que els factors es potencien entre si donant lloc a un RCV superior a la suma de tots ells, per el que és més correcte la utilització dels mètodes quantitius (Mancia et al. 2006; Woodward et al. 2006), dels quals s'obté un valor numèric, que correspon a la probabilitat de presentar una MCV en un període de temps determinat. Aquests models es presenten a continuació.

### 1.3.1. Predicció del risc utilitzant factors de risc clàssics (FRC)

A causa dels canvis observats en les causes de mortalitat de la població general, a partir dels anys trenta del segle XX comencen a publicar-se els primers estudis d'epidemiologia cardiovascular. L'any 1932, Wilhelm Raab (Raab 1932) va descriure la relació existent entre la dieta i la CI, i un any més tard, Angel Keys (Keys 1953) va descriure l'associació entre les concentracions de colesterol i la mortalitat per CI en diverses poblacions. Per esclarir les possibles causes de les MCV, a mitjans segle XX es van engegar diversos estudis epidemiològics que van desenvolupar el que es coneix com a «puntuacions de risc», les quals tenien en compte el coneixement combinat de com els FRC afecten al risc CV (Chapman et al. 1957; Dawber et al. 1951; Doyle et al. 1957; Keys et al. 1963; PRRG 1978).

La primera puntuació de risc que utilitzava FRC associats a la cardiopatia coronària es va desenvolupar a partir del Framingham Heart Study, el qual va donar lloc al que es coneix amb el nom de puntuació de Framingham (Wilson et al. 1998). Aquest és un estudi prospectiu de base poblacional que va començar a Framingham (Boston, EEUU) l'any 1948 a partir d'una cohort original amb la que, durant els últims 70 anys, els investigadors han recollit dades sobre les MCV i els seus principals factors de risc. Van ser els investigadors de l'estudi de Framingham els que van encunyar el terme «factor de risc». Els factors de risc inclosos en aquesta puntuació eren l'edat, el colesterol total, el cHDL, la PAS, la diabetis i el tabaquisme (amb equacions separades per a homes i dones). El descobriment d'aquests «factors» associats amb l'aparició de la malaltia va suposar un canvi en la pràctica clínica, que va permetre la identificació dels individus amb major risc i la implementació de mesures preventives que evitarien el desenvolupament d'episodis CV i en reduïrien significativament els seus costos directes i indirectes.

Actualment s'utilitzen dues estratègies de prevenció. Des de les polítiques de salut pública s'implementen models de prevenció poblacional, i des de la pràctica clínica, mesures de prevenció dirigides a la població d'alt risc (Piepoli et al. 2016). En la pràctica clínica diària, per identificar als individus d'alt risc, es realitza un cribratge del risc cardiovascular en totes les persones que contacten amb el sistema sanitari per identificar als qui tenen risc elevat i establir en aquest subgrup mesures preventives individualitzades més intenses. Per a realitzar aquest cribratge, s'utilitzen les funcions clàssiques de risc cardiovascular, que no són més que equacions matemàtiques, basades en el grau d'exposició als FRC, que utilitzen

la magnitud de l'associació entre aquests factors i el risc de sofrir la MCV. El risc és multifactorial i additiu, de manera que, a mesura que anem acumulant factors de risc, la susceptibilitat a la malaltia també augmenta exponencialment. No obstant, una de les limitacions d'aquestes funcions de risc és la seva baixa sensibilitat o capacitat de discriminació, que podria obviar el 60% dels esdeveniments CV que es presenten en individus categoritzats amb risc baix i moderat (Elosua and Sayols-Baixeras 2017).

Es va observar que les equacions de Framingham sobreestimaven el risc al aplicar-se en altres poblacions europees on hi havia una menor incidència de cardiopatia coronària (Eichler et al. 2007). En resposta, es varen adaptar les equacions tenint en compte les diferències en la prevalença dels factors de risc i les taxes d'incidència dels esdeveniments coronaris, per a desenvolupar puntuacions de risc específiques de cada regió (D'Agostino et al. 2001), inclòs la població espanyola (Marrugat et al. 2003b; Marrugat et al. 2007). En paral·lel, s'han desenvolupat altres funcions de risc CV per a la població general, –les més conegudes i utilitzades s'han resumit a la taula 4 (Assmann et al. 2002; Graham et al. 2007; Hippisley-Cox et al. 2010; Hippisley-Cox et al. 2007; Murabito et al. 1997; Ridker et al. 2007; Ridker et al. 2008)–, i algunes específiques per als individus amb HTA (ESH/ESC 2003; Whitworth 2003) i diabetis (Stevens et al. 2001).

**Taula 4:** Funcions de risc cardiovascular més utilitzades en diferents països

| <i>Funció</i>                      | <i>Població</i>                                       | <i>Esdeveniments predits</i>  |
|------------------------------------|---|---|
| Framingham                         | Homes i dones de 35-74 anys, Framingham, Estats Units | Diferents períodes de predicció (1-4, 10, 30 anys, tota la vida)            |
| Coronari                           |   | CI, IM i angina (2, 4, 10 anys i al llarg de la vida)                       |
| Cerebrovascular                    |   | ACV (a 10 anys)   |
| Arteriopatia perifèrica            |   | Arteriopatia perifèrica (a 4 anys)  |
| Insuficiència cardíaca             |   | Insuficiència cardíaca  |
| Fibril·lació auricular             |   | Fibril·lació auricular  |
| Cardiovascular                     |   | (10, 30 anys i al llarg de tota la vida)                                    |
| Reynolds                           | Dones >45 anys i homes >50 anys, Estats Units         | Esdeveniments CV: IM, ACV isquèmic i revascularització coronària a 10 anys. |
| PROCAM                             | Homes de 35-64 anys, Europa                           | Esdeveniments coronaris aguts a 10 anys                                     |
| SCORE                              | Homes i dones de 40-65 anys, Europa                   | Esdeveniments CV mortals; no DM   |
| QRISK Cardiovascular 10 anys o més | Homes i dones de 25-84 anys, Regne Unit               | Esdeveniments CV: IM, CI i ACV  |
| <b>Espanya</b>                     |   |   |
| Framingham adaptat REGICOR         | Validat per a homes i dones de 35-74 anys             | Esdeveniments coronaris a 10 anys   |
| SCORE adaptat                      | Adaptat per a homes i dones de 35-64 anys             | Esdeveniments CV mortals; no DM   |
| Framingham adaptat DORICA          | Adaptat per home i dones de 25-64 anys                | Esdeveniments coronaris a 10 anys   |
| FRESCO                             | validat per homes i dones de 35-79 anys               | Esdeveniments CV: CI i ACV a 10 anys  |
| ERICE                              | Validat per a homes i dones de 30-≥80 anys            | Esdeveniments CV: CI i ACV a 10 anys  |

**Font:** Taula actualitzada de l'estudi d'Elosua and Morales Salinas (2011)

**Notes:** ACV: accident cerebrovascular; CI: cardiopatia Isquèmica; CV: cardiovascular; DM: diabetis mellitus; IM: infart de miocardi

A Espanya existeixen cinc funcions adaptades de les equacions de Framingham disponibles: REGICOR (Marrugat et al. 2003a; Marrugat et al. 2003b), SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation) (Sans et al. 2007), DORICA (Dislipèmia, Obesitat i Risc Cardiovascular (Aranceta et al. 2004), FRESCO (Marrugat et al. 2014) i ERICE (Gabriel et al. 2015). No obstant, es recomana la utilització de la funció REGICOR per al càlcul del risc per els següents motius: 1) és la única que disposa d'un estudi de validació a partir de dades provinents de diferents centres de salut d'Espanya (Marrugat et al. 2007); 2) pot aplicar-se a un rang major d'edat, sobretot considerant que la major part dels esdeveniments i mortalitat cardiovascular es produeixen després dels 60 anys en homes i 65 en dones (Baena Díez et al. 2002); i 3) pot utilitzar-se en un major nombre de pacients, inclosos els pacients diabètics.

No obstant, encara que les funcions de risc cardiovascular constitueixen la base per establir prioritats en prevenció primària, no s'ha d'oblidar que les taules de risc actualment disponibles són un mètode bastant imprecís de predir el risc individual, per la qual cosa només haurien d'utilitzar-se com a aproximació al risc de MCV. En aquest sentit, s'estan fent esforços importants per a identificar biomarcadors que millorin la reclassificació dels individus sobre tot de risc moderat (Elosua and Sayols-Baixeras, 2017).

### 1.3.2. Ús de la genètica en la discriminació i predicció del risc

Com s'ha comentat anteriorment, els estudis de seqüenciació i genotipat a gran escala (GWAS) en múltiples cohorts han identificat centenars de variants genètiques nuclears (MacArthur et al. 2017), i en menor quantitat, de mitocondrials (Abu-Amero et al. 2010; Gawel et al. 2008; Hudson et al. 2014; Mueller et al. 2011; Sazonova et al. 2015), significativament associades a les MCVs i a factors de risc de les MCVs com l'HTA (ICBP-GWAS 2011). Tanmateix, la identificació de variants genètiques associades independentment als FRC, són particularment rellevants en l'avaluació del RCV (Lluís-Ganella et al. 2010), ja que podrien ser utilitzades com a nous biomarcadors candidats en el desenvolupament d'aquestes malalties. Malgrat això, les variants genètiques individuals tenen una magnitud d'associació molt petita ( $OR = 1,1$  a  $1,4$ ) que limita la millora de la discriminació i la seva capacitat predictiva (Elosua and Sayols-Baixeras, 2017), encara que aquesta magnitud augmenta quan es consideren varies variants.

Aquest fet ha donat lloc al desenvolupament de les anomenades «puntuacions de risc genètic» (GRS; *Genetic Risk Score*), en les quals els SNPs es combinen per a proporcionar una millora en l'estimació del risc genètic. Un GRS pot estimar el risc global que té una persona per a desenvolupar una malaltia basant-se en variants genètiques que han estat estadísticament associades amb el risc per a aquesta malaltia (Inouye et al. 2018). Atès que el perfil genètic d'un individu s'estableix al néixer, el risc de malaltia podria determinar-se teòricament abans de (la majoria) les exposicions ambientals (Knowles and Ashley 2018). Per aquest motiu, s'ha posat molta esperança en el desenvolupament d'aquests models com un avançament de la medicina de precisió. A més, s'ha demostrat que la combinació de la capacitat de discriminació i predicció del risc genètic (GRS) i el no genètic (FRC) per a calcular el RCV en 10 anys, és més potent que qualsevol dels dos per separat (Goldstein et al. 2014).

### 1.3.2.1. Creació d'una puntuació de risc genètic o GRS

Un GRS pot basar-se únicament en les dades genètiques disponibles o pot incorporar informació ambiental, fenotípica i/o demogràfica. Els resultats publicats dels GRS tendeixen a variar d'un estudi a un altre i depenen de la mostra de població que s'avalua i del resultat real d'interès (és a dir, la progressió de la malaltia en la seva etapa inicial o tardana, els subtipus de malaltia o el risc general de malaltia). Aquests són factors importants a tenir en compte quan es construeixen i avaluen els GRS per al seu ús en una mostra en particular (Cooke Bailey and Igo 2016).

Fonamentalment, la creació d'un GRS implica resumir la informació a través de múltiples SNPs. Per tant, primer és necessari seleccionar les variants genètiques que s'inclouran en la puntuació de risc, les quals provenen d'estudis d'associació de gens candidats o de GWAS. En general, els GRS creats fins ara per a la discriminació i predicció del risc cardiovascular utilitzen únicament variants nuclears (Elosua and Sayols-Baixeras, 2017). El nombre d'estudis que han realitzat un GRS per estimar el RCV amb dades del genoma mitocondrial és nul. Per tant, l'estàndard en el camp ha estat utilitzar SNPs nuclears identificats en grans metanàlisis que van aconseguir significació a nivell de tot el genoma ( $p > 5 \times 10^{-8}$ ) i que sovint són variants comunes (freqüència al·lèlica  $> 5\%$ ), degut a que els metanàlisis tendeixen a no tenir suficient poder per a detectar els efectes de les variants més rares (MacArthur et al. 2017). L'inconvenient d'incloure únicament els SNPs nuclears més significatius i replicats és que poden haver molts altres SNPs, tant nuclears com mitocondrials, amb efectes reals que no aconsegueixin aquests estrictes nivells de significació a nivell de tot el genoma (Smith et al. 2015).

El mètode més comú per a construir un GRS es basa en sumar el nombre d'al·lells que confereixen risc en un individu. Per a un GRS format per variants nuclears s'assigna una puntuació de -1, 0 o 1, on a l'estat heterozigot (és a dir, Aa) se li assigna un valor de 0, a l'estat homozigot sense risc un valor de -1, i a l'estat homozigot de risc el valor d'1. Un GRS pot ser no ponderat, on simplement se suma el nombre d'al·lells de risc d'un individu i on s'assumeix que l'efecte de risc associat per a cada SNP és igual (i additiu), o per altre banda, es pot construir un GRS més precís, si cada SNP es pondera utilitzant la mida del seu efecte (Paynter et al. 2009), donant més pes a les variants amb els efectes més forts.

La capacitat de discriminació d'un GRS s'avalua mesurant l'àrea sota la corba (AUC; *Area Under the Curve*) d'una característica operativa del receptor (ROC; *Receiver Operating Characteristic*). L'anàlisi en base a les corbes ROC és un mètode per determinar la sensibilitat d'una prova diagnòstica dicotòmica, en aquest cas, amb l'objectiu de classificar a la població segons presentin un esdeveniment d'interès o no. Així doncs, l'àrea sota la corba ROC, anomenades AUC, és una funció per a identificar correctament la presència (sensibilitat) o absència (especificitat) del resultat d'interès (Cooke Bailey and Igo 2016). Aquesta àrea pot interpretar-se com la probabilitat que davant un parell d'individus, un de malalt i l'altre sa, la prova els classifiqui correctament. D'una banda, la sensibilitat quantifica la proporció d'individus que presenten el resultat d'interès i que són classificats per la prova com a portadors de la malaltia, i per altra banda, l'especificitat quantifica la proporció d'individus que no presenten el resultat d'interès i són classificats per la prova com a tal. En general, les AUC varien entre 0,5, el que indica que el model predictiu no és millor que l'atzar, i 1, el que indica un model perfecte (Janssens et al. 2007). Un AUC = 0.70 indica que, si seleccionés a l'atzar a una persona amb la malaltia i una altra sense, el risc estimat seria superior en la persona afectada en comparació al control, en un 70% els casos. De manera



que com més elevat sigui l'AUC, més precisa serà la discriminació del risc i, per tant, major serà la utilitat clínica de la combinació de factors inclosos en el model (Cooke Bailey and Igo 2016).

### 1.3.2.2. Millora en l'estimació del risc cardiovascular

Sovint el valor predictiu de les puntuacions genètiques per si mateixes no és molt elevat, aconseguint resultats similars als obtinguts per els FRC. Per aquest motiu, són varis els estudis que han avaluat el valor afegit d'incloure la informació genètica en les funcions de risc clàssiques (Taula 5), és a dir, combinar un GRS amb una puntuació de risc com la de Framingham o REGICOR per a donar una estimació general del risc CV (Anderson et al. 2010; Brautbar et al. 2009; Davies et al. 2010; de Vries et al. 2015; Ganna et al. 2013; Goldstein et al. 2014; Gransbo et al. 2013; Hughes et al. 2012; Iribarren et al. 2016; Isaacs et al. 2013; Kathiresan et al. 2008; Krarup et al. 2015; Lv et al. 2012; Lluís-Ganella et al. 2012; Morrison et al. 2007; Patel et al. 2012; Paynter et al. 2009; Paynter et al. 2010; Qi et al. 2011a; Qi et al. 2011b; Ripatti et al. 2010; Shiffman et al. 2011; Tada et al. 2016; Talmud et al. 2008; Thanassoulis et al. 2012; Tikkanen et al. 2013; Vaarhorst et al. 2012).

**Taula 5:** Característiques i resultats dels estudis que han analitzat el valor afegit de la informació genètica en l'estimació del RCV.

| Estudi                   | Succés | Variants genètiques             | Altres va. Predictives |                   | Resultats                     |  |                    |
|--------------------------|--------|---------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------------------|--|--------------------|
|                          |        |                                 | FR                     | Historia familiar | Discriminació ( $\Delta$ AUC) | Reclassificació-NRI                    | NRI clínic         |
| <b>Cas-control</b>       |        |                                 |                        |                   |                               |  |                    |
| Davies et al. (2010)     | CI     | 1 SNP (9p21)<br>12 SNP          | Si                     | No                | 0,003<br>0,008 <sup>a</sup>   | -                                      | -                  |
| Anderson et al. (2010)   | CI     | 5 SNP                           | Si                     | Si                | 0,008                         | 16,0% <sup>a</sup>                     | 28,3% <sup>a</sup> |
| Qi et al. (2011)         | IM     | 3 SNP                           | Si                     | No                | 0,010 <sup>a</sup>            | -                                      | -                  |
| Qi et al. (2011)         | CI     | 5 SNP                           | Si                     | Si                | -                             | -                                      | -                  |
| Lv et al. (2012)         | CI     | 8 SNP                           | Si                     | No                | 0,022 <sup>a</sup>            | -                                      | -                  |
| Patel et al (2012)       | IM     | 11 SNP                          | Si                     | No                | 0,012 <sup>a</sup>            | -                                      | -                  |
| <b>Cas-cohort</b>        |        |                                 |                        |                   |                               |  |                    |
| Hughes et al. (2012)     | CI     | 11 SNP +<br>2 haplog.<br>15 SNP | Si                     | No                | 0,009<br>0,011 <sup>a</sup>   | 7,5% <sup>a</sup><br>6,5% <sup>a</sup> | 6,3%<br>5,1%       |
| Vaarhorst et al. (2012)  | CI     | 29 SNP                          | Si                     | No                | -                             | 2,8% <sup>a</sup>                      | -                  |
| <b>Cohort</b>            |        |                                 |                        |                   |                               |  |                    |
| Morrison et al. (2007)   | CI     | 10 SNP                          | Si                     | No                | 0,002<br>0,011 <sup>a</sup>   | -                                      | -                  |
| Kathiresan et al. (2008) | MCV    | 9 SNP                           | Si                     | No                | 0,003                         | -                                      | -                  |
| Talmud et al. (2008)     | CI     | 1 SNP (9p21)                    | Si                     | Si                | 0,02                          | 13,8% <sup>a</sup>                     | -                  |
| Brautbar et al. (2009)   | CI     | 1 SNP (9p21)                    | Si                     | No                | 0,004 <sup>a</sup>            | 0,8%                                   | 6,2% <sup>a</sup>  |
| Paynter et al. (2009)    | MCV    | 1 SNP (9p21)                    | Si                     | Si                | 0,002                         | Framingham: 2,7%<br>Reynolds: -0,2%    | -                  |

La taula continua a la pàgina 45.

Taula 5: Continuació.

| Estudi                      | Succés | Variants genètiques                | Altres va. predictives |                   | Resultats  |  |                    |
|-----------------------------|--------|------------------------------------|------------------------|-------------------|--|--|--------------------|
|                             |        |                                    | FR                     | Historia familiar | Discriminació ( $\Delta$ AUC)                              | Reclassificació-NRI  | NRI clínic         |
| <b>Cohort</b>               |        |                                    |                        |                   |  |  |                    |
| Paynter et al. (2010)       | MCV    | 101 SNP<br>12 SNP                  | Si                     | Si                | 0,000<br>0,001   | 0,5%<br>0,5%   | -                  |
| Ripatti et al. (2010)       | CI     | 13 SNP                             | Si                     | Si                | 0,001  | 2,2%   | 9,7% <sup>a</sup>  |
| Shiffman et al. (2011)      | IM     | 1 SNP<br>(9p21)<br>1 SNP<br>(KIF6) | Si                     | -                 | H: 0,005<br>D: 0,002<br>H: 0,015 <sup>a</sup><br>D: -0,001 | H: 2,1%<br>D: -1,8%<br>H: 2,7%<br>D: 0,7%                        | -                  |
| Thanassoulis et al. (2012)  | CI     | 13 SNP                             | Si                     | Si                | 0,002  | 19,0% <sup>a</sup>   | -                  |
| Luis-Granella et al. (2012) | CI     | 8 SNP                              | Si                     | Si                | No   | 6,4%   | 17,4% <sup>a</sup> |
| Gransbo et al. (2013)       | MCV    | 1 SNP<br>(9p21)                    | Si                     | No                | 0,001  | 1,2% <sup>a</sup>  | -                  |
| Isaacs et al. (2013)        | CI     | GRS <sup>b</sup>                   | Si                     | No                | 0,000  | -  | -                  |
| Gamma et al. (2013)         | CI     | 395 SNP<br>46 SNP                  | Si                     | No                | 0,002<br>0,004 <sup>a</sup>                                | 4,2% <sup>a</sup><br>4,9% <sup>a</sup>                           | -                  |
| Tikkanen et al. (2013)      | CI     | 28 SNP                             | Si                     | Si                | 0,003 <sup>a</sup>   | 5,0% <sup>a</sup>  | 27,0% <sup>a</sup> |
| Goldstein et al. (2014)     | CI     | 50 SNP                             | -                      | No                | 0,010  | -  | -                  |
| Krarup et al. (2015)        | CI     | 45 SNP                             | Si                     | No                | 0,010 <sup>a</sup>   | -2%  | -                  |
| De Vries et al (2015)       | CI     | 152 SNP                            | Si                     | Si                | 0,003  | 2,2%   | -                  |
| Tada et al. (2016)          | CI     | 27 SNP<br>50 SNP                   | Si                     | Si                | Modest <sup>a</sup>  | 15% <sup>a</sup> (NRI continu)<br>17% <sup>a</sup> (NRI continu) | -                  |
| Iribarren et al. (2016)     | CI     | 8 SNP                              | Si                     | Si                | 0,008 <sup>a</sup>   | 5% <sup>a</sup>  | 9% <sup>a</sup>    |
|                             |        | 12 SNP                             |                        |                   | 0,007 <sup>a</sup>   | 5% <sup>a</sup>  | 9% <sup>a</sup>    |
|                             |        | 36 SNP                             |                        |                   | 0,008 <sup>a</sup>   | 5% <sup>a</sup>  | 7% <sup>a</sup>    |
|                             |        | 51 SNP                             |                        |                   | 0,009 <sup>a</sup>   | 4% <sup>a</sup>  | 7% <sup>a</sup>    |

Font: Elosua and Sayols-Baixeras (2017)

Notes:  $\Delta$ AUC: canvi en l'àrea sota la corba, CI: cardiopatia isquèmica, FR: factor de risc; GRS: càrrega genètica de risc, IM: infart de miocardi, MCV: malaltia cardiovascular, NRI: índex de reclassificació, SNP: polimorfisme de base única

<sup>a</sup> Valor  $p < 0,05$

<sup>b</sup> Relacionat amb lípids

La majoria d'aquests estudis no han trobat una millora en la capacitat de discriminació; encara que sí observen una millora en la reclassificació dels individus en categories de risc, especialment en aquells amb risc moderat (Elosua and Sayols-Baixeras, 2017).

En aquest sentit, el xip d'ADN de risc cardiovascular, Cardio inCode® (Ferrer inCode, Barcelona, Espanya), va ser el primer test dissenyat per a predir el RCV que integra la informació genètica amb la informació clínica, tenint en compte els hàbits de vida del pacient. El xip incorpora la informació de 11 variants nuclears associades amb la MCV, en concret l'IM, que són independents dels factors de risc clàssics en les funcions de predicció del risc. La taula 6 mostra quines són aquestes variants, on es localitzen, quin són els gens més propers i com hi poden interactuar. El paper dels gens diana d'aquests SNPs es

relacionen amb el metabolisme lipídic com MIA3 i LPA, els quals s'associen amb la regulació de la concentració plasmàtica del cLDL i la seva alteració propicia les lesions ateroscleròtiques i la trombogènesis (Burgess et al. 2018; Zaimkohan et al. 2016), o bé poden modular diferents característiques de la funció endotelial com és el cas de la resta de gens de la taula (Beaney et al. 2017; Liu et al. 2015; Paquette et al. 2018; Sjaarda et al. 2018; Zabalza et al. 2015; Zhong et al. 2017). Tot i que tot ells contribueixen al risc d'aterosclerosi i s'han associat amb la cardiopatia coronària, l'IM o l'ACV, en determinats casos com en KCNE2, SLC5A3 i MRPS6 encara no s'ha trobat una via plausible que permeti explicar quina és la seva associació amb la malaltia i, per tant, en aquest cas la ubicació genòmica no suggereix cap mecanisme obvi a través del qual aquest SNP (rs9982601) pugui estar actuant (Beaney et al. 2017).

En un primer estudi liderat pel Grup d'Investigació Cardiovascular de l'IMIM (Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques) i Gendiag.exe, es varen seleccionar 9 de les variants genètiques associades amb episodis cardiovasculars i no relacionades amb els FRC. L'associació entre el nombre d'al·lels de risc en aquestes variants i el risc d'episodis CV, va resultar ser lineal i directe, de manera que es va corroborar el fet de que amb un major nombre d'al·lels de risc, més probabilitat es tenia de desenvolupar un episodi cardiovascular (Lluis-Ganella et al. 2010). Atès que les variants de risc eren independents dels FRC, la informació facilitada va millorar l'estimació del RCV en relació als algorismes de risc utilitzats actualment (basats únicament en els FRC).

Altrament, aquests resultats també es varen confirmar en un segon estudi de validació clínica en dues grans cohorts (Framingham i REGICOR) que ha inclòs 6.400 individus (Lluis-Ganella et al. 2012). En aquests dos estudis, el valor afegit d'incorporar la puntuació genètica en les funcions clàssiques de risc va millorar la reclassificació dels individus en les diferents categories de risc, el que va permetre la identificació d'individus amb un risc elevat i la implementació de mesures preventives per evitar el desenvolupament d'un episodi CV.

**Taula 6:** SNPs inclosos al xip Cardio inCode®

| Variant    | GRCh38    | Regió cromosòmica | Gens propers         | Significança clínica   | Efecte              | Al·lels | A/He/ r/isc | MAF      |
|------------|-----------|-------------------|----------------------|--|---------------------|---------|-------------|----------|
| rs10455872 | 160589086 | 6q.25.3           | LPA                  | regulació cLDL   | variant intrònica   | A/G     | G           | 0,02 (G) |
| rs10507391 | 30737959  | 13q12.3           | ALOX5AP              | biosíntesi mediadors proinflamatoris (leucotriens)   | variant intrònica   | A/T     | T           | 0,47 (T) |
| rs12526453 | 12927312  | 6p24.1            | PHACTR1              | reorganització citoesquelet  | variant intrònica   | C/G     | C           | 0,17 (G) |
| rs1333049  | 22125504  | 9p21.3            | CDKN2A/2B            | regulació proliferació i diferenciació cel·lular / regulació cicle cel·lular   | variant intergènica | G/C     | C           | 0,42 (C) |
| rs17222842 | 30765980  | 13q12.3           | ALOX5AP              | biosíntesi mediadors proinflamatoris (leucotriens)   | variant intergènica | G/A     | A           | 0,03 (A) |
| rs17465637 | 222650187 | <u>1q41</u>       | MIA3                 | regulació cLDL   | variant intrònica   | A/C     | C           | 0,50 (A) |
| rs501120   | 44258419  | 10q11.21          | CXCL12               | recrutament leucòcits i funcions cèl·lules mare hematopoètiques  | variant intergènica | T/C     | T           | 0,33 (C) |
| rs6725887  | 202881162 | <u>2q33.2</u>     | WDR12                | regulació proliferació i diferenciació cel·lular   | variant intrònica   | T/C     | C           | 0,05 (C) |
| rs9818870  | 138403280 | 3q22.3            | MRAS                 | regulació creixement i diferenciació cel·lular   | variant 3' UTR      | C/T     | T           | 0,09 (T) |
| rs9982601  | 34226827  | 21q12.3           | SLC5A3, MRPS6, KCNE2 | transportador de Na <sup>+</sup> (resposta a l'estrés hiperosmòtic), subunitat ribosoma mitocondrial (6S), subunitat del canal de K <sup>+</sup> (síndrome QT llarg) | variant intergènica | C/T     | T           | 0,11 (T) |
| rs9315051  | 30762040  | 13q12.3           | ALOX5AP              | biosíntesi mediadors proinflamatoris (leucotriens)   | variant intrònica   | A/G     | G           | 0,12 (G) |

Font: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Index](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index)

Notes: GRCh38: versió 38 del consorci de referència del genoma humà, MAF: freqüència de l'al·lel menor.



02

# Justificació del treball i Objectius



## 2.1. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

Fins al moment, l'estudi poblacional en relació amb les MCV s'ha enfocat a través de: a) estudis epidemiològics descriptius, que contemplen l'anàlisi de variables ambientals, factors de risc clàssic i conductes relatives a la dieta, estil de vida, etc., els quals es realitzen periòdicament en el nostre país, i b) de l'anàlisi de variants genètiques obtingudes a partir d'estudis d'associació o GWAS.

La CI (sobretot l'IM) i l'ACV isquèmic són les dues malalties ateroscleròtiques que produeixen un major nombre de morts d'origen cardiovascular. Malgrat que ambdues entitats comparteixen nombrosos factors de risc, el paper d'aquests i la seva importància en la morbimortalitat és variable. Així, per poder oferir solucions més efectives a nivell diagnòstic, es necessari el coneixement dels processos biològics associats a aquestes malalties amb la finalitat d'entendre la interacció entre els factors individuals genètics, junt amb altres factors com els fisiològics (l'edat del pacient, embaràs, etc) o patològics (altres malalties que pugui tenir l'individu), els factors ambientals i els estils de vida dels pacients. Poder conèixer prèviament el risc de patir un esdeveniment cardiovascular podria ajudar a modificar els hàbits de vida, i així actuar sobre la prevenció i disminuir les possibilitats de sofrir-lo.

En aquest sentit, la complexitat genètica i fisiopatològica de les MCV pot ser reinterpretada en el context dels principis bioenergètics i de la genètica mitocondrial. En els últims anys s'ha incrementat el nombre d'evidències que associen la MCV amb nombrosos processos mitocondrials com la producció d'energia, el metabolisme oxidatiu, l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  o la producció de ROS, assumint que la disfunció mitocondrial es troba en el nexa d'aquestes malalties. Malgrat els esforços per conèixer els processos mitocondrials, que poden arribar a induir un IM o un ACV, l'ADNmt segueix sent un objectiu a explorar pel descobriment de noves mutacions que puguin influir en el risc cardiovascular. Tenint en compte aquests antecedents, resulta fonamental aprofundir en l'anàlisi de l'ADNmt i la seva possible implicació en les MCV.



A nivell genètic, s'ha demostrat que els diferents polimorfismes que caracteritzen cadascun dels haplogrups mitocondrials presenta uns mecanismes i funcions metabòliques diferents a causa del seu origen adaptatiu a les condicions ambientals. Aquest fet es tradueix en diferències de morbiditat i longevitat entre individus que tenen polimorfismes diferents. En aquest camp, diversos estudis realitzats, sobretot en població europea i d'Àsia oriental, han associat el fet de ser portadors de determinats haplogrups amb el risc de sofrir un esdeveniment cardiovascular. No obstant, les diferències genètiques existents entre poblacions, fins i tot dins el mateix continent europeu, fan necessària l'anàlisi d'aquests polimorfismes en diferents regions geogràfiques per tal de poder assolir resultats més concloents.

Tanmateix, les variants de l'ADNmt no definitòries d'haplogrup també es troben implicades en la pertorbació de la funció mitocondrial. Tot i l'abundància de treballs que fan referència al paper que juga l'ADN mitocondrial en relació a les MCV, és poca la bibliografia que hi ha publicada sobre les variants d'aquest genoma, respecte de les MCV, en comparació a l'abundància de treballs realitzats amb SNPs nuclears. A més, aquests estudis encara es redueixen més quan ens referim a l'anàlisi de mutacions concretes localitzades a la regió control de l'ADN mitocondrial, tot i essent una zona de vital importància, alhora que influeix en la regulació de l'expressió genètica. També, cal remarcar que a la pràctica, una gran part d'aquestes anàlisis s'han realitzat en població no caucasoide. A més, diversos estudis suggereixen que la reactivitat de les artèries intracranials i extracranials a determinats factors de risc podria ser diferent. Per tant, degut a les diferències en la prevalença dels principals factors etiològics, la associació d'aquestes variants de l'ADNmt amb la CI i l'ACV també podria ser diferent. Per aquest motiu, és d'especial interès ampliar el coneixement actual sobre la implicació de les variants mitocondrials en els processos cardiovasculars en població europea.

Sovint en la practica clínica s'avalua a les persones per determinar el seu risc cardiovascular a partir dels 40 anys a través de revisions mèdiques. Tot i així, es coneix que aquesta determinació és imprecisa i també que el desenvolupament, per exemple d'una CI, comença molt abans de que se'n desenvolupin els símptomes. Per tant, si es vol aconseguir una verdadera prevenció, es necessari poder identificar els individus amb major risc molt abans. Un dels últims estudis publicats ha desenvolupat i provat un sistema de puntuació de risc genètic que permet identificar a les persones amb risc de desenvolupar una cardiopatia coronària prematura a partir del seu perfil genètic (Inouye et al. 2018). Varen analitzar les dades de casi mig milió de persones del projecte d'investigació Biobank del Regne Unit i la tècnica va tenir en compte 1,7 milions de variants genètiques nuclears, demostrant que la capacitat predictiva de la puntuació de risc genètic va ser independent dels factors de risc convencionals, el que implica que la informació genètica complementa la informació que puguin proporcionar aquests factors convencionals (en lloc de reemplaçar-la).

Tot i que les guies de prevenció cardiovascular a Espanya de moment no recomanin l'ús de marcadors genètics en el càlcul del risc a l'espera de que es confirmin els resultats en nous estudis/poblacions, existeix una línia de recerca que estudia la validesa d'usar aquesta informació en la predicció del risc genètic i la utilitat de les proves genètiques com una determinació sistemàtica en la pràctica clínica (Singleton et al. 2012). No obstant, a nivell diagnòstic, no existeix, actualment, cap estudi que inclogui la informació de les variants

mitocondrials en una puntuació de risc genètic per estimar la discriminació i predicció del risc cardiovascular.

## 2.2. OBJECTIUS

El propòsit general d'aquest estudi és investigar la variabilitat genètica de la regió control mitocondrial en dos MCV (l'IM i l'ACV), considerant per a cadascuna la mateixa població i els mateixos factors de risc, i així, poder generar una puntuació de risc que compta amb la sinèrgia de la informació obtinguda dels genomes mitocondrials i nuclears, i la informació clínica i d'estil de vida. Per fer-ho, es plantegen els següents objectius:

1. Analitzar el comportament de la mortalitat i morbiditat hospitalària de les malalties cardiovasculars de major rellevància en les diferents comunitats autònomes d'Espanya.
2. Determinar l'existència d'una possible associació entre la variació de la regió control del genoma mitocondrial i la susceptibilitat a desenvolupar un IM o un ACV.
3. Valorar si la incorporació de les variants mitocondrials afegides en una puntuació de risc genètic, emprant marcadors nuclears, millora la capacitat de discriminació i predicció del risc cardiovascular.



03

Material, Resultats i Discussió



## 3.1 Capítol 1

Cardiovascular disease in Spain – Descriptive  
epidemiologic study 2000-2015



The cardiovascular mortality and morbidity data presented in this chapter have been generated to complement and update the data analysed in the article: *Umbria M, Aluja MP, Rafel J, Santos C. 2014. Enfermedad cardiovascular en España: estudio epidemiológico descriptivo 1999-2010. Antropo. 32: 1-13 (Annex II)*. The new analyses include the data obtained through the National Institute of Statistics (INE for its acronym in Spanish) until 2015.

### 3.1.1. MATERIAL AND METHODS

#### Study design

An observational and retrospective study was carried out in the scope of Spanish population between the years 2000 and 2015. The data used in the present study was obtained from the National Institute of Statistics (INE for its acronym in Spanish) (INE 2000-2015) for the same period. The data selection was carried out using the Tenth Revision of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) for deaths according to cause of death, and the International Classification of Diseases, Ninth Revision, Clinical Modification (ICD-9-CM) for the hospital morbidity data, related to circulatory system diseases (code I00-I99 of the ICD-10 and code 2891-2893,390-459 [except 435, 446 and 4590] of the ICD-9-CM).

#### Definition of variables

The analysis considered the most relevant circulatory system diseases that coincided in the INE's two search systems (deaths and hospitalizations for the Spanish population). These were: hypertensive diseases (ICD-10: I10-I15; ICD-9-CM: 401-405), acute myocardial infarction (AMI) (ICD-10: I21; ICD-9-CM: 410), other ischemic heart diseases (ICD-10: I20, I22-I25; ICD-9-CM: 4110, 4118, 412, 414), heart failure (ICD-10: I50; ICD-9-CM: 428), cerebrovascular diseases (ICD-10: I60-I69; ICD-9-CM: 430-434, 436-438) and atherosclerosis (ICD-10: I70; ICD-9-CM: 440).

The data corresponding to the number of deaths according to sex, age group and autonomous communities was obtained for that period. The hospital morbidity data for the Spanish population was obtained from the reduced international list Eurostat / OECD / WHO (2008) for the period 2005-2015 so that the variables sex, age and main diagnosis were as close as possible to those of deaths according to cause of death. However, unlike mortality data, morbidity data is not available by autonomous communities separated by sex when different age groups are analysed.



## Data analysis

The rates of cardiovascular mortality and morbidity per 100,000 inhabitants have been calculated taking into account the different variables. Therefore, the projections of the annual Spanish population and each autonomous communities, separated by sex and five age groups (<20, [20-34], [35-49], [50-75] and  $\geq 75$ ) have been used. In the morbidity data, gender separation has not been performed in individuals aged  $\geq 50$  when the autonomous communities were included in the classification, since the data was not available.

To compare trends between different periods and autonomous communities, the standardized rates by age have been used through direct method (revised European standard population 2013, proposed by the Statistical Institute of the European Union [Eurostat 2013]). The evolution of the standardized mortality rate by age has been analysed from 2000 to 2015, while for morbidity data it has been carried out between 2005 and 2010. The territorial representation of this data was done from the average of the years analysed for each disease and sex (in the case of mortality).

The average, median, standard deviation (SD), range, and interquartile range (Q25-Q75) of the number of deaths and hospitalizations studied was calculated. Student's T-tests and the analysis of variance (ANOVA) were used to determine if there were significant differences in the average of the parameters evaluated between the different groups or categories. All the statistical analyses were carried out with the IBM SPSS version 22 program (SPSS Inc.). A level of significance of  $p < 0.05$  was considered in all analyses

### 3.1.2. RESULTS

#### Extent of cardiovascular diseases in Spain: mortality and hospital morbidity

The specific rates of mortality and hospital morbidity of six cardiovascular diseases (CVD) studied for the periods 2000 to 2015 and 2005 to 2015 respectively, separated by sex, age and autonomous community are available in Table I.1.1. of Annex 1. Table 7 shows the number of deaths caused by CVD in Spain between 2000 and 2015 by sex

**Table 7:** Number of deaths for CVD, by sex, from 2000 to 2015.

| Sex   | 2015    | 2014    | 2013    | 2012    | 2011    | 2010    | 2009    | 2008    |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Men   | 55.790  | 52.907  | 52.917  | 54.587  | 53.256  | 53.853  | 54.318  | 55.078  |
| Woman | 67.457  | 63.546  | 63.774  | 66.690  | 64.276  | 64.507  | 65.048  | 66.813  |
| Total | 123.247 | 116.453 | 116.691 | 121.277 | 117.532 | 118.360 | 119.366 | 121.891 |
| Sex   | 2007    | 2006    | 2005    | 2004    | 2003    | 2002    | 2001    | 2000    |
| Men   | 56.384  | 54.808  | 57.054  | 55.638  | 58.031  | 56.302  | 55.673  | 56.303  |
| Woman | 66.866  | 65.085  | 68.879  | 67.209  | 70.745  | 68.404  | 67.627  | 68.307  |
| Total | 123.250 | 119.893 | 125.933 | 122.847 | 128.776 | 124.706 | 123.300 | 124.610 |

According to the data published by the INE, during the period from 2000 to 2015 there were about 381,790 deaths per year in Spain. Among them, CVD were the leading cause of

death (32% of total deaths) with an average (SD) of 121,758 (3,504) deaths and a median (Q25-Q75) of 122,369 (118,611-124,282) deaths. Table 8 shows the same analysis calculated according to the sex of the deceased individuals.

**Table 8:** Descriptive statistics of mortality for CVD, by sex, period 2000-2015.

|                 | <i>Total</i>    | <i>Men</i>    | <i>Women</i>  |
|-----------------|-----------------|---------------|---------------|
| N               | 1.948.132       | 882.899       | 1.065.233     |
| Mean [deaths]   | 121.758         | 55.181        | 66.577        |
| Median [deaths] | 122.369         | 55.358        | 66.839        |
| SD [deaths]     | 3.504           | 1.492         | 2.043         |
| Range [deaths]  | 116.453-128.776 | 52.907-58.031 | 63.546-70.745 |
| Quartile 25     | 118.611         | 53.969        | 64.642        |
| 50              | 122.369         | 55.358        | 66.839        |
| 75              | 124.282         | 56.302        | 68.137        |

**Notes:** SD: Standard deviation

Unlike women, where CVD continued to be the main cause of death in 2015 (32.3% of total deaths in women), in men it became the second (26.3% of total deaths in men) after tumour mortality (ICD-10: C00-C97 code) after 1999 (31.9% of total deaths in men).

The CVD that caused a greater number of deaths between 2000 and 2015 was ischemic heart disease (IHD), which includes AMI and the group called "other ischemic heart diseases." IHD caused an average of 36,163 deaths per year (30% of the total cardiovascular mortality), of which 20,581 occurred in men (57% of the total IHD; 37% of cardiovascular mortality in men) and 15,582 in women (43% of the total IHD; 23% of cardiovascular mortality in women). Of all ischemic heart disease, AMI is the most frequent and with 56% (58% in men and 54% in women). In second place is cerebrovascular disease, with an average of 32,145 deaths per year (26% of total cardiovascular mortality), of which 13,422 were men (42% of total cerebrovascular disease; 24% of cardiovascular mortality in men) and 18,723 were women (58% of total cerebrovascular disease; 28% of cardiovascular mortality in women). Of all cerebrovascular diseases, 21% are haemorrhagic, 15% occlusive and 64% is classified as other cerebrovascular disease and poorly defined. In third place, heart failure causes 15% of total cardiovascular mortality (11% in men and 18% in women), and the so-called hypertensive disease (essential hypertension, hypertensive heart disease and hypertensive kidney disease) causes 6% of total cardiovascular mortality (5% in men and 8% in women).

In relation to morbidity, according to INE data between 2005 and 2015 shows an average of 4,719,227 hospitalizations per year were registered, of which 12.6% were due to a CVD (Table 9).

**Table 9:** Number of hospital admissions for CHD, by sex, from 2005 to 2015

| Sex   | 2015    | 2014    | 2013    | 2012    | 2011    | 2010    | 2009    | 2008    |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Men   | 343.744 | 339.103 | 337.470 | 330.943 | 328.461 | 335.138 | 331.430 | 334.310 |
| Woman | 269.404 | 268.472 | 264.957 | 263.619 | 262.385 | 264.242 | 263.267 | 265.407 |
| Total | 613.148 | 607.575 | 602.427 | 594.562 | 590.846 | 599.830 | 594.697 | 599.716 |
| Sex   | 2007    | 2006    | 2005    |         |         |         |         |         |
| Men   | 331.685 | 317.791 | 325.258 |         |         |         |         |         |
| Woman | 261.992 | 255.136 | 255.788 |         |         |         |         |         |
| Total | 593.677 | 582.928 | 581.045 |         |         |         |         |         |

IHD produced an average (SD) of 596,363 (9,609) hospitalizations and a median (Q25-Q75) of 594,687 (590,846-602,427). Table 10 shows the same analysis calculated according to sex.

**Table 10:** Descriptive statistics of hospital admissions for CVD, by sex, period 2005-2015

|                     | Total           | Men            | Women           |
|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| N                   | 6.560.001       | 3.665.333      | 2.894.669       |
| Mean [admissions.]  | 596.363         | 333.212        | 263.151         |
| Median [admissions] | 594.697         | 331.685        | 263.619         |
| SD [admissions]     | 9.609           | 5.427          | 4.444           |
| Range [admissions]  | 581.045-613.148 | 325.258-343744 | 255.136-269.404 |
| Quartile 25         | 590.846         | 328.461        | 261.992         |
| 50                  | 594.697         | 331.685        | 263.619         |
| 75                  | 602.427         | 337.470        | 265.407         |

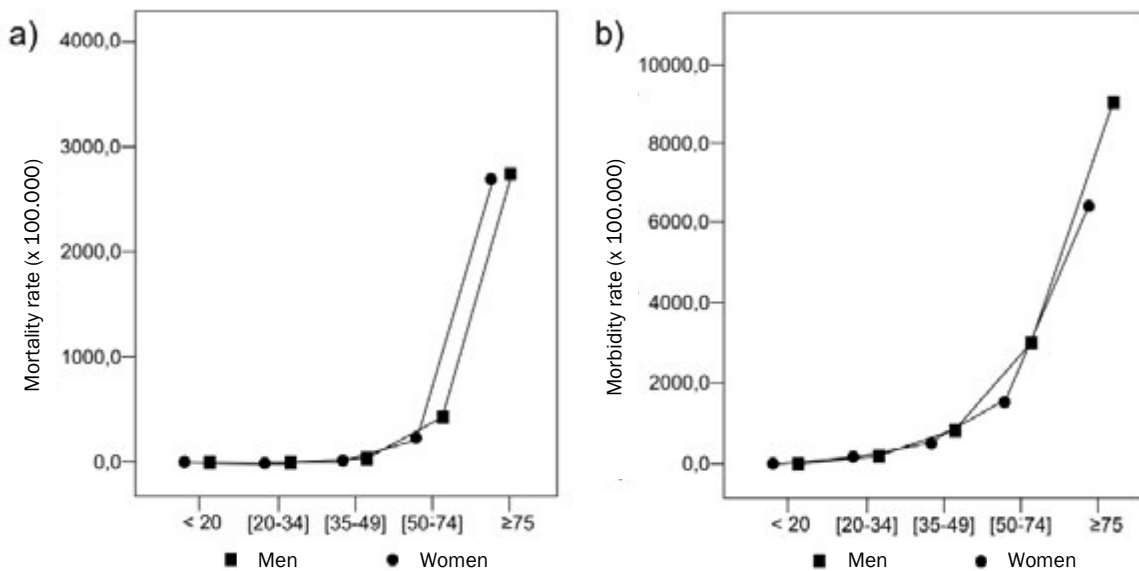
**Notes:** SD: Standard deviation

In men, CVD was the first cause of hospital admissions in 2015 (15.3% of the total number of registered hospitalizations for men), and also in women (10.7% of total registered hospitalizations for women), second only after complications in pregnancy, birth and puerperium (19.2% of total registered hospitalizations in women).

Among the CVDs analysed that caused a greater number of hospitalizations between 2005 and 2015 were: heart failure, with an average of 106,610 hospitalizations per year (18% of the CVD hospitalizations), of which 49,085 affected men (46% of the total heart failure; 15% of CVD hospitalizations in men) and 57,525 in women (54% of the total cases of heart failure; 21% of the CVD hospitalizations in women), IHD with an average of 106,046 hospitalizations per year (18% of CVD hospitalizations), of which 76,760 were registered in men (72% of the total IHD; 23% of CVD hospitalizations in men) and 29,286 in women (28% of the total cases of IHD; 11% of CVD hospitalizations in women), and the cerebrovascular disease, with an average of 101,098 hospitalizations (17% of CVD hospitalizations), of which 54,189 were in men (53.6% of the total cerebrovascular disease; 16% of CVD hospitalizations in men) and 46,909 in women (46.4% of the total cerebrovascular disease; 18% of CVD hospitalizations in women).

### Distribution by age and sex

The average mortality rate per 100,000 inhabitants for CVD in the period 2000-2015 by age and sex is presented in Figure 14a. Among specific age groups, the mortality rate for CVD experiences exponential growth, significant from age 50 for both sexes and in all diseases analysed (table I.1.1. of Annex 1). In the age groups <20, [20-34] and [35-49], the mortality rate remains low and stable in women and men, while higher values are observed after age 75 (Figure 14a)



**Figure 14.** a) Mortality and b) hospital morbidity rate of cardiovascular disease, by age groups and sex (years 2000 - 2015).

Although in Spain cardiovascular mortality for this period is higher in women (55%) than in men (45%), the gross mortality rate for CVD does not show significant differences between men and women. In contrast, the standardized rate by age is significantly greater in men than in women (t-test:  $t = 1.095$ ;  $p = 0.002$ ).

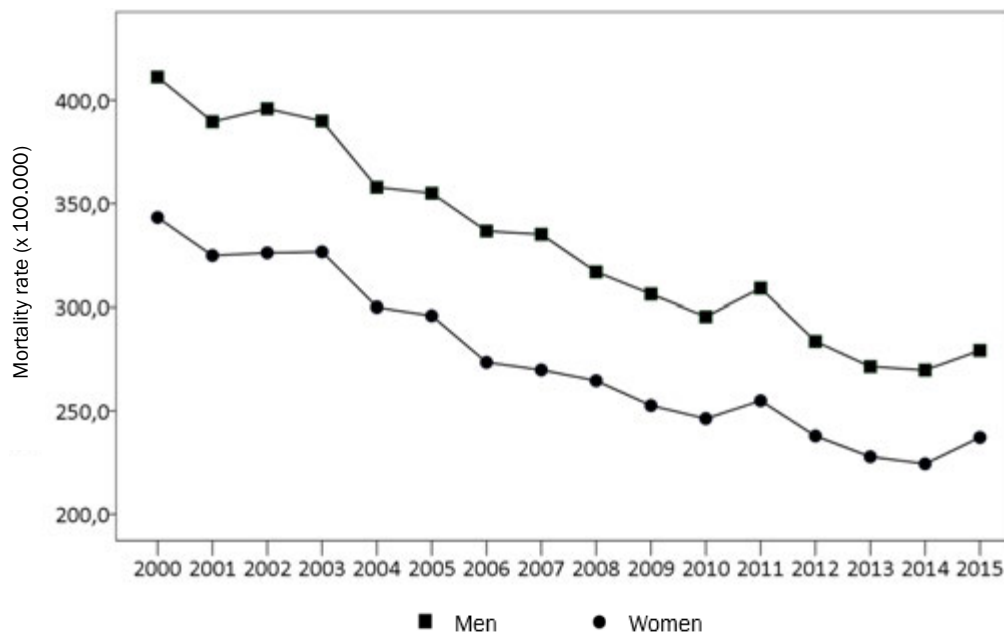
When the different disease subgroups are considered separately, significant differences have also been observed by sex. The mortality rate for hypertensive diseases (t-test:  $t = 4,992$ ;  $p < 0.001$ ) and heart failure (t-test:  $t = 3,621$ ;  $p < 0.001$ ) was higher in women across all age groups; however, the rate of AMI (t-test:  $t = -7.052$ ;  $p < 0.001$ ) and the group of other ischemic heart diseases (t-test:  $t = -5,817$ ;  $p < 0.001$ ) was higher in men. Regarding the mortality rates from cerebrovascular diseases (t-test:  $t = 0.156$ ;  $p = 0.87$ ) and atherosclerosis (t-test:  $t = 0.795$ ;  $p = 0.42$ ) no significant differences were observed between men and women. However, in both diseases rates increase progressively with age, and are higher in men across all age groups up to age 75, where the female rate is higher.

The average rate of hospital morbidity per 100,000 inhabitants [Eurostat / OCDE / WHO (2008)] for CVD in the period 2005-2010 by age and sex is presented in Figure 14b. Hospital morbidity for CVD also experiences exponential growth with age, achieving the highest values in the most advanced ages ( $\geq 50$  years). This increase is observed in all disease subgroups, with an increase in morbidity for IHD before age 50 (Table I.1.1. of Annex 1).

The gross morbidity rate for CVD in this period only shows significant differences between men and women aged over 50, when it becomes higher in men. The analysis carried out for each of the studied diseases only shows significant differences by sex in the morbidity from AMI (t-test:  $t = -3,026$ ;  $p = 0.004$ ), other ischemic heart diseases (t-test:  $t = -3,127$ ;  $p = 0.003$ ), and atherosclerosis (t-test:  $t = -3,277$ ;  $p = 0.002$ ), where the values are significantly higher in men.

### Temporary trend

When analysing the evolution of CVD mortality rate standardized by age in individuals aged  $\geq 50$  from 2000 to 2015, exists a significant decrease in rates in both sexes (Figure 15). In men, values go from around 410 deaths per 100,000 inhabitants in the year 2000, to 280 in 2015 (32% decrease). In women, the rates go from 345 deaths per 100,000 inhabitants in 2000 to 237 deaths in 2015 (31% decrease).



**Figure 15.** CVD mortality rate standardized by age, by sex, in individuals aged  $\geq 50$ .

The evolution of mortality rates in the different disease subgroups standardized by age in individuals aged  $\geq 50$ , by sex, in this same period are shown in figures 16 and 17. Except for the group of other ischemic heart diseases, the rest of diseases analysed presented significant differences between the years studied (ANOVA:  $p < 0.001$ ).

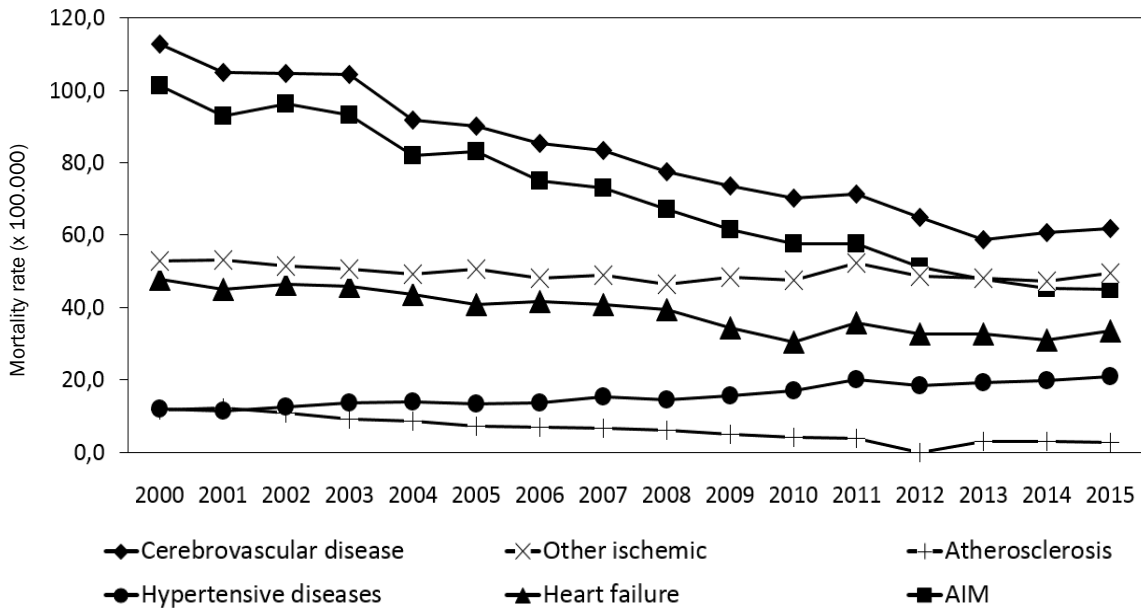


Figure 16. Mortality rate standardized by age of the different disease subgroups in men aged ≥ 50.

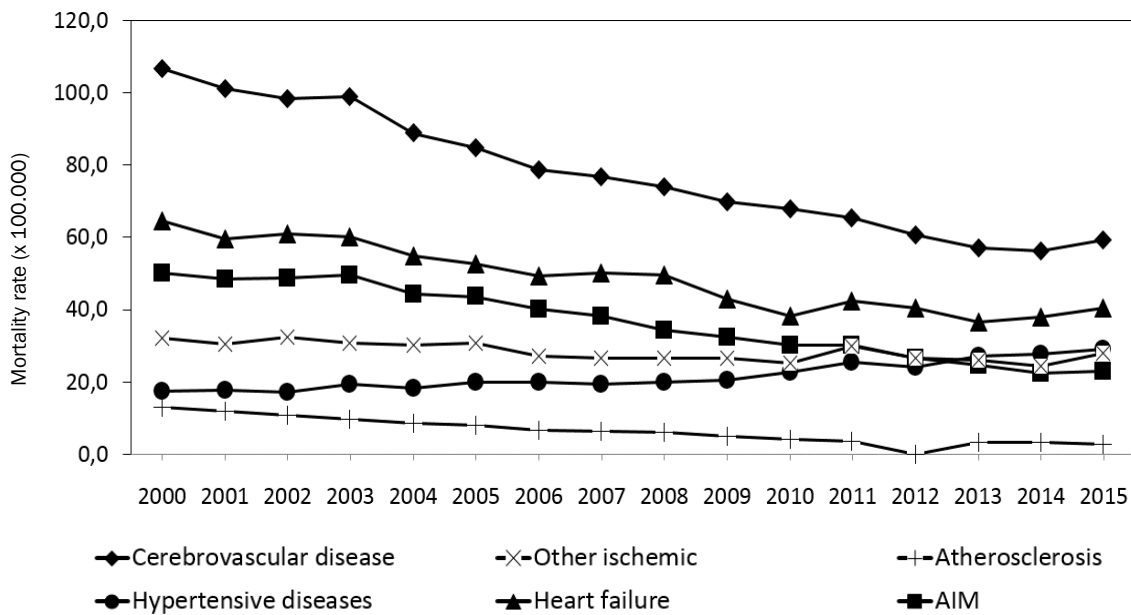


Figure 17. Mortality rate standardized by age of the different disease subgroups in women aged ≥ 50.

Table 11 shows the standardized mortality rate by age of 2000 and 2015, by sex, along with the corresponding percentage change for this period.

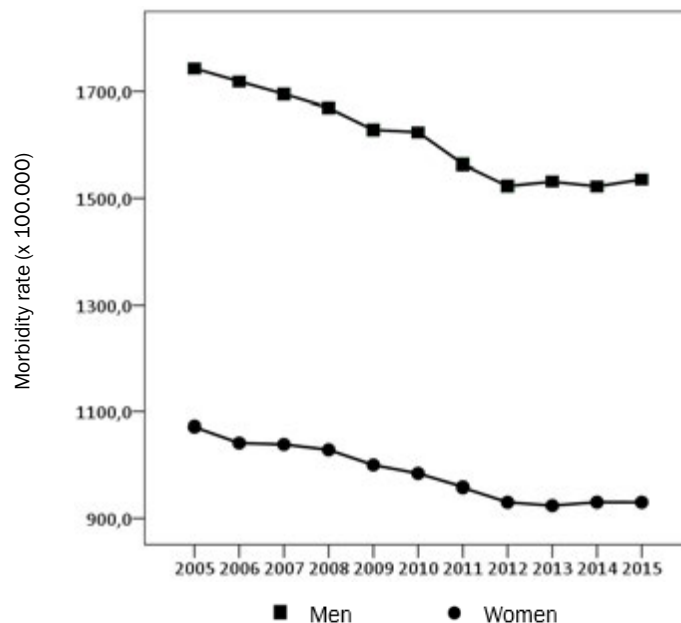
**Table 11:** Comparison of mortality rate standardized by age of the cardiovascular diseases analysed between 2000 and 2015.

| Disease                  | Men   |      | Women |      | Difference  |
|--------------------------|-------|------|-------|------|-------------|
|                          | 2000  | 2015 | 2000  | 2015 |             |
| Hypertensive diseases    | 11,8  | 20,9 | 17,3  | 28,9 | +77% i +67% |
| AMI                      | 101,4 | 44,9 | 50,0  | 23,0 | -56% i -54% |
| Other ischemic diseases  | 52,8  | 49,3 | 32,0  | 27,9 | -7% i -13%  |
| Heart failure            | 47,8  | 33,4 | 64,5  | 40,3 | -30% i -38% |
| Cerebrovascular diseases | 112,7 | 61,9 | 106,6 | 59,2 | -45% i -44% |
| Atherosclerosis          | 11,6  | 2,6  | 12,9  | 2,6  | -78% i -80% |

Hypertensive diseases are the only ones where mortality values have significantly increased over time (Regression:  $\beta=0.63$  in men and  $\beta=0.76$  in women;  $p < 0.001$ ). With regard to IHD, a decrease was observed, more pronounced for AMI (Regression:  $\beta=-4.0$  in men and  $\beta=-2.07$  in women;  $p < 0.001$ ). The same descending pattern occurs for heart failure (Regression:  $\beta=-1.17$  in men and  $\beta=-1.86$  in women;  $p < 0.001$ ), cerebrovascular diseases (Regression:  $\beta=-3.64$  in men and  $\beta=-3.47$  in women;  $p < 0.001$ ) and atherosclerosis (Regression:  $\beta=-0.70$  in men and  $\beta=-0.73$  in women;  $p < 0.001$ ).

The decrease in total cardiovascular mortality is mainly due to an average annual decrease of 5% in AMI mortality. There has also been a 3.7% decrease in cerebrovascular mortality in the same study period. Therefore, the risk of dying from a CVD is declining in Spain.

The evolution of hospital morbidity rate standardized by age in individuals aged  $\geq 50$  analysed from 2005 onwards remains constant, with a slight non-significant decrease ( $p=0.320$ ) observed for both sexes (Figure 18). In men, it went from 1,743.6 hospitalizations per 100,000 inhabitants in 2005 to 1,535.8 in 2015 (12% decrease). In women, the rates went from 1,071.8 hospitalizations per 100,000 inhabitants in 2005 to 930 hospitalizations in 2015 (13% decrease).



**Figure 18.** Hospital morbidity rate standardized by age, by sex, in individuals aged  $\geq 50$ .

Men and women temporary trend for the rest of diseases analysed, by sex, during the same period is presented in figures 19 and 20.

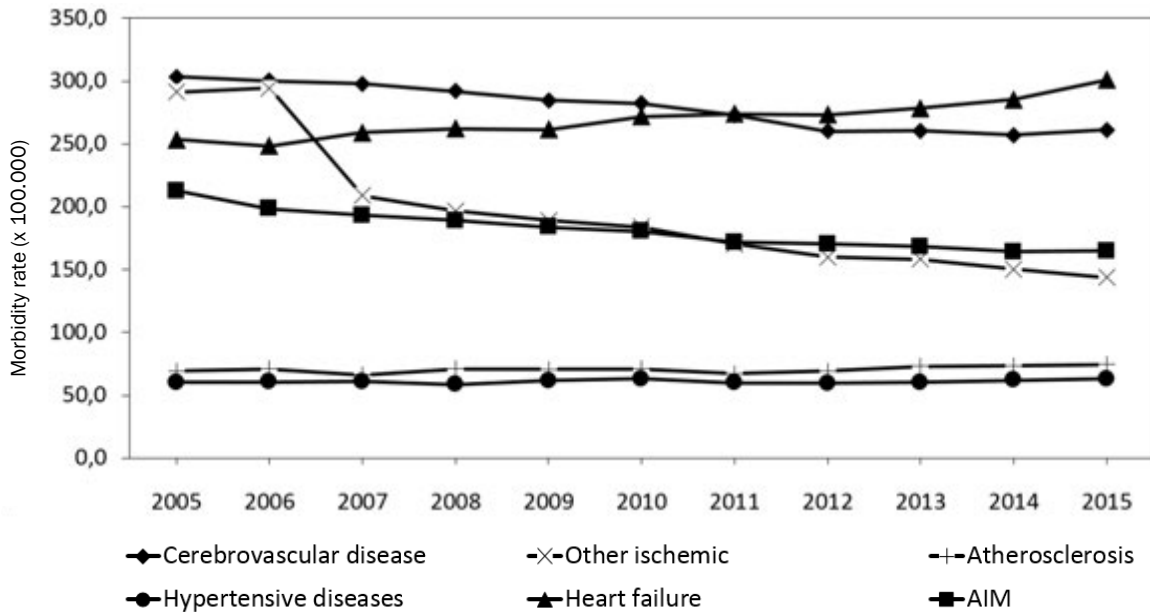


Figure 19. Hospital morbidity rate standardized by age of the different disease subgroups in men aged ≥ 50.

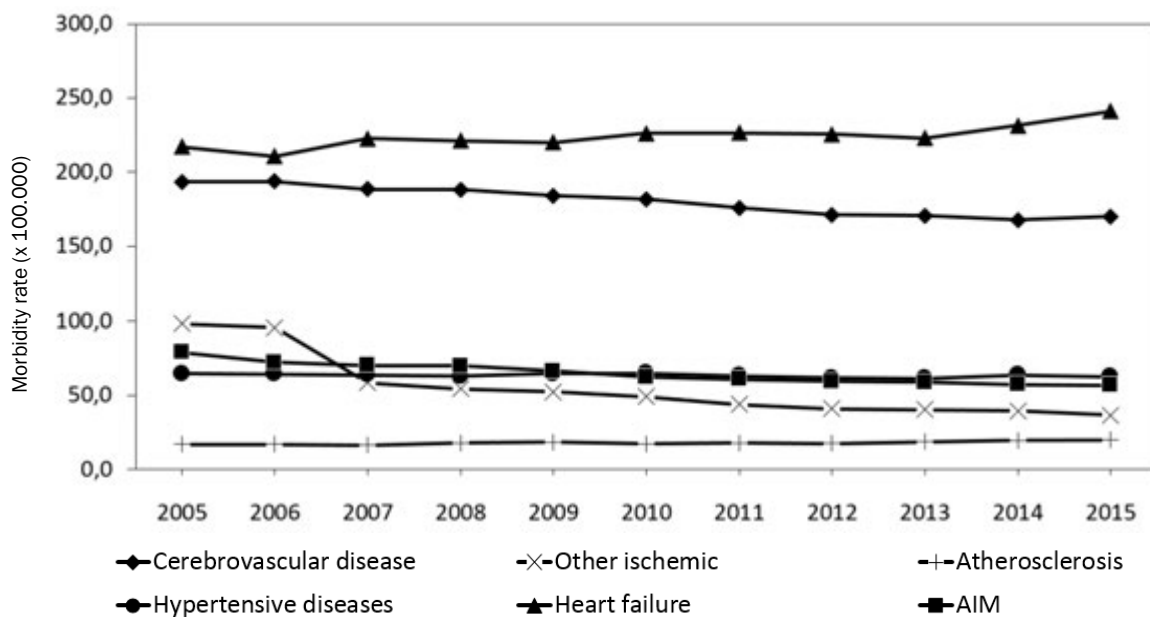


Figure 20. Hospital morbidity rate standardized by age of the different disease subgroups in women aged ≥ 50.

The hospital morbidity rate standardized by age for heart failure shows a significant increased in both sexes (Regression:  $\beta=4.35$  in men and  $\beta=1.98$  in women;  $p < 0.001$ ). In contrast, the hospital morbidity rate for IHD decreases significantly (Regression: AIM  $\beta=-4.55$  in men and  $\beta=-2.10$  in women, Other ischemic  $\beta=-14.16$  in men and  $\beta=-5.67$  in women;  $p < 0.001$ ), highlighting the decrease in the group of other ischemic heart diseases between



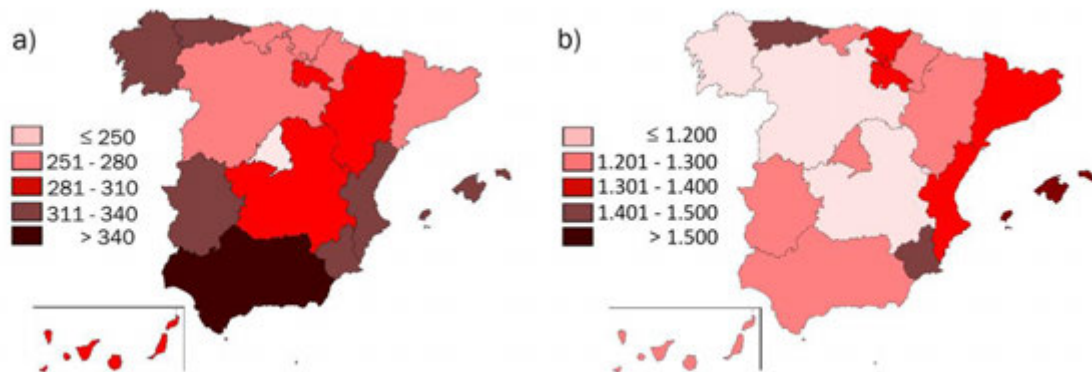
2006 and 2007. Hospital morbidity rate for cerebrovascular diseases also recorded a significant decrease (Regression:  $\beta=-5.18$  in men and  $\beta=-2.88$  in women;  $p < 0.001$ ). The rest of the diseases analysed remained stable during the period analysed (Table 12).

**Table 12:** Comparison of hospital morbidity rate standardized by age of the cardiovascular diseases analysed between 2005 and 2015.

| Disease                  | Men   |       | Women |       | Differences |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
|                          | 2005  | 2015  | 2005  | 2015  |             |
| Hypertensive diseases    | 60,3  | 63,1  | 64,5  | 62,6  | +5% i -3%   |
| AMI                      | 212,8 | 164,8 | 79,1  | 56,9  | -23% i -28% |
| Other ischemic diseases  | 291,2 | 143,7 | 98,4  | 36,5  | -51% i -63% |
| Heart failure            | 253,4 | 301,1 | 217,2 | 241   | +19% i +11% |
| Cerebrovascular diseases | 303,3 | 261,3 | 193,3 | 169,9 | -14% i -12% |
| Atherosclerosis          | 69,3  | 74,6  | 16,8  | 19,8  | +8% i +18%  |

### Geographical differences: comparison between autonomous communities

Considering only the group of individuals aged  $\geq 50$ , the CVD averages of mortality and morbidity rates standardized by age in both sexes for the period 2000-2015, show significant differences between autonomous communities (Figure 21a and b).



**Figure 21.** Mortality rates (a) and hospital morbidity (b) standardized by age of cardiovascular disease (CVD), in individuals aged  $\geq 50$ , for both sexes, and autonomous communities

The autonomous community with the highest CVD mortality rate was Andalusia, with an average of 374 deaths per 100,000 inhabitants, followed by Ceuta and Melilla with 369.1 deaths. The mortality rates in the rest of the autonomous communities ranged between 333.4 and 242.6 deaths per 100,000 inhabitants, Madrid was the community with the lowest average of deaths. In all regions, CVD mortality was higher in men. Regarding the hospital morbidity rate, the autonomous community with the highest number of hospitalizations was Balearic Islands with an average of 1,502.7 hospitalizations per 100,000 inhabitants. In the rest of autonomous communities, the morbidity rate varied between 1.468,8 and 1.076,3 hospitalizations per 100,000 inhabitants. Castile-La Mancha was the community with the lowest CVD morbidity.

Tables 13 and 14 shows the autonomous communities distribution depending on whether it is above or below the Spanish average mortality rate (258 per 100,000 inhabitants) and hospital morbidity rate (1,200 per 100,000 inhabitants) standardized by age in individuals aged  $\geq 50$  for CVD in 2015.

**Table 13:** Mortality rates of CVD standardized by age in individuals aged  $\geq 50$  per autonomous communities in 2015.

| <i>Above the Spanish average</i> |       | <i>Below the Spanish average</i> |       |
|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| Andalusia                        | 317,4 | Galicia                          | 256,5 |
| Asturias                         | 300,0 | Castile-La Mancha                | 248,8 |
| Ceuta and Melilla                | 282,5 | Castile and Leon                 | 245,3 |
| Extremadura                      | 278,3 | Cantabria                        | 240,9 |
| Aragon                           | 278,1 | Canary Islands                   | 239,6 |
| Valencia                         | 273,5 | Catalonia                        | 237,6 |
| Murcia                           | 266,8 | Basque Country                   | 224,0 |
| Balearic Islands                 | 265,9 | Navarre                          | 219,6 |
| La Rioja                         | 260,0 | Madrid                           | 204,5 |

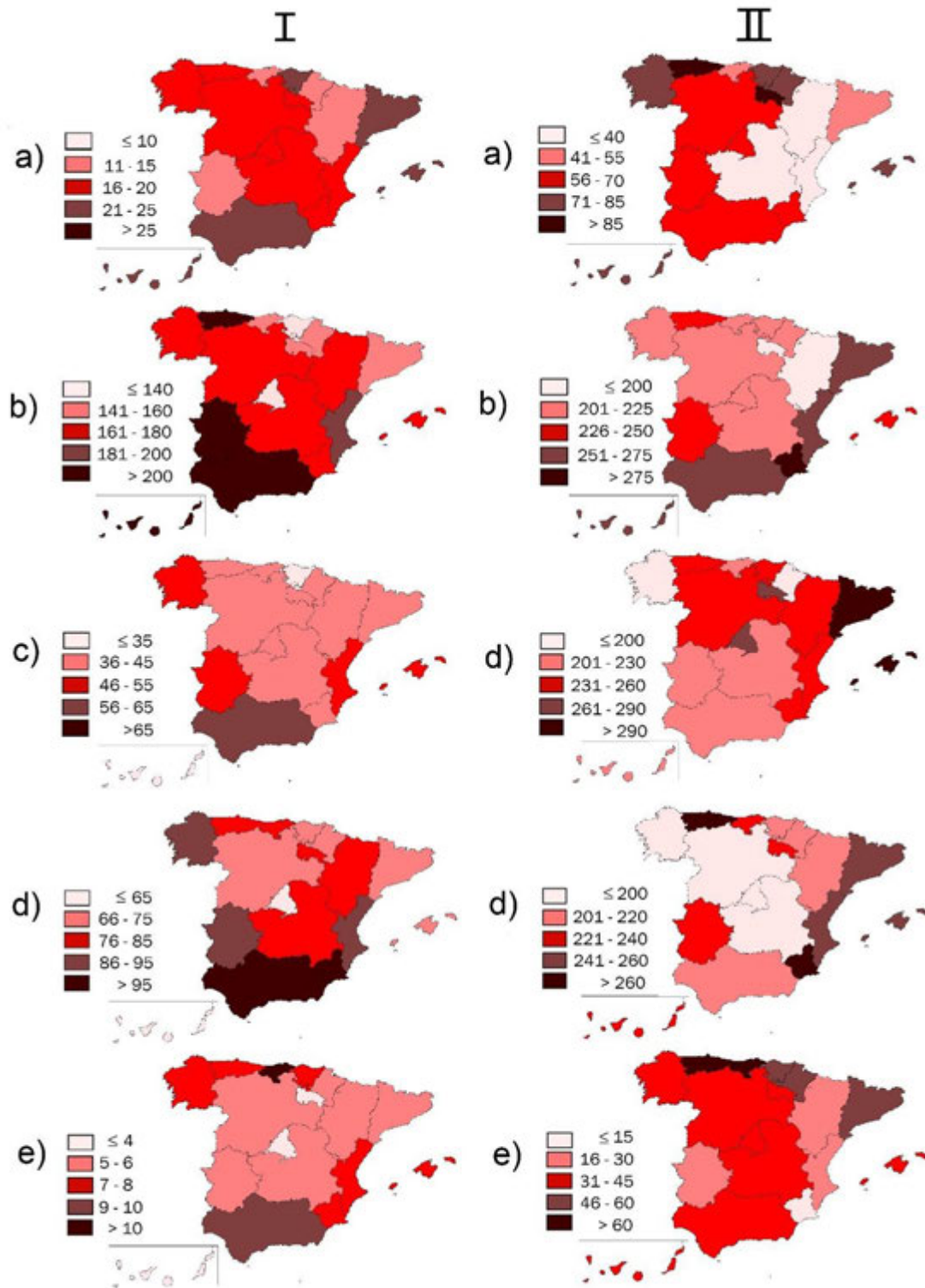
<sup>1</sup> Spanish average = 258 per 100,000 inhabitants

**Table 14:** Hospital morbidity rates of CVD standardized by age in individuals aged  $\geq 50$  per autonomous communities in 2015.

| <i>Above the Spanish average</i> |         | <i>Below the Spanish average</i> |         |
|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| Balearic Islands                 | 1,370.1 | Aragon                           | 1,189.1 |
| Catalonia                        | 1,364.7 | Navarre                          | 1,180.1 |
| Murcia                           | 1,351.8 | Cantabria                        | 1,152.6 |
| Asturias                         | 1,334.3 | Andalusia                        | 1,125.6 |
| La Rioja                         | 1,326.8 | Canary Islands                   | 1,118.8 |
| Valencia                         | 1,248.8 | Galicia                          | 1,074.2 |
| Madrid                           | 1,222.4 | Castile and Leon                 | 1,073.5 |
| Basque Country                   | 1,219.3 | Castile-La Mancha                | 1,037.8 |
| Extremadura                      | 1,214.0 | Ceuta and Melilla                | 969.0   |

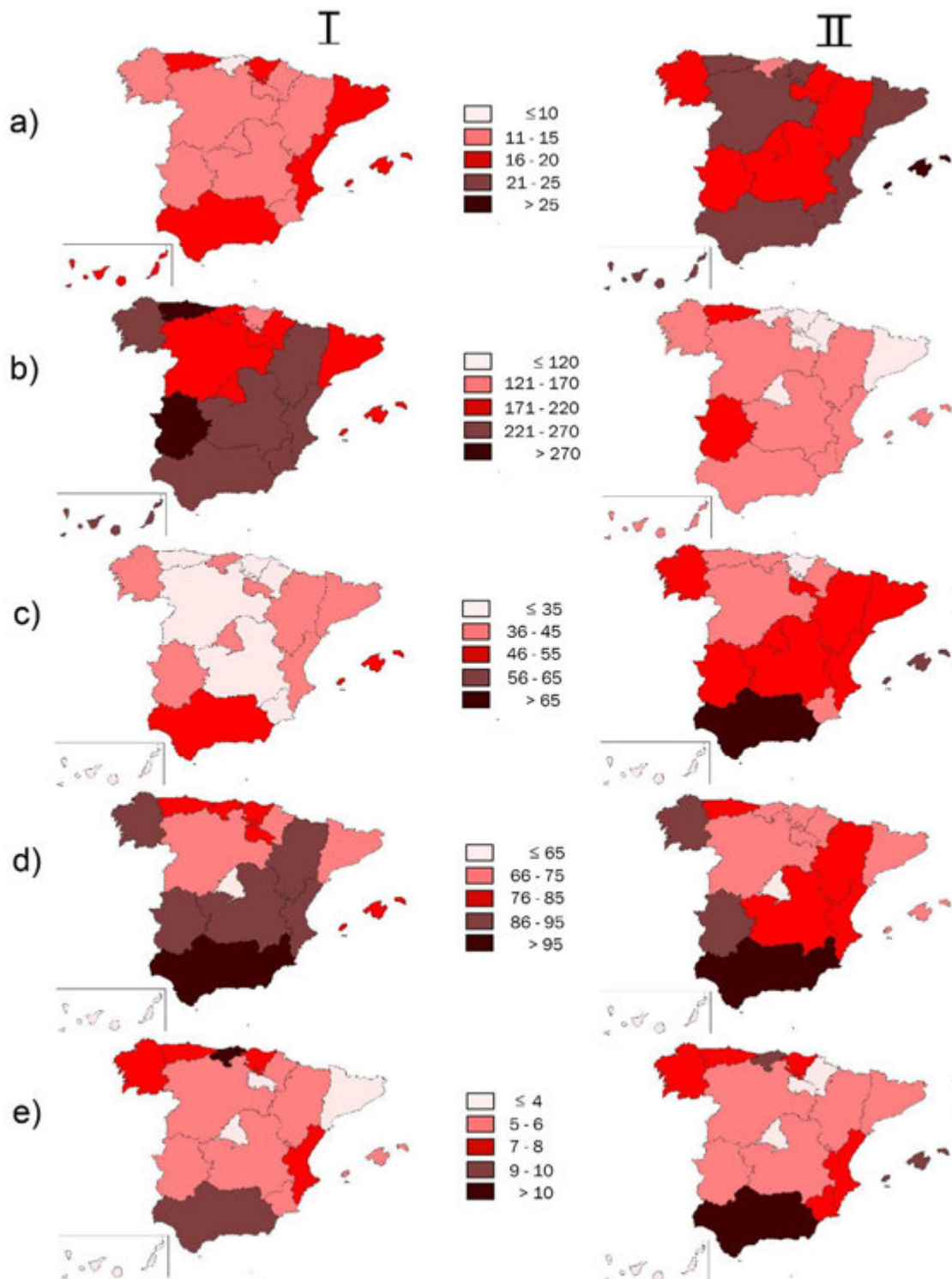
<sup>1</sup> Spanish average = 1,200 per 100,000 inhabitants

Figure 22 shows the mortality and hospital morbidity rates standardized by age for the rest disease subgroups analysed, in individuals aged  $\geq 50$ , for both sexes, and autonomous community.



**Figure 22.** Mortality (I) and hospital morbidity (II) rates standardized by age in individuals aged  $\geq 50$  years, for both sexes, and autonomous communities: a) hypertensive disease; b) ischemic heart disease; c) heart failure; d) cerebrovascular disease and e) atherosclerosis.

Figure 23 shows the Spanish territorial differences of cardiovascular mortality according to sex. The data for the different disease subgroups is not uniform and coincide with the previous results that took into account age and sex.



**Figure 23.** Mortality rate for men (I) and women (II) aged  $\geq 50$ , by autonomous community: a) hypertensive disease; b) ischemic heart disease; c) heart failure; d) cerebrovascular disease and e) atherosclerosis.

For the men and women in the group aged  $\geq 50$  and for all the autonomous communities we observed differences for all the disease subgroups analysed (Figure 23).

### 3.1.3. DISCUSSION

INE data on the number of CVD deaths and hospitalizations show that in recent years, mortality has been reduced and growth of cardiovascular morbidity has been stalled (rates standardized by age). These advances are due to the improvement in prevention, diagnosis, and treatment of CVDs (Mensah et al. 2017). However, these diseases continue to be the leading cause of death and hospitalizations in Spain due mainly to the increase in the elderly population and to a greater prevalence of cardiovascular risk factors (Cinza Sanjurjo et al. 2017; Ruiz-García et al. 2018).

Within the group of circulatory diseases, IHD and cerebrovascular diseases are the first and second cause of mortality. In third place comes heart failure. However, often the demographic impact of mortality due to heart failure can be underestimated because it usually manifests after other conditions such as a IHD or hypertension have damaged or weakened the heart, and therefore those are recorded as the main cause of death (Savarese and Lund 2017). On the contrary, heart failure was the disease with the highest number of registered hospitalizations. The improvement of treatments and lifestyle have led to an increase in survival rates in Spain, which supports the significant reduction in CHD mortality rates observed in our results, and hence, has led to the increase in problems related to heart failure in the most advanced ages (Segovia 2013).

The differences between the age and sex variables regarding the number of deaths and hospitalizations due to CVD reported correspond to those obtained in previous studies (Mosca et al. 2011). Cardiovascular risk is higher in men (Bots et al. 2017) and it increases with age (especially after age 50) (Gransbo et al. 2016), when the number of women in the population is higher. This explains why the absolute number of deaths from CVD is higher in women, and why the CVD mortality and morbidity rates standardized by age are significantly higher in men. The analysis carried out to evaluate these differences in the various subgroups of cardiovascular diseases was also significant. Mortality rates from hypertensive diseases and heart failure were higher in women, while IHD was higher in men. However, differences were not observed for cerebrovascular diseases and atherosclerosis. Similar reasons to the previous ones explain why the absolute number of deaths due to cerebrovascular disease is greater in women than in men (Wilson 2013). Women have a lower coronary risk than men and, therefore, are more likely to reach advanced ages where mortality from stroke is more frequent (George et al. 2015). Results showed that mortality rates for both diseases were higher in men across all age groups, while in women they were only higher from age 75. At the geographical level, the same differences for mortality rates between men and women were also observed in most of the autonomous communities.

Regarding the temporary trend of these diseases, Spain has not been alien to global changes in risk patterns. Although mortality rates for the diseases studied have decreased annually during the period analysed, rates for hypertensive diseases increased slightly, especially since 2009 in both sex. This increase in standardized mortality rates by age is consistent with the data analysed in various European countries (Tao et al. 2015) and the

United States (Kung and Xu 2015), and may be a consequence of an increase in the prevalence of diabetes and obesity, which could increase blood pressure levels (Mensah et al. 2017). On the other hand, morbidity rates from these diseases remained unchanged between 2005 and 2015, with the exception of IHD and cerebrovascular disease rates that correspond to a decrease in age-adjusted prevalence of these diseases in both sexes in Spain (Wilkins et al. 2017). These results meet the predictions of other studies that had observed a decrease in the hospital morbidity rates from AMI since 2003 and cerebrovascular diseases since 2006 (Krumholz et al. 2014; López-Messa et al. 2018). By contrast, between 2005 and 2015 an increase in hospital morbidity rate of heart failure is also observed, mainly attributed to the aging of the population. That is, the reduction of IHD mortality could prolong the survival, and therefore, increase the affectations that as the heart failure, increases exponentially with the more advanced ages (Savarese et al. 2017).

At a geographical level, it should be noted that there is an interregional variability of both mortality and morbidity data among the different autonomous communities for all the diseases analysed. The geographic distribution of CVD mortality seems to follow a decreasing gradient from south to north (Boix Martínez et al. 2003), except for Galicia and Asturias. These autonomous communities had mortality rates standardized by age much higher at the beginning of the period than at the end, and this is reflected in the average. The reasons that explain this geographic pattern are not exactly known. Situations like the one in the Canary Islands also stand out, showing one of the highest mortality rates for IHD. However, its rate for cerebrovascular diseases is relatively low. Other authors point out that among the most influential factors are the changes in the living conditions and sociocultural habits, such as diet and socioeconomic inequalities (Graciani et al. 2013). Specifically, the latest data from the *Estudio de nutrición y riesgo cardiovascular en España* (ENRICA) study stresses an inverse educational gradient in some of the main risk factors (Pérez-Hernández et al. 2017). Regarding the geographical distribution of hospital morbidity rates, the differences between autonomous communities in population size and age structure, and the variation in the efficacy of CVD detection and diagnosis, could explain some of the differences observed nationally (Wilkins et al. 2017).

The results obtained in this study are according to previously reported trends in men and women when compared to other European countries (Naghavi et al. 2017). However, between the regions of Western and Eastern Europe, and even within Spain, these results may vary due to different mortality trends between countries, age groups and sex (Hartley et al. 2016). Statistical databases from population census, deaths according to cause of death and hospital surveys by age group, sex and year, provide valuable information for epidemiology and public health. Nonetheless, the need to take evidence-based decisions has prompted this information to be expanded with evidence from genetic research to prevent and treat CVDs more accurately (Leopold and Loscalzo 2018).

Although the data obtained allow a correct estimate of mortality statistics and the hospital load of CVDs, some limitations must be considered. Firstly, lack of availability of some data, mainly in the results from hospital morbidity surveys by autonomous communities, which limited the evaluation of morbidity rates according to diagnosis, age groups, sex and autonomous community. Secondly, the use of different versions of the ICD-10 and ICD-9-CM codes for mortality and morbidity data, which results in the diagnosis data not being always strictly comparable. Thirdly, the interpretation of results of each

autonomous community with available data must be considered, as it may vary in terms of coverage and quality of the data collected.

Finally, although CVD mortality rates have shown to have decreased considerably in recent years for both sexes, the data obtained shows that the absolute value of deaths from these diseases, especially CHD and cerebrovascular diseases, has continued to increase in Spain between 2000 to 2015. Also, significant differences in terms of age, sex and region still exist regarding mortality and hospital morbidity rates.

## 3.2 Capítol 2

Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: a case-control study in Castile and Leon (Spain) population





This chapter represents material and methods, results and discussion presented in the publication (Annex II):

*Umbria M, Ramos A, Caner J, Vega T, Lozano JE, Santos C, Aluja MP. 2019. Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: a case-control study in Castile and Leon (Spain) population. Mitochondrion. 44:1-6.*

### 3.2.1. MATERIAL AND METHODS

#### Sample collection and DNA extraction

A case-control study was carried out using samples taken from the Cardiovascular Disease Risk Study of Castile and Leon (Vega Alonso et al. 2007) in a cross-sectional, observational and descriptive study performed in Castile and Leon (centre-north region of Spain). A random sample from general population underwent a health examination in relation with cardiovascular risk factors in 2004. These individuals were followed up with the same methodology in 2009 and 2014. Sampling was performed following Helsinki protocol after informed consent. Blood samples were placed in the National DNA Bank (University of Salamanca: [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)) where DNA extraction was carried out using an automated process on a robot Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, MN).

For each individual, information about age (categories  $\leq 44$ , [45-49], [50-54], [55-59], [60-64],  $\geq 65$  years), gender, geographic origin (North, Central and South regions of Castile and Leon), history of hypertension ( $\geq 140/90$  mmHg), history of diabetes, history of hypercholesterolemia ( $>200$  mg/dl), cigarette consumption (smokers, former smokers and non-smokers), presence of overweight or obesity (body mass index  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), presence of high abdominal perimeter in risk range (risk:  $\geq 80$  cm for women and  $\geq 94$  cm for men) and presence of high levels of triglycerides ( $\geq 170$  mg/dl) was obtained from the databases of original study (Vega Alonso et al. 2007).

Cases included in the present study had a clinical history of CVD: 211 individuals presented a history of MI and 154 individuals of stroke. Two hundred eleven and 154 controls without history of MI and stroke respectively were selected and matched with cases taking into account age, gender and geographic origin.

#### MtDNA amplification and sequencing

MtDNA haplogroup was defined according to the control region sequence and coding region polymorphisms. For each sample, the control region of the mtDNA was amplified between positions 15907 and 580 using primers L15907: 5'-ATACACCAGTCTTGTAACC-3'

(Santos et al. 2005) and H580: 5'-TTGAGGAGGTAAGCTACATA-3' (Heyer et al. 2001). Polymerase chain reaction (PCR) was performed according to conditions described by Santos et al., 2005.

Control region PCR products were purified using ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, California) and sequenced using two forward (L15907; L16485: 5'-GAACTGTATCCGACATCTGG-3') (Santos et al. 2005) and two reverse primers (H1\_8: 5'-GGTTAATAGGGTGATAGACC-3'; H2\_288: 5'-GGGGTTTGGTGGAAATTTT-3') (Santos et al. 2005). Sequence reactions were carried out using Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's specifications. Purification of DNA sequencing reactions were performed with BigDye XTerminator® Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and sequences were run in an ABI 3730xl sequencer (Servei de Genòmica, Universitat Autònoma de Barcelona).

Coding region phylogenetic mtDNA informative polymorphisms 7028, 11719, 12308, 12705, 13708 and 14766 were further analysed as previously detailed by Santos et al. (2004).

## Data Analysis

Sequences were aligned in relation to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) (Andrews et al. 1999) using the SeqScape 2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, USA). Haplogroup assignment was performed according to the nomenclature summarized by van Oven and Kayser - Phylotree build 17 (van Oven and Kayser 2009) using Haplogrep software (Kloss-Brandstatter et al. 2011).

The mtDNA sequences obtained were grouped in four phylogenetically related clusters according to their evolutionary proximity: R0a'b, non-R, JT and UK. Based on the results obtained, groups were split to look for the effect of particular haplogroups.

McNemar's test or marginal homogeneity test was used to compare the frequency of CV risk factors (cigarette consumption, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, abdominal perimeter and triglycerides) between MI and stroke cases and controls.

Frequencies of all mtDNA haplogroup clusters in MI and stroke cases and controls were compared using McNemar's test. To adjust the association analysis for the potential confounding effect of CV risk factors, a conditional logistic regression was applied. Each haplogroup was compared to the remaining haplogroups pooled in to a single group. Odds Ratios (OR) and their 95% Confidence Intervals (CI) were calculated adjusting for the effect of risk factors.

In order to analyze if conventional CV risk factors (hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, abdominal perimeter and levels of triglycerides) were associated with mtDNA haplogroups, a logistic regression was applied. In these analyses, only data from the 365 individuals that belong to the control group (that is, individuals without history of MI or stroke) were considered.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS ver. 22.0 (SPSS Inc.). All differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 3.2.2. RESULTS

#### Association between mtDNA haplogroups and MI

A summary of the sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of MI cases and controls subjects is shown in Table 15. Hypertension and hypercholesterolemia were significantly higher in MI cases than in controls [(hypertension: 90.5% vs. 69.2%, respectively;  $p < 0.001$ , McNemar's test) and (hypercholesterolemia: 71.5% vs. 47.4%, respectively;  $p < 0.001$ , McNemar's test)] (Table 15). The frequency of individuals with diabetes, overweight or obesity, abdominal perimeter in risk range, and high triglycerides, was similar in MI cases and controls.

Detailed mtDNA results of MI cases and controls are reported in Table II.1.1. of Annex 1 and the frequencies of mtDNA clusters are showed in Table 16. Significant differences were found in the distribution of mtDNA macrohaplogroups between MI cases and controls (Table 14). Cluster R0a'b was more frequent in MI cases (60.7%), differing significantly from controls (50.7%) ( $p = 0.050$ , McNemar's test). After correction for the effect of CV risk factors with significant differences between MI cases and controls (hypertension and hypercholesterolemia), association remained significant for R0a'b (conditional logistic regression:  $p = 0.050$ ; OR= 1.550, 95% CI [1.001-2.399]). For looking the particular haplogroup responsible of the association, a subdivision of the R0a'b cluster was performed (Table 15). In this case, haplogroup H was significantly overrepresented in MI cases (50.7%) when compared to controls (36.5%) ( $p = 0.002$ , McNemar's test). When corrected for the effect of CV risk factors for MI, significant association were still observed in haplogroup H (conditional logistic regression:  $p = 0.002$ ; OR= 2.379, 95% CI [1.440-3.990]), emerging as a possible genetic risk factor for MI (Table 17).

**Table 15:** Sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of myocardial infarction (MI) and stroke cases and controls.

|   | Controls<br>n=211(%)     | Patients with MI<br>n=211(%) | P-value <sup>1</sup> | Controls<br>n=154 (%)   | Patients with<br>Stroke<br>n=154(%) | P-value <sup>2</sup> |
|---|--------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Age (years)                                   |                          |                              |                      |                         |                                     |                      |
| ≤44   | 4 (1.9)                  | 6 (2.8)                      |                      | 0 (0)                   | 1 (0.6)                             |                      |
| 45-49   | 11 (5.2)                 | 8 (3.8)                      |                      | 3 (1.9)                 | 3 (1.9)                             |                      |
| 50-54   | 5 (2.4)                  | 7 (3.3)                      | Matched              | 2 (1.3)                 | 4 (2.6)                             | Matched              |
| 55-59   | 13 (6.2)                 | 12 (5.7)                     |                      | 10 (6.5)                | 6 (3.9)                             |                      |
| 60-64   | 20 (9.5)                 | 24 (11.4)                    |                      | 10 (6.5)                | 14 (9.1)                            |                      |
| ≥65   | 158 (74.9)               | 154 (73.0)                   |                      | 129 (83.8)              | 126 (81.8)                          |                      |
| Male/Female                                   | 128 (60.7)/<br>83 (39.3) | 128 (60.7)/<br>83 (39.3)     | Matched              | 91 (59.1)/<br>63 (40.9) | 91 (59.1)/<br>63 (40.9)             | Matched              |
| Geographic origin                             |                          |                              |                      |                         |                                     |                      |
| North   | 54 (25.6)                | 54 (25.6)                    |                      | 40 (26.0)               | 40 (26.0)                           |                      |
| Central                                       | 88 (41.7)                | 88 (41.7)                    | Matched              | 75 (48.7)               | 75 (48.7)                           | Matched              |
| South   | 69 (32.7)                | 69 (32.7)                    |                      | 39 (25.3)               | 39 (25.3)                           |                      |
| Cigarette consumption                         |                          |                              |                      |                         |                                     |                      |
| Non-smoking                                   | 121 (57.3)               | 105 (49.8)                   |                      | 95 (61.7)               | 86 (55.8)                           |                      |
| Former smoker                                 | 57 (27)                  | 82 (38.9)                    | 0.566                | 41 (26.6)               | 52 (33.8)                           | 0.448                |
| Smoker  | 33 (15.6)                | 24 (11.4)                    |                      | 18 (11.7)               | 16 (10.4)                           |                      |
| Hypertension (≥140/90 mmHg)                   | 146 (69.2)               | 191 (90.5)                   | <0.001               | 120 (77.9)              | 134 (87)                            | 0.055                |
| Diabetes                                      | 40 (19)                  | 54 (25.6)                    | 0.099                | 22 (14.3)               | 32 (20.8)                           | 0.144                |
| Hypercholesterolemia (>200mg/dl)              | 100 (47.4)               | 151 (71.6)                   | <0.001               | 64 (41.6)               | 92 (59.7)                           | 0.002                |
| Overweight or obesity (≥25kg/m <sup>2</sup> ) | 162 (76.8)               | 158 (74.9)                   | 0.734                | 118 (76.6)              | 103 (66.9)                          | 0.092                |
| High abdominal perimeter (>80 or >94 cm)      | 163 (77.3)               | 159 (75.4)                   | 0.731                | 120 (77.9)              | 108 (70.1)                          | 0.169                |
| Triglycerides (≥170mg/dl)                     | 28 (13.3)                | 27 (12.8)                    | 1.000                | 14 (9.1)                | 15 (9.7)                            | 1.000                |

**Notes:** MI: Myocardial Infarction

<sup>1</sup> P-value of McNemar or marginal homogeneity test used to compare controls and MI.

<sup>2</sup> P-value of McNemar or marginal homogeneity test used to compare controls and stroke.

P-value of paired McNemar test for dichotomous variables samples and Marginal Homogeneity test when a category of the samples is more than two.

**Table 16:** Major mtDNA macrohaplogroups frequencies (%) in myocardial infarction cases and in control group.

| <b>MYOCARDIAL INFARCTION</b> |                                  |              |                       |  |                     |
|------------------------------|----------------------------------|--------------|-----------------------|--|---------------------|
| <b>Haplogroup clusters</b>   | <b>Number of individuals (%)</b> |              | <b>McNemar's test</b> | <b>Conditional Logistic Regression<sup>2</sup></b> |                     |
|                              | <b>Controls</b>                  | <b>Cases</b> | <b>P-value</b>        | <b>P-value</b>                                     | <b>OR [95% CI]</b>  |
| <i>ROa'b</i>                 | 107 (50.7)                       | 128 (60.7)   | 0.050                 | 0.050  | 1.550 [1.001-2.399] |
| <i>Non-R<sup>1</sup></i>     | 19 (9.0)                         | 11 (5.2)     | 0.201                 | 0.235  | 0.597 [0.255-1.399] |
| <i>JT</i>                    | 41 (19.4)                        | 33 (15.6)    | 0.322                 | 0.748  | 0.902 [0.481-1.690] |
| <i>UK</i>                    | 44 (20.9)                        | 39 (18.5)    | 0.575                 | 0.600  | 0.628 [0.322-1.119] |
| <b>Total</b>                 | <b>211</b>                       | <b>211</b>   |                       |  |                     |

<sup>1</sup> Non-R including (L\*, M\* and N\*)

<sup>2</sup> Conditional logistic regression model was performed considering significant covariates for myocardial infarction (hypertension, hypercholesterolemia and pooled haplogroups).

**Table 17:** Subdivision of mtDNA haplogroup ROa'b frequencies (%) in myocardial infarction cases and in control group.

| <b>MYOCARDIAL INFARCTION</b> |                                  |              |                       |  |                     |
|------------------------------|----------------------------------|--------------|-----------------------|--|---------------------|
| <b>Haplogroup</b>            | <b>Number of individuals (%)</b> |              | <b>McNemar's test</b> | <b>Conditional Logistic Regression<sup>3</sup></b> |                     |
|                              | <b>Controls</b>                  | <b>Cases</b> | <b>P-value</b>        | <b>P-value</b>                                     | <b>OR [95% CI]</b>  |
| <i>H</i>                     | 77 (36.5)                        | 107 (50.7)   | 0.002                 | 0.001  | 2.379 [1.440-3.990] |
| <i>HV0</i>                   | 26 (12.3)                        | 20 (9.5)     | 0.440                 | 0.136  | 0.586 [0.290-1.182] |
| <i>ROa'b<sup>1</sup></i>     | 4 (1.9)                          | 1 (0.5)      | 0.375                 | 0.325  | 0.328 [0.036-3.016] |
| <b>Total<sup>2</sup></b>     | <b>211</b>                       | <b>211</b>   |                       |  |                     |

**Notes:** Data for stroke cases and controls not shown

<sup>1</sup> Haplogroup ROa'b except HV

<sup>2</sup> Total number of controls and cases (ROa'b, Non-R, JT and UK)

<sup>3</sup> Conditional logistic regression model was performed considering significant covariates for myocardial infarction (hypertension, hypercholesterolemia and pooled haplogroups).

### Association between mtDNA haplogroups and stroke

Sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of stroke cases and controls are reported in Table 15. The percentage of individuals with hypercholesterolemia were found to be significantly more frequent in stroke cases than controls (hypercholesterolemia: 59.7% vs. 41.6%, respectively; p=0.002, McNemar's test). The cigarette consumption profile, the frequency of individuals with hypertension, diabetes, overweight or obesity, abdominal perimeter in risk range, and high triglycerides were similar in stroke cases and controls.

MtDNA characterization of stroke cases and controls is available in Table II.1.2. of Annex 1 and the mtDNA cluster frequencies are showed in Table 18. No significant differences between cases and controls were observed for any of the four groups (Table 18).

**Table 18:** Major mtDNA macrohaplogroups frequencies (%) in stroke cases and in control group.

| <i>Haplogroup clusters</i> | <i>STROKE</i>             |           |                |  |                     |
|----------------------------|---------------------------|-----------|----------------|--|---------------------|
|                            | Number of individuals (%) |           | McNemar's test | Conditional Logistic Regression <sup>3</sup> |                     |
|                            | Controls                  | Cases     | P-value        | P-value                                      | OR [95% CI]         |
| <i>ROa'b</i>               | 81 (52.6)                 | 86 (55.8) | 0.635          | 0.630  | 1.126 [0.695-1.825] |
| <i>Non-R</i> <sup>1</sup>  | 16 (10.4)                 | 8 (5.2)   | 0.134          | 0.170  | 0.520 [0.205-1.321] |
| <i>JT</i>                  | 27 (17.5)                 | 27 (17.5) | 1.000          | 0.718  | 1.129 [0.585-2.179] |
| <i>UK</i>                  | 30 (19.5)                 | 33 (21.4) | 0.766          | 0.984  | 1.006 [0.545-1.857] |
| <i>Total</i> <sup>2</sup>  | 154                       | 154       |                |  |                     |

<sup>1</sup> Non-R including (L\*, M\* and N\*)

<sup>2</sup> Conditional logistic regression model was performed considering significant covariates for stroke (hypercholesterolemia and pooled haplogroups).

### Association between mtDNA haplogroups and CV risk factors

Classical risk factors for CVD stratified by mtDNA haplogroups are listed in Table 19. A high percentage of individuals without history of MI or stroke (those that define control group in previous analysis) present high hypertension (72.9%), overweight or obesity (76.7%) and abdominal perimeter in risk range (77.5%), but lower diabetes (17%), hypercholesterolemia (41%) and levels of triglycerides (11.5%) (Table 19).

The JT cluster was significantly more frequent in non-hypertensive individuals (11%) than hypertensive individuals (7.7%) (logistic regression:  $p=0.016$ ; OR: 0.460, 95% CI [0.244-0.868]) (Table 19). When haplogroups J and T were considered separately, haplogroup J presents a high frequency in non-hypertensive individuals (14.1%) compared to hypertensive individuals (6.4%), appearing as a protective factor for developing hypertension (logistic regression:  $p=0.019$ ; OR= 0.348, 95% CI [0.144-0.840]). No significant association between mtDNA haplogroups and the remaining CV risk factors (diabetes, hypercholesterolemia, BMI, abdominal perimeter and levels of triglycerides) was obtained.

**Table 19:** MtDNA haplogroups frequencies (%) stratified by classical risk factors for CVD in control group.

| <i>Haplogroup clusters</i> | <i>Hypertension<sup>a</sup></i> | <i>Diabetes<sup>b</sup></i> | <i>Hypercholesterolemia<sup>c</sup></i> |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---|
|                            | - (%) / + (%)                   | - (%) / + (%)               | - (%) / + (%)                           |
| <i>ROa'b</i>               | 49 (13.4) / 139 (38.1)          | 157 (43) / 31 (8.5)         | 93 (25.5) / 95 (26)                     |
| <i>Non-R<sup>1</sup></i>   | 10 (2.7) / 25 (6.8)             | 29 (7.9) / 6 (1.6)          | 24 (6.6) / 11 (3)                       |
| <i>JT</i>                  | 28 (7.7) / 40 (11) <sup>2</sup> | 53 (14.5) / 15 (4.1)        | 42 (11.5) / 26 (7.1)                    |
| <i>UK</i>                  | 12 (3.3) / 62 (17)              | 64 (17.5) / 10 (2.7)        | 42 (11.5) / 32 (8.8)                    |
| <i>Total</i>               | 99 (27.1) / 266 (72.9)          | 303 (83) / 62 (17)          | 201 (59) / 164 (41)                     |

| <i>Haplogroup clusters</i> | <i>Overweight or Obesity<sup>d</sup></i> | <i>Abdominal Perimeter<sup>e</sup></i> | <i>Triglycerides<sup>f</sup></i> |
|----------------------------|--|--|----------------------------------|
|                            | - (%) / + (%)                            | - (%) / + (%)                          | - (%) / + (%)                    |
| <i>ROa'b</i>               | 54 (14.8) / 134 (36.7)                   | 35 (9.6) / 153 (41.9)                  | 165 (45.2) / 23 (6.3)            |
| <i>Non-R<sup>1</sup></i>   | 6 (1.6) / 29 (7.9)                       | 13 (3.6) / 22 (6)                      | 32 (8.8) / 3 (0.8)               |
| <i>JT</i>                  | 12 (3.3) / 56 (15.3)                     | 18 (4.9) / 50 (13.7)                   | 64 (17.5) / 4 (1.1)              |
| <i>UK</i>                  | 13 (3.6) / 61 (16.7)                     | 16 (4.4) / 58 (15.9)                   | 62 (17) / 12 (3.3)               |
| <i>Total</i>               | 85 (23.3) / 280 (76.7)                   | 82 (22.5) / 283 (77.5)                 | 323 (88.5) / 42 (11.5)           |

**Notes:** Logistic regression model was performed considering significant covariates for a) Hypertension: age, origin, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, high abdominal perimeter and high levels of triglycerides; b) Diabetes: origin, hypertension and hypercholesterolemia; c) Hypercholesterolemia: sex, hypertension and diabetes; d) Overweight or Obesity: age, origin, cigarette consumption, hypertension and high abdominal perimeter; e) High abdominal perimeter: age, sex, origin, hypertension and overweight or obesity, and f) Triglycerides: hypertension.

(-) Number of individuals from a given haplogroups without hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, high abdominal perimeter and high levels of triglycerides.

(+) Number of individuals from a given haplogroups with hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, high abdominal perimeter and high levels of triglycerides.

<sup>1</sup> Non-R including (L\*, M\* and N\*)

<sup>2</sup> Significant association was found between hypertension and the JT cluster (Logistic regression: p=0.016; OR: 0.460, 95% CI [0.244-0.868]). When subdivided haplogroup J and T, significant association was remained between hypertension and haplogroup J (Logistic regression: p=0.019; OR: 0.348, 95% CI [0.144-0.840]).

### 3.2.3. DISCUSSION

In the present study, we designed a case-control study to explore the relationship between mtDNA haplogroups and two of the most common CVDs -MI and stroke- risk in Castile and Leon (Spain) population. This work analysed the mtDNA variation in two CVDs, in the same population and considering the same CV risk factors.

#### Association between mtDNA haplogroups and MI and stroke

The haplogroup distribution in MI and stroke cases was compared to controls and significant differences were found for MI, reporting haplogroup H as a potential genetic risk factor. MtDNA variations affect differently the assembly and stability of the ETC and, therefore, may cause different energetic efficiency between haplogroups. In agreement with



our findings, there are several evidences that consider mtDNA haplogroups as a genetic factor that predispose to, or protect against certain CVDs (Wallace and Chalkia 2013).

The results obtained concerning haplogroup H were consistent with other CVDs-associated studies performed for other Spanish or European populations (Fernández-Caggiano. 2012, 2013; Hagen et al. 2013; Hudson et al. 2014; Palacin et al. 2011; Serrano et al. 2018). Haplogroup H encompasses over 40% of the total mtDNA variation in most of Europe (Wallace 2013a) and it is defined by the variants m.14766T>C (MT-CYB), m.7028T>C (MT-COI) and m.2706G>A (MT-RNR2). Based on the structural analysis, the non-synonymous variant 14766 results in the amino acid substitution Thr7Ile. This change is involved on electron flow and proton pumping, and could leads to an increase on the efficiency of the complex III Q cycle (Beckstead et al. 2009). Accordingly, several studies reported important differences in mitochondrial functions between haplogroup H and the rest of European and African haplogroups (Gómez-Durán et al. 2010; Kenney et al. 2014a, 2014b; Malik et al. 2014). Using cybrid models (cytoplasmic hybrid), it was showed that H cybrids appeared to produce higher levels of ROS compared to J, L and UK cybrids, resulting from the higher oxygen consumption (VO<sub>2</sub>max) of H cybrids (Gómez-Durán et al. 2010; Kenney et al. 2014a, 2014b; Malik et al. 2014). Therefore, individuals belonging to haplogroup H may undergo more oxidative damage in their mitochondria (Marcuello et al. 2009; Martinez-Redondo et al. 2010).

Although cluster ROa'b does not present significant differences between stroke cases and controls, there was a tendency for the increase in the percentage of H in stroke cases (51.3%) when compared to controls (42.9%), indicating that haplogroup H could also act as a risk factor for stroke. In fact, in recent studies, mtDNA haplogroup H1, U and K were associated with onset of stroke in European population (Chinnery et al. 2010; Finnila et al. 2001; Martikainen and Majamaa 2010; Rosa et al. 2008).

### MtDNA haplogroups and cardiovascular risk factors

Our findings showed a beneficial role of haplogroup J against hypertension. In accordance, previous studies have identified that haplogroups T and J are associated with blood pressure in European populations (Nardelli et al. 2013; Rea et al. 2013) and the haplogroups M and D in Asian populations (Zhu et al., 2009). Hypertension is an important contributor to atherosclerotic-related diseases (stroke and MI) and its pathogenesis is associated to endothelial dysfunction and increased oxidative stress (Ivanovic and Tadic 2015). The relationship between enhanced ROS and hypertension is well established in many studies involving diet or endocrine-induced and surgically-induced hypertensive animals (see e.g. Lee and Griendling, 2008). In fact, if mitochondrial dysfunctions caused an inefficient metabolism in skeletal and vascular smooth muscles, these would lead to the elevation of systolic blood pressure and, therefore, would be involved in the development of hypertension (Bernal-Mizrachi et al. 2005). In this sense and in accordance with others (Rea et al. 2013), carriers of mtDNA haplogroup J may have a lower pressure profile which would benefit against hypertension.

Haplogroup J is relatively evenly distributed across all Europe, presenting the highest frequencies in the Northern regions (Ruiz-Pesini et al. 2004). This haplogroup is defined by 9 variants, 3 of them are non-synonymous (m. 15452C>A, m. 13708G>A and m. 10398A>G), leading to amino acid changes in MT-CYB: Leu236Ile; MT-ND5: Ala458Thr and MT-ND3:

Thr114Ala genes, respectively (Pierron et al. 2011). These genes are located in subunits of the complex I and III of the electron transport chain, which are the most important source of the intracellular ROS production (Chen and Zweier 2014; Ott et al. 2007). Consequently, a changes in these genes may mediate lower RNA expression of these complexes, promoting heat production, which is important to adaptation to colder climates by decoupling OXPHOS and lowering ATP and ROS formation (Ruiz-Pesini et al. 2004; Wallace 2013a). The inefficiency of the OXPHOS mitochondrial energy production found in haplogroup J, could confer an important role in protection against oxidative damage, and therefore, against hypertension (Rea et al. 2013).

Although none of the mtDNA haplogroups significantly increased the risk of stroke, a comparison of the data obtained between the MI and stroke groups showed evidence suggestive that haplogroup H acts as a genetic factor of susceptibility for both diseases. Otherwise, our data also suggest a beneficial role of mtDNA haplogroup J against hypertension. These results support the idea that differences in energy efficiency between haplogroups can help to explain the different susceptibilities of some individuals and/or populations toward multifactorial disorders as MI and stroke. In these sense, mtDNA haplogroup variation can provide some guidance for the prediction of genetic risk of these diseases in different human populations.



## 3.3 Capítol 3

The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction



This chapter represents material and methods, results and discussion presented in the under review publication (Annex II):

*Umbria M, Ramos A, Aluja MP, Santos C. The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction. Scientific Reports. Under Review (January 2019). Available in: <https://doi.org/10.1101/382374>*

### 3.3.1. MATERIAL AND METHODS

#### Subjects

In this study, data from the same 154 individuals with stroke history, 211 individuals with MI history and their corresponding control individuals -matched for age, gender and geographic origin-, described in the previous chapter, were used.

#### MtDNA sequence analysis and heteroplasmy authentication

The mtDNA sequences used in the present study were reported in the previous chapter (Table II.1.1.) although they were previously strictly used to classify samples into mtDNA haplogroups. In the present study, sequences were reassessed and analysed at the nucleotide level to identify not only fixed mutations but also mutations in heteroplasmy. The alignment in relation to the to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) (Andrews et al. 1999) and the heteroplasmy detection were performed using the SeqScape 2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, USA) considering a value of 5% in the Mixed Base Identification option. Only sequences with satisfactory peak intensity and without background/noise were considered. In this context, some samples were amplified and sequenced several times (using the same methodology described in previous chapter to obtain accurate sequences to heteroplasmy detection. Moreover, additional analyses were performed in order to authenticate heteroplasmies.

The authentication of mtDNA heteroplasmy was performed following a similar strategy to that used by (Santos et al. (2005); 2008).

- i. PCR amplification and sequencing of the control region of the mtDNA.
- ii. To authenticate the results for samples presenting heteroplasmy in step 1, a second PCR amplification and sequencing were performed.

In addition, to exclude a possible contamination of the samples, an analysis of Short Tandem Repeat (STR) DNA profiling was carried out employing AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) following the manufacturer's protocol.

Thus, point heteroplasmic positions were accepted if they appeared in all the validation steps and no evidence of sample contamination was detected.

Levels of heteroplasmy were determined using the height of peaks in the electropherograms (Santos et al. 2005). To calculate the average heteroplasmic levels, the results obtained for at least two sequence reads of each heteroplasmic position were used.

## Data Analysis

**Statistical analyses.** To compare differences in the CR profile between cases and controls in both stroke and MI, all fixed and heteroplasmic mtDNA mutations were compiled into a matrix considering the cases and controls analysed for each disease.

All fixed mtDNA mutations detected in cases and controls (present in a minimum of 10 individuals) were tested together by using a conditional logistic regression analysis (forward stepwise model), adjusting the association analysis for the potential confounding effect of CV risk factors detected in the previous chapter. Hypercholesterolemia was considered a CV risk factor with a potential confounding effect for stroke, while both hypertension and hypercholesterolemia were considered for MI samples. Therefore, Odds Ratios (ORs) and their 95% Confidence Intervals (CIs) were calculated adjusting for the effect of these risk factors in each disease. To compare the presence or absence of point and length heteroplasmy, a logistic regression analysis was used to correct for the effect of CV risk factors above mentioned.

Finally, the mtDNA mutations were analysed to evaluate if they were in positions defined by haplogroups (examined in the previous chapter), or acts as an independent genetic factor.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS ver. 22.0 (SPSS Inc.). All differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Hits in the phylogeny, population database and Conservation Index (CI).** The stability of fixed mtDNA mutations and point heteroplasmic position were analysed as previously detailed by Ramos et al. (2013). The number of hits in the phylogeny for each position was compiled from the updated mtDNA phylogeny – mit. Tree build 17 (van Oven and Kayser 2009)– and from Soares et al. (2009). From these data, it has been possible to calculate the probability of mutation as the ratio between the observed and the total number of hits. An mtDNA position was considered a hotspot if the mutation probability was ten times higher than the expected mean value. In order to calculate the frequency of each variant for a particular nucleotide position, a database of 3880 mtDNA complete sequences was used. Sequences were aligned using Clustal W and formatted for further frequency analyses using the SPSS software. The nucleotide conservation index (NCI) was estimated only across reference sequences of different primate species (for the list of species and accession numbers see Table III.1.1. of Annex 1). Sequences were analysed using the same method previously mentioned (Ramos et al. 2013).

**Structure prediction.** Secondary structures were performed to understand the structural impact of different variants found. The secondary structures for each position was generated from sequences (A-M) identifies by Pereira et al. (2008). All sequences were submitted to the RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) using default parameters for DNA secondary structures calculations. The minimum free energy prediction and base pair probabilities were used to estimate the implication in the molecule.

### 3.3.2. RESULTS

#### Analysis of fixed and heteroplasmic mtDNA mutations with stroke

A detailed matrix of all mtDNA positions analysed in stroke cases and controls are reported in Table III.1.2. of Annex 1 and the frequencies of fixed mutations found are showed in Table 20.

**Table 20:** Complete results of stroke fixed mtDNA mutation analysed

<sup>1</sup>Conditional regression model was performed considering significant covariates for stroke (hypercholesterolemia and mtDNA mutations)

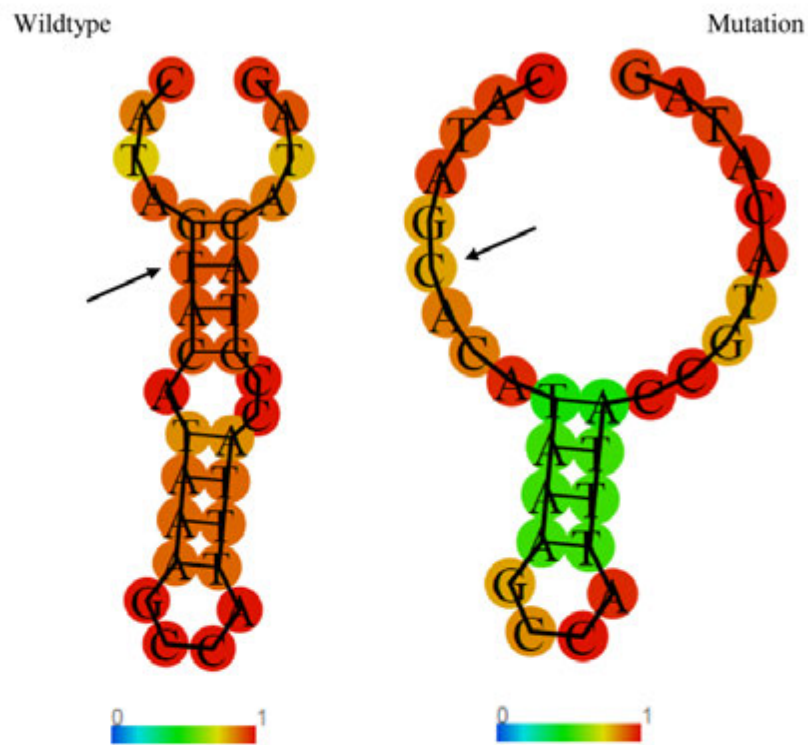
|  | <b>Position 16145G&gt;A</b>   | <b>Position 16311T&gt;C</b>           |
|--|-------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Controls: n=154) / Cases: n=154 (%)</i> | 3 (1.9) / 8 (5.2)             | 15 (9.7) / 28 (18.2)                  |
| <b>Logistic Regression<sup>1</sup></b>     |                               |                                       |
| <i>p-value</i>                             | 0.038                         | 0.018                                 |
| <i>OR 95% CI</i>                           | 4.407 1.086-17.883            | 2.417 1.165-5.016                     |
| <b>Stability analysis</b>                  |                               |                                       |
| <i>CRS</i>                                 | G                             | T                                     |
| <i>Distribution in population database</i> | G:97.2; A:2.8; GAP:0.02       | T:76.9; C:23.0; Y:0.02; GAP:0.02      |
| <i>No. Hits phylogeny (PhyloTree.org)</i>  | 37                            | 137                                   |
| <i>No. Hits Soares et al. 2009</i>         | 22                            | 120                                   |
| <i>Probability of mutation</i>             | 0,00205935                    | 0,01123280                            |
| <i>Nucleotide Conservation Index (%)</i>   | A:56.3; G:20.8; T:14.6; C:8.3 | T:58.3; C:33.3; G:4.2; A:2.1; GAP:2.1 |

The percentages of m.16145G>A and m.16311T>C were overrepresented in stroke cases (5.2% and 18.2%, respectively) than controls (1.9% and 9.7%, respectively). After correction for the effect of CV risk factors with significant differences between stroke cases and controls (hypercholesterolemia (chapter 2)), significant association were still observed in m.16145G>A (conditional logistic regression: p=0.038; OR= 4.407, 95% CI [1.086-17.883]) and m.16311T>C (conditional logistic regression: p=0.018; OR= 2.417, 95% CI [1.165-5.016]), emerging as a possible genetic risks factors for stroke (Table 20).

Stability analyses were performed to predict the impact of these mutations. Several measures as the number of hits in the mtDNA phylogeny, the probability of mutation, the frequency in the population database and the conservation index (CI) at nucleotide level,



were calculated, and results are showed in Table 20. The results obtained revealed m.16145G>A and m.16311T>C as non-stable position since they present a minimum of 37 hits in the phylogeny, a high probability of mutation, a high frequency of the variant in the population database (here denoted by minor allele frequency [MAF] >5%) detected on m.16311T>C or low-frequency (MAF 1-5%) in m.16145G>A and a maximum nucleotide CI of 58% (Table 20). To infer about the impact of m.16145G>A and m.16311T>C on the stability of secondary structures of the mtDNA, a prediction of different structures with the wild type (rCRS) and mutant variant was performed. It seems that m.16311T>C implies a conformational rearrangement, resulting in structure of figure 24 as the new predicted minimum free energy solution (-0.40 kcal/mol), causing a stability reduction of the region. No structural or thermodynamic differences were found for the m.16145G>A.



**Information about 16311T>C mutation**

- Wild type sequence: CATAGTACATAAAAGCCATTTACCGTACATAG
- Mutation sequence: CATAGCACATAAAAGCCATTTACCGTACATAG
  
- Wild type free energy: -2.30kcal/mol
- Mutation free energy: -0.40 kcal/mol
  
- Wild type Dot-Bracketed representation: .....((((((.....)))))).....
- Mutation Dot-Bracketed representation: .....((((.....)))).

**Figure 24.** Wild type vs. mutant structure and energy information. For m.16311T>C, relevant secondary structure and energy information is listed along with a graphical drawing for both the mutant and the wild type.

The distribution of the heteroplasmic positions between stroke cases and controls are reported in Table 21. Eighty-eight stroke cases (57.1%) and eighty-six controls (55.8%) presented point and/or length heteroplasmy, and no significant differences were obtained between groups (PH:  $p=1.000$  and LH:  $p=1.000$ , McNemar's test). The most prevalent variant detected was a length heteroplasmy located in the poly-C tract of the HVRII (between positions 303–315 of the mtDNA), which was present in a 52% of stroke cases and in 46.7% of controls. Point heteroplasmies were found in six stroke cases and six controls, involving nine different positions of the mtDNA: 146, 150, 152, 185, 204, 16092, 16093, 16129 and 16399.

**Table 21:** Classification of the analysed stroke individuals depending on the type(s) of heteroplasmy they presented

|                     | <i>Controls</i>  | <i>Patients with stroke</i> | <i>p-value</i> <sup>1</sup> | <i>OR [95% CI]</i>   |
|---------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                     | <i>n=154 (%)</i> | <i>n=154 (%)</i>            |                             |                      |
| <i>Homoplasmy</i>   | 66 (42.86)       | 68 (44.16)                  | 0.896                       | 0.971 [0.621-1.517]  |
| <i>Heteroplasmy</i> | 88 (57.14)       | 86 (55.84)                  | 0.896                       | 1.030 [0.659-1.610]  |
| <i>1PH</i>          | 1 (0.65)         | 1 (0.65)                    | 0.590                       | 2.167 [0.130-36.121] |
| <i>1LH</i>          | 71 (46.10)       | 70 (45.45)                  | 0.941                       | 0.983 [0.627-1.542]  |
| <i>&gt;1PH</i>      | 0 (0.0)          | 0 (0.0)                     | -                           | -                    |
| <i>&gt;1LH</i>      | 15 (9.74)        | 15 (9.74)                   | 0.832                       | 1.087 [0.502-2.356]  |
| <i>PH+LH</i>        | 5 (3.25)         | 5 (3.25)                    | 0.907                       | 0.926 [0.257-3.337]  |
| <i>Total PH</i>     | 6 (3.90)         | 6 (3.90)                    | 0.914                       | 1.067 [0.329-3.462]  |
| <i>Total LH</i>     | 86 (55.84)       | 85 (55.19)                  | 0.960                       | 1.012 [0.645-1.588]  |

<sup>1</sup> P-value of McNemar test used to compare controls and stroke.

The analysis of stability performed to predict the impact of these heteroplasmic positions is presented in Table 22. In general, these mutations have a minimum of 16 hits in the phylogeny, were located in hotspots positions, have a high frequency of the minor variant in the population database (min. height peaks 16.67%), and a low conservation index, indicated these heteroplasmies have typical characteristics of non-stable positions (Table 22).

**Table 22:** Complete results of stroke and myocardial infarction heteroplasmy position analysed (position, sample name, heteroplasmy type, heteroplasmy origin, distribution in population database, number of hits in mtDNA phylogeny (PhyloTree.org) and by Soares et al. 2009, probability of mutation and nucleotide Conservation Index)

| Position | Sample name  | Het | CRS | Mean proportion height peaks | Distribution in population database             | No. Hits phylogeny (PhyloTree.org) | No. Hits Soares et al. 2009 | Probability of mutation | Nucleotide Conservation Index (%)      |
|----------|--------------|-----|-----|------------------------------|---|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--|
| 146      | Ca10_Stroke  | T/c | T   | 83.33T 16.67C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109                         | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 150      | Ca111_Stroke | T/c | C   | 68T 32C                      | C:88.2; T:11.7; G:0.1; GAP:0.1                  | 74                                 | 63                          | 0.00589722              | C:43.8; G:27.1; A:18.8; T:10.4         |
| 152      | Ca69_Stroke  | C/t | T   | 52.94C 47.06T                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157                         | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 185      | Ca115_Stroke | G/a | G   | 66.67G 33.33A                | G:94.6; A:3.9; T:1.1; C:0.3; GAP:0.1; R:0.02    | 24                                 | 24                          | 0.00224656              | C:52.1; A:29.2; T:12.5; G:6.3          |
| 204      | Ca79_Stroke  | T/c | T   | 54.55T 45.45C                | T:93.4; C:6.5; A:0.1; GAP:0.1; Y:0.02           | 44                                 | 43                          | 0.00402509              | G:52.1; T:22.9; C:16.7; A:8.3          |
| 16129    | Ca13_Stroke  | G/a | A   | 73.33G 26.67A                | G:84.6; A:14.9; C:0.4; R:0.02; GAP:0.02         | 93                                 | 86                          | 0.00805017              | A:87.5; G:8.3; T:2.1; GAP:2.1          |
| 146      | Co07_Stroke  | T/c | T   | 69.23T 30.77C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109                         | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 146      | Co68_Stroke  | C/t | T   | 80C 20T                      | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109                         | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 146      | Co35_Stroke  | T/c | T   | 66.67T 33.33C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.2                  | 121                                | 109                         | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.2                 |
| 152      | Co16_Stroke  | C/t | T   | 58.82T 41.18C                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157                         | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 16092    | Co40_Stroke  | C/t | T   | 82.35C 17.65C                | T:98.7; C:1.2; Y:0.1; GAP:0.02                  | 16                                 | 17                          | 0.00159131              | A:41.7; T:33.3; C:20.8; GAP:4.2        |
| 16399    | Co62_Stroke  | G/a | A   | 83.33G 16.67A                | A:97.4; G:2.5; T:0.02; C:0.02; GAP:0.02; R:0.02 | 21                                 | 26                          | 0.00243377              | T:39.6; A:31.3; C:16.7; G:6.3; GAP:6.3 |
| 146      | Ca120_MI     | T/c | T   | 63.64T 36.36C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109                         | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 152      | Ca100_M      | C/t | T   | 52.94C 47.06T                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157                         | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 73       | Co6_MI       | G/a | A   | 76G 24A                      | G:80.8; A:19.1; GAP:0.1; C:0.02                 | 12                                 | 11                          | 0.00102967              | A:41.7; C:35.4; G:22.9                 |
| 146      | Co56_MI      | T/c | T   | 66.67T 33.33C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109                         | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 150      | Co17_MI      | T/c | C   | 86.20T 13.80C                | C:88.2; T:11.7; G:0.1; GAP:0.1                  | 74                                 | 63                          | 0.00589722              | C:43.8; G:27.1; A:18.8; T:10.4         |
| 150      | Co123_MI     | T/c | C   | 82.76T 17.24C                | C:88.2; T:11.7; G:0.1; GAP:0.1                  | 74                                 | 63                          | 0.00589722              | C:43.8; G:27.1; A:18.8; T:10.4         |
| 152      | Co27_MI      | T/c | T   | 58.82T 41.18C                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157                         | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 152      | Co184_MI     | T/c | T   | 52.38T 47.62C                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157                         | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 204      | Co156_MI     | T/c | T   | 83.33T 16.67C                | T:93.4; C:6.5; A:0.1; GAP:0.1; Y:0.02           | 44                                 | 43                          | 0.00402509              | G:52.1; T:22.9; C:16.7; A:8.3          |
| 16092    | Co62_MI      | C/t | T   | 82.35C 17.65C                | T:98.7; C:1.2; Y:0.1; GAP:0.02                  | 16                                 | 17                          | 0.00159131              | A:41.7; T:33.3; C:20.8; GAP:4.2        |
| 16093    | Co106_MI     | C/t | T   | 72.22C 27.78T                | T:93.5; C:6.4; Y:0.1; GAP:0.02                  | 55                                 | 79                          | 0.00739493              | T:64.6; A:20.8; G:6.3; GAP:4.2; C:4.2  |
| 16129    | Co129_MI     | G/a | A   | 81.81G 18.19A                | G:84.6; A:14.9; C:0.4; R:0.02; GAP:0.02         | 93                                 | 86                          | 0.00805017              | A:87.5; G:8.3; T:2.1; GAP:2.1          |
| 16399    | Co94_MI      | G/a | A   | 83.33G 16.67A                | A:97.4; G:2.5; T:0.02; C:0.02; GAP:0.02; R:0.02 | 21                                 | 26                          | 0.00243377              | T:39.6; A:31.3; C:16.7; G:6.3; GAP:6.3 |

### Analysis of fixed and heteroplasmic mtDNA mutations with MI

MtDNA positions studied for MI cases and controls are available in Table III.1.3. of Annex 1 and the frequencies of fixed mutations found are reported in Table 23. The m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C were more frequent in MI controls (12.3%, 49.3% and 3.3%, respectively) than cases (7.6%, 38.9% and 1.4%, respectively). When corrected for the effect of CV risk factors with significant differences between MI cases and control (hypertension and hypercholesterolemia (chapter 2)), significant association was observed in these three mutations (m.72T>C: conditional logistic regression: p=0.001; OR= 0.041, 95% CI [0.006-0.290], m.73A>G: conditional logistic regression: p=0.009; OR= 0.009, 95% CI [0.307-0.843] and m.16356T>C: conditional logistic regression: p=0.016; OR= 0.091, 95% CI [0.013-0.639]), emerging as a possible protective genetic factors for MI (Table 23).

**Table 23:** Complete results of myocardial infarction fixed mtDNA mutation analysed.

|   | <b>Position 72T&gt;C</b>                | <b>Position 73A&gt;G</b>           | <b>Position 16356T&gt;C</b>       |
|---|---|------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Controls: n=211 /<br/>Cases: n=211 (%)</i> | 26 (12.3) /<br>16 (7.6)                 | 104 (49.3) /<br>82 (38.9)          | 7 (3.32) /<br>3 (1.42)            |
| <b>Logistic Regression<sup>1</sup></b>        |   |                                    |                                   |
| <i>p-value</i>                                | 0.001                                   | 0.009                              | 0.016                             |
| <i>OR 95% CI</i>                              | 0.041 0.006-0.290                       | 0.509 0.307-0.843                  | 0.091 0.013-0.639                 |
| <b>Stability analysis</b>                     |   |                                    |                                   |
| <i>CRS</i>                                    | T                                       | A                                  | T                                 |
| <i>Distribution in population database</i>    | T:97.4; C:2.4;<br>G:0.1; GAP:0.1        | G:80.8; A:19.1;<br>GAP:0.1; C:0.02 | T:97.5; C:2.5;<br>GAP:0.02        |
| <i>No. Hits phylogeny (PhyloTree.org)</i>     | 9                                       | 12                                 | 15                                |
| <i>No. Hits Soares et al. 2009</i>            | 6                                       | 11                                 | 19                                |
| <i>Probability of mutation</i>                | 0,00056164                              | 0,00102967                         | 0,00177853                        |
| <i>Nucleotide Conservation Index (%)</i>      | T:77.1; GAP:8.3;<br>A:6.3; C:4.2; G:4.2 | A:41.7; C:35.4; G:22.9             | T:79.2; C:12.5;<br>A:6.3; GAP:2.1 |

<sup>1</sup> Conditional regression model was performed considering significant covariates for MI (hypertension, hypercholesterolemia and mtDNA mutations)

In order to predict the impact of these mutations, several measures were calculated to analyse the stability of each position, and results are showed in Table 23. The results obtained revealed that m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C as a non-stable positions since they present a minimum of 9 hits in the phylogeny, a high probability of mutation, a high frequency of the variant in the population database (MAF >5%) for m.73A>G and low-frequency (MAF 1-5%) for m.72T>C and m.16356T>C, and a maximum nucleotide CI of 79% (Table 23). Using the proposed previously method to predict the impact of these three mutations on the stability of secondary structure of the mtDNA, it seems that m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C led to a folded structure with the same minimum free energy as the wild-type structure (rCRS), which means that these mutations do not condition the stability of the region.

Classification of the heteroplasmic positions between MI cases and control is available in Table 24. One hundred twenty-five MI cases (59.2%) and one hundred and twenty controls

(56.8%) presented point and/or length heteroplasmy, being the length heteroplasmy located in the poly-C tract of the HVRII the most prevalent variant both MI cases (54.03%) and controls (48.34%). In this analysis, the frequency of point heteroplasmy was overrepresented in MI controls (n=11; 5.21%), differing significantly from cases (n=2; 0.94%) (p=0.022, McNemar's test). This association remained significant (logistic regression: p=0.046; OR=0.209, 95% CI [0.045-0.972]) even correcting for the effect of MI risk factors (hypertension and hypercholesterolemia (chapter 2)). These heteroplasmic positions involving nine different positions of the mtDNA: 73, 146, 150, 152, 204, 16092, 16093, 16129 and 16399.

**Table 24:** Classification of the analysed myocardial infarction individuals depending on the type(s) of heteroplasmy they presented.

|                     | Controls    | Patients with MI | p-value <sup>1</sup> | OR [95% CI]          |
|---------------------|-------------|------------------|----------------------|----------------------|
|                     | n=211 (%)   | n=211 (%)        |                      |                      |
| <i>Homoplasmy</i>   | 91 (43.13)  | 86 (40.76)       | 0.851                | 1.042 [0.677-1.606]  |
| <i>Heteroplasmy</i> | 120 (56.87) | 125 (59.24)      | 0.851                | 0.959 [0.623-1.478]  |
| <i>1PH</i>          | 1 (0.47)    | 2 (0.95)         | 0.428                | 2.693 [0.232-31.217] |
| <i>1LH</i>          | 104 (49.29) | 104 (49.29)      | 0.558                | 0.878 [0.569-1.356]  |
| <i>&gt;1PH</i>      | 0 (0.0)     | 0 (0.0)          | -                    | -                    |
| <i>&gt;1LH</i>      | 15 (7.11)   | 19 (9.00)        | 0.659                | 1.193 [0.545-2.614]  |
| <i>PH+LH</i>        | 10 (4.74)   | 0 (0.0)          | 0.980                | -                    |
| <i>Total PH</i>     | 11 (5.21)   | 2 (0.95)         | 0.022                | 0,046 [0.045-0.972]  |
| <i>Total LH</i>     | 119 (56.40) | 123 (58.29)      | 0.735                | 0,928 [0.604-1.427]  |

<sup>1</sup> P-value of McNemar test used to compare controls and myocardial infarction stroke.

The stability analysis to identify the impact of these point heteroplasmy is presented in Table 22. All of them were considered non-stable positions. As previously stated, these positions presented a minimum of 16 hits in the phylogeny, were located in hotspots positions, have a high frequency of the minor variant in the population database (min. height peaks 13.80%) and low CI at nucleotide level (max. 64.4%). No different trends were observed between stability of these positions in MI cases and controls (Table 22).

### Distribution of mtDNA mutations between haplogroups

Haplogroup assignment of all individuals analysed in this article were performed in the previous chapter. In Figure 25 are shown the distribution of m.16145G>A and m.16311T>C for stroke and m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C for MI between the mtDNA haplogroups. Unlike the rest of mutations, it appears that m.72T>C and m.16356T>C have a high association with the haplogroups HVO and U, respectively (Figure 25). These associations ceases to exist when compared the number of individuals identify in this article that belonging the haplogrup HVO and have m.72T>C with the total of HVO cases and controls samples detected in the previous chapter, shown that there are individuals belonging this haplogroup that do not have the m.72T>C. In the same line, note that the total number of individuals identify in this study that have m.16356T>C belongs to haplogroup U. Even though m.16356T>C define different subgroups of U (U2e3, U3a1c, U4 and U5b1), this result

was obtained because in this analysis the haplogroup U included the rest of subhaplogrups of U detected. Otherwise, the frequencies obtained would be more divided. Hence, the analysis of the distribution of these mutations clearly demonstrated that they weren't associated with any particular mtDNA haplogroup. Therefore, these mutations could act as independent risk factors for haplogroups.

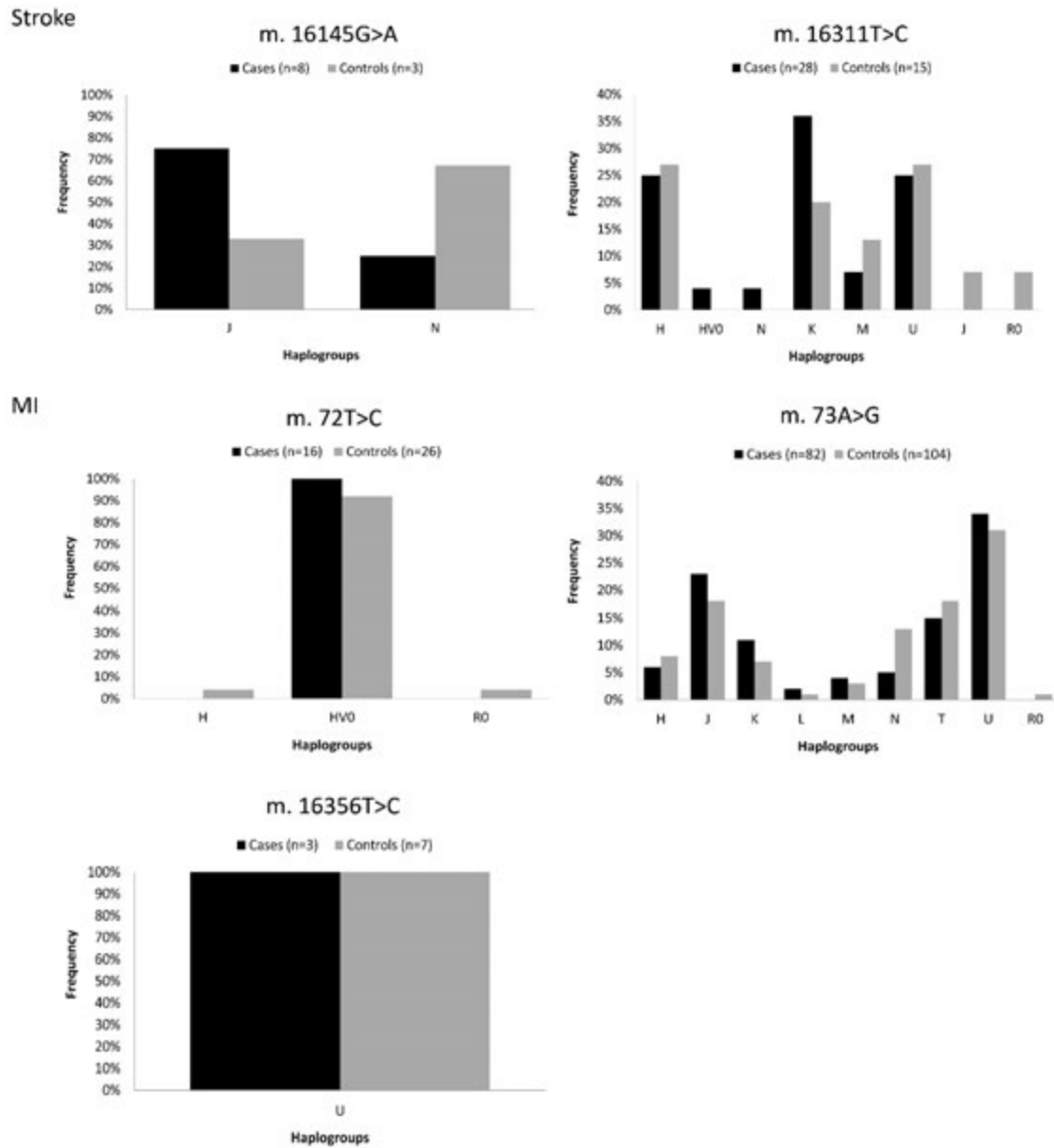


Figure 25. Distribution of fixed mutations between the mtDNA haplogroups

### 3.3.3. DISCUSSION

In western countries, where the burden of CVD is growing due to effect of CV risk factors, several studies have already shown the strongly relation of the genetic factors.

However, little is known about the role of mtDNA CR mutations in development of stroke and MI (Cardena et al. 2013; Gawel et al. 2008; Hudson et al. 2014; Mitrofanov et al. 2016; Mueller et al. 2011; Sazonova et al. 2016; Sobenin et al. 2013).

An association of several mtDNA alterations (fixed and in heteroplasmy) in the two diseases have been detected in the present study. As regards fixed mtDNA mutations, the set of mutations in stroke and MI cases was compared to controls and significant differences were found in the two diseases, reporting the m.16145G>A and m.16311T>C as a potential genetic risk factors for stroke, and m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C as a possible beneficial genetic factors for MI. It has been previously described that the CR mutations can be associated across multiple disease, and that the same variant could have opposite effect (increase or decrease the risk) for two different diseases (Hudson et al. 2014). This finding would support our original hypothesis about the consequences that can affect the mtDNA mutations in the CR depending on the disease.

The CR variants do not act directly on the electron transport chain affecting mitochondria bioenergetics or ROS generation; they may have an important effect on the genotype by altering mtDNA gene expression (Huang et al. 2016a; Tsutsui et al. 2008). The CR contains the main regulatory sequences for replication initiation and transcription (Bonawitz et al. 2006). Unfortunately, the potential role of the remaining areas of the CR is still unknown even considering the exceptional economy of organization of the mtDNA.

Transitions 16145G>A and 16311T>C seem to have a pathogenic role in stroke. The analysis of distribution of these mutations clearly showed that they are located in many different haplogroups and consequently these mutations act as haplogroup-independent risk factors. The m.16145G>A is located between MT-TAS sequence (nt. 16157-16172) and MT-TAS2 sequence (nt. 16081-16138). According to the classic strand-asynchronous mechanism, recent studies demonstrated that the 5' end of the D-loop is capable of forming secondary structures (Pereira et al. 2008), which act as a recognition site to molecules involved in the premature arrest of H strand elongation (Nicholls and Minczuk 2014). The biological importance of this region was confirmed by Brandon et al. (2006), who also observed multiple tumor specific mutations in the pre-TAS region. These observations suggest that mutations arising near to this conserved motive might be responsible of the alterations in mtDNA replication and transcription. In the same line, m.16311T>C has been found to be significantly associated with certain types of cancer (Akouchejian et al. 2009; Chen et al. 2002; Silkjaer et al. 2013). This mutation was previously described by Chen et al. (2002) in patients with prostate cancer and also has been reported in colorectal cancer (Akouchejian et al. 2009) and more recently in acute myeloid leukemia (Silkjaer et al. 2013). This mutation is located between the control elements Mt5 sequence (nt. 16194-16208) and the Mt3I sequence (nt. 16499-16506). In this case, our results showed that m.16311T>C may imply a reduction in the stability of secondary structure of this region, which would affect in the binding grade to mtDNA transcription factors, ultimately affecting on the intensity of transcription regulation (Murakami et al. 2002). In both cases, these findings strongly suggest that mtDNA CR dysfunction may cause a decrease on the mtDNA copy number, which could affect the efficiency of ETC, lowering the ATP:ADP ratio and increasing ROS production (Huang et al. 2016a; Tsutsui et al. 2008), contributing in stroke development.

Concerning MI, our results showed that m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C act as a beneficial factor for MI. Although a high percentage of individuals with these mutations

belonged to the haplogroups HV0, H or U, which have been shown to may have higher oxidative damage (Fernández-Caggiano et al. 2012; Hagen et al. 2013; Hudson et al. 2014; Umbria et al. 2019), the distribution of positions 72, 73 and 16356 in our samples was independent of these haplogroups. Since the role of the mitochondrial genome in CVD susceptibility remains uncertain, it is difficult to explain how these mutations can decrease or counteract the progression of MI. Although m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C have been previously related to certain types of cancer (Kirches et al. 2001), many studies consider that they are recurrent variants common in humans (Samuels et al. 2013).

Even though the most deleterious mutations are removed by natural selection, a wide range of milder bioenergetic alterations are introduced in certain populations (Fan et al. 2008). Some of these variants as m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C could be advantageous and seen as way to facilitate survival in specific environments. In contrary, other mutations as m.16145G>A and m.16311T>C escape of intraovarian selection and could cause significant mitochondrial defects. Much of the progress in linkage disequilibrium mapping of complex diseases has been made using the major assumptions of the CDCV hypothesis, that is, that common alleles cause common diseases. After found positive associations with common alleles (e.g., those found by Umbria et al. (2019), it was necessary replicated the results and then look for rarer variants, with potentially greater penetrance. However, all the mutations analysed in the present study had a minor allele variant >5% (common variant) or between 1-5% (low-frequency). Although the common variants often are associated with OR of only between 1.2 and 1.5 (Bodmer and Bonilla 2008), our results showed high effect size for pathogenic variants, with OR values of 2.4-4.4, and similarly, high protective effect size of variants found at higher frequency in controls (ORs <0.5) relative to cases.

Our findings also showed a significant increase of point heteroplasmy in MI controls in comparison to cases. This result is contrary to expectations, because the presence of heteroplasmy has been commonly associated with aging and degenerative disease, due to a decline in mitochondrial function in both these processes (Ye et al. 2014). Our registered heteroplasmic positions (16399, 16129, 16093, 16092, 73, 146, 150, 152, and 204) were located in hotspots positions of the hypervariable segments. Recent evidences demonstrate that an important fraction of mutations detected in heteroplasmy are germinal or originated in very early stages of the development (Ramos et al. 2016). Moreover, it is probable that germinal heteroplasmy has a beneficial or risk effect, and our results revealed that the higher number of point heteroplasmy were overrepresented in MI controls individuals. This fact, is not surprise because some heteroplasmic positions detected, as m.73G>A, has been linked in this study as a possible beneficial genetic factors for MI and also it has been suggested that other heteroplasmic positions, such as 146T>C, 150C>T or 152T>C may increase longevity (Rose et al. 2007).

Many studies have shown that heteroplasmic variants without apparent functional consequences are observed in apparently healthy individuals (He et al. 2010; Irwin et al. 2009; Ramos et al. 2013; Santos et al. 2005). In the present study, the frequency of MI controls with point heteroplasmy in the CR (5.2%; 95% CI [0.045-0.972]) are slightly higher than those reported by Santos et al. (2005) (3.81%; 95% CI [0.166-0.737]), but less than described by Ramos et al. (2013) (7.9%; 95% CI [0.041- 0.149]), demonstrating that heteroplasmy occur with appreciable frequency in the general population (Irwin et al. 2009). This idea is even more reinforced in front of the present data, since the high representation



of point heteroplasmies detected were located in non-stable positions and by the fact that no significant differences were found between the frequencies of point heteroplasmy in stroke cases and controls in the present study.

Our finding indicates the possible role of mtDNA CR mutations in the pathogenesis of stroke and MI. Our results may provide better understanding of the cellular mechanism by which mtDNA variants contribute to CVD, and endorse the importance of including this regulatory region of the mtDNA in genetic association studies.

## 3.4 Capítol 4

New mitochondrial genetic risk score improve discrimination capacity of cardiovascular events



This chapter represents material and methods, results and discussion presented in the under review publication (Annex II):

*Umbria M, Ortega I, Santos C, Castillo S, Salas E, Aluja MP. New mitochondrial genetic risk score improve discrimination capacity of cardiovascular events. Atherosclerosis. Under Review (January 2019).*

### 3.4.1. MATERIAL AND METHODS

#### Subjects

The cases and controls analysed in this study were selected from the Cardiovascular Disease Risk Study of Castile and Leon (Vega Alonso et al. 2007), a population-based study performed in Castile and Leon (centre-north region of Spain), where a random sample from general population underwent a health examination in relation with cardiovascular risk factors in 2014.

A total of 301 cases with clinical history of CVD and 221 controls were included in this study. For each individual, a DNA sample was available in the Spanish Banco Nacional de ADN (<http://www.bancoadn.org>) and we also obtained information about age (categories  $\leq 44$ , [45-49], [50-54], [55-59], [60-64],  $\geq 65$  years), gender, geographic origin (North, Central and South regions of Castile and Leon), history of hypertension, history of diabetes, history of hypercholesterolemia, cigarette consumption (smokers, former smokers and non-smokers), presence of overweight or obesity (body mass index  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), presence of high abdominal perimeter in risk range (risk:  $\geq 80$  cm for women and  $\geq 94$  cm for men) and presence of high levels of triglycerides ( $\geq 170$  mg/dl).

It was considered that a subject suffers from hypertension if the diagnosis of hypertension was already in his/her clinical history, if the subject was taking antihypertensive drugs, or if at the moment of the medical examination to enter the population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon (Vega Alonso et al. 2007) systolic blood pressure was  $\geq 140$  mmHg or the diastolic blood pressure was  $\geq 90$  mmHg. It was considered that a subject suffers from hypercholesterolemia if the diagnosis of hypercholesterolemia was already in his/her clinical history, if the subject was taking cholesterol-lowering drugs, or if at the moment of the medical examination to enter the population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon (Vega Alonso et al. 2007) total cholesterol was  $\geq 250$  mg/dl. It was considered that a subject suffers from diabetes mellitus if the diagnosis of diabetes mellitus was already in his/her clinical history, if the subject was taking glycemia-lowering drugs, or if

at the moment of the medical examination to enter the population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon (Vega Alonso et al. 2007) glycemia was >125 mg/dl.

As cardiovascular events we have considered fatal and non-fatal myocardial infarction as well as ischemic stroke.

### **Selection of genetic variants, genotyping and multilocus risk score generation**

Mitochondrial variants to assess the association between mitochondrial genetic risk score (GRS) and the presence of CVDs were selected from data previously analysed (chapter 3 of the thesis). The variants selected were m.16145G>A and m.16311T>C that could act as a potential genetic risk factors for stroke and m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C that could act as a possible beneficial genetic factors for MI.

The selected variants to generate the nuclear GRS were previously described by Luis-Granella et al. (2012). In brief, the 11 selected genetic variants were associated with CVDs ( $p \leq 1 \times 10^{-6}$ ) but no with classical cardiovascular risk factors (CVRFs) (age, gender, origin, cigarette consumption, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, abdominal perimeter and triglycerides), and they are not related to each other by linkage disequilibrium ( $r^2 > 0.3$ ). The list included: rs10455872 in LPA; rs10507391, rs17222842 and rs9315051 in ALOX5AP; rs12526453 in PHACTR1; rs1333049 near CDKN2A/2B; rs17465637 in MIA3; rs501120 in CXCL12; rs6725887 in WDR12; rs9818870 in MRAS and rs9982601 near SLC5A3, MRPS6, KCNE2.

To determine the magnitude of the association between an individual GRS using mitochondrial variants and the presence of CVD, the results of mtDNA variation, previously reported in the chapter 3, for 280 cases and 221 controls were used and the control region of mtDNA of 21 additional cases were analysed following the same methodology described in chapter 2.

Nuclear variants were genotyped using the Cardio inCode chip (Ferrer inCode, Barcelona, Spain), which is based on TaqMan genotyping assays and the EP1 Fluidigm platform (an efficient endpoint PCR system for high-sample-throughput SNP genotyping).

### **Estimation of individual risk scores**

In order to assess if nuclear and mitochondrial genetic information improve the discrimination capability of a CV event, we first developed an individual risk score based on clinical variables, considering those variables significantly different ( $p < 0.05$ ) between cases and controls (see Table 23). Then, we added the nuclear GRS described in Lluís-Ganella et al. (2012) as a new variable to the clinical risk score, generating a new risk score with clinical and nuclear genetic information to explore the utility of this GRS in the study population. After this step, the mitochondrial variables were added to the risk score based on clinical and nuclear genetic information, developing a new risk score with clinical and genetic information (nuclear and mitochondrial variables).

Each new risk score was compared against the previous one, to assess if the addition of new information was relevant, in terms of discrimination capability. All risk scores were implemented using multivariate conditional logistic regression models.

## Statistical analysis

Baseline demographic and clinical variables of different groups of individuals were compared through the chi-square test for categorical variables. All differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

A quality control was performed for all selected nuclear genetic variants, checking the balance of Hardy-Weinberg in controls, and determining if they were found to be in linkage disequilibrium. The nuclear SNPs analysed in cases and controls were compared using a Fisher's test. To adjust the association analysis for the potential confounding effect of CV risk factors, a logistic regression was applied. Odds Ratios (OR) and their 95% Confidence Intervals (CI) were calculated adjusting for the effect of risk factors.

Multivariate conditional logistic regression models were used to develop the different risk scores. Discrimination capacity of risk scores was evaluated using the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC). Comparison of AUCs was performed with the DeLong's test for paired data (DeLong et al. 1988).

Statistical analyses were performed using R statistical software, version 3.1.3 (R Development Core Team, 2015).

### 3.4.2. RESULTS

#### Sample characteristics

Table 25 shows a summary of the sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of selected cases and controls. Hypertension and hypercholesterolemia were significantly higher in cases than in controls [(hypertension: 87% vs. 71.9%, respectively;  $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  test) and (hypercholesterolemia: 66.1% vs. 45.2%, respectively;  $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  test)] (Table 25). The cigarette consumption profile, the frequency of individuals with diabetes, overweight or obesity, abdominal perimeter in risk range, and high triglycerides, was similar in cases and controls.

The frequency for each mitochondrial and nuclear variant that were included in our analyses for cases and controls are showed in Table 26. For mitochondrial risk variants, higher frequencies were observed in cases. By contrast, beneficial mtDNA variants were more frequent in controls. The distribution of the risk allele for each of the nuclear variants analysed is similar between cases and controls (Table 26).

**Table 25:** Sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of cases and controls.

|   | <b>Controls</b><br>n=221 (%) | <b>Cases CVD</b><br>n=301 (%) | <b>P-value<sup>1</sup></b> |
|---|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| <b>Age (years)</b>                                    |                              |                               |                            |
| ≤44   | 4 (1.8)                      | 6 (2)                         |                            |
| 45-49   | 14 (6.3)                     | 13 (4.3)                      |                            |
| 50-54   | 5 (2.3)                      | 12 (4)                        | 0.618                      |
| 55-59   | 19 (8.6)                     | 18 (6)                        |                            |
| 60-64   | 24 (10.9)                    | 34 (11.3)                     |                            |
| ≥65   | 155 (70.1)                   | 218 (72.4)                    |                            |
| <b>Male/Female</b>                                    | 129 (58.4)/ 92 (41.6)        | 189 (62.8)/ 112 (37.2)        | 0.307                      |
| <b>Geographic origin</b>                              |                              |                               |                            |
| North   | 64 (29)                      | 79 (26.2)                     |                            |
| Central   | 92 (41.6)                    | 124 (41.2)                    | 0.687                      |
| South   | 65 (29.4)                    | 98 (32.6)                     |                            |
| <b>Cigarette consumption</b>                          |                              |                               |                            |
| Non-smoking   | 126 (57)                     | 151 (50.2)                    |                            |
| Former smoker   | 64 (29)                      | 111 (36.9)                    | 0.164                      |
| Smoker  | 31 (14)                      | 39 (13)                       |                            |
| <b>Hypertension</b>                                   | 159 (71.9)                   | 262 (87)                      | <0.001                     |
| <b>Diabetes</b>                                       | 41 (18.6)                    | 68 (22.6)                     | 0.262                      |
| <b>Hypercholesterolemia</b>                           | 100 (45.2)                   | 199 (66.1)                    | <0.001                     |
| <b>Overweight or obesity (≥25kg/m<sup>2</sup>)</b>    | 170 (76.9)                   | 221 (73.4)                    | 0.362                      |
| <b>High abdominal perimeter (&gt;80 or &gt;94 cm)</b> | 173 (78.3)                   | 218 (72.4)                    | 0.127                      |
| <b>Triglycerides (≥170mg/dl)</b>                      | 31 (14)                      | 37 (12.3)                     | 0.561                      |

<sup>1</sup>P-value of a chi-squared test for qualitative data

**Table 26:** Distribution of mitochondrial and nuclear SNP frequencies among cases and controls.

| <b>SNP ID</b>                    | <b>Frequencies No. (%)</b> |                      |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|
|                                  | <b>Controls (n=221)</b>    | <b>Cases (n=301)</b> |
| <b>Mitochondrial DNA</b>         |                            |                      |
| <i>m.16145G&gt;A</i>             | 8 (3.6)                    | 13 (4.3)             |
| <i>m.16311T&gt;C</i>             | 29 (13.1)                  | 46 (15.3)            |
| <i>m.72T&gt;C</i>                | 28 (12.7)                  | 18 (6)               |
| <i>m.73A&gt;G</i>                | 98 (44.3)                  | 127 (42.2)           |
| <i>m.16356T&gt;C</i>             | 8 (3.6)                    | 4 (1.3)              |
| <b>Nuclear DNA (risk allele)</b> |                            |                      |
| <i>rs10455872 (G)</i>            | 26 (11.8)                  | 56 (18.6)            |
| <i>rs10507391 (T)</i>            | 191 (86.4)                 | 250 (83.1)           |
| <i>rs17222842 (A)</i>            | 30 (13.6)                  | 40 (13.3)            |
| <i>rs9315051 (G)</i>             | 40 (18.1)                  | 62 (20.6)            |
| <i>rs12526453 (C)</i>            | 188 (85.1)                 | 264 (87.7)           |
| <i>rs1333049 (C)</i>             | 168 (76)                   | 241 (80.1)           |
| <i>rs17465637 (C)</i>            | 199 (90)                   | 280 (93)             |
| <i>rs501120 (T)</i>              | 216 (97.7)                 | 296 (98.3)           |
| <i>rs6725887 (T)</i>             | 57 (25.8)                  | 91 (30.2)            |
| <i>rs9818870 (T)</i>             | 36 (16.3)                  | 49 (16.3)            |
| <i>rs9982601 (T)</i>             | 57 (25.8)                  | 72 (23.9)            |

The results of the test for association between the nuclear genetic variants included in the GRS and incidence of CVD events showed that only the rs10455872 variant in LPA was more frequent in cases (10.7%), differing significantly from controls (5%) ( $p=0.038$ , Fisher's test). After correction for the effect of CV risk factors with significant differences between cases and controls (hypertension and hypercholesterolemia), significant association with CVD events were still observed in rs10455872 (conditional logistic regression:  $p=0.025$ ; OR= 1.813, 95% CI [1.077-3.052]).

#### Utility of nuclear and mitochondrial GRS in discrimination capacity of CVD

The risk score 1 included hypertension and hypercholesterolemia as clinical relevant predictors (Table 27). The AUC for this score was 0.697 (95%CI: 0.655-0.739). When we include the nuclear GRS described in Lluís-Ganella et al. (2012) as a new predictor jointly with the clinical variables the new score 2 increases its AUC to 0.722 (95%CI: 0.677-0.768), showing a statistically significant improvement in the discrimination capacity, AUCs 0.722 vs 0.697 ( $p=0.0323$ ) (Table 27).

**Table 27:** Adjusted models for calculation of different risk scores and comparison of AUCs

| Score 1              |              | Score 2              |              | Score 3              |              |
|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| Variable             | p-value      | Variable             | p-value      | Variable             | p-value      |
| Hypertension         | 0.0001       | Hypertension         | 0.0001       | Hypertension         | <0.0001      |
| Hypercholesterolemia | 0.0032       | Hypercholesterolemia | 0.0018       | Hypercholesterolemia | 0.0022       |
|                      |              | Nuclear DNA – GRS    | 0.0271       | Nuclear DNA – GRS    | 0.0705       |
|                      |              |                      |              | m.16145G>A           | 0.1042       |
|                      |              |                      |              | m.16311T>C           | 0.4592       |
|                      |              |                      |              | m.72T>C              | 0.0060       |
|                      |              |                      |              | m.73A>G              | 0.3420       |
|                      |              |                      |              | m.16356T>C           | 0.0271       |
| <b>AUC1</b>          | <b>0.697</b> | <b>AUC2</b>          | <b>0.722</b> | <b>AUC3</b>          | <b>0.774</b> |

|              | p-value |
|--------------|---------|
| AUC1 vs AUC2 | 0.0323  |
| AUC2 vs AUC3 | 0.0007  |

The AUC obtained for a GRS constructed in this population with mitochondrial variants reported in chapter 3 of the thesis was 0.630 (95%CI: 0.582-0.678). We created a third score (score 3) that included the new mitochondrial GRS jointly with clinical variables (hypertension and hypercholesterolemia) and the nuclear GRS (Table 27). In this case, the AUC increases to 0.774 (95%CI: 0.733-0.817), showing a statistically significant improvement in the discrimination capacity of the risk score without the mtDNA information (0.774 vs 0.722,  $p=0.0007$ ). These results indicate that the addition of mitochondrial variants significantly improves the discrimination capacity of CVD beyond CVRFs and beyond the joint CVRFs and the nuclear GRS for this population.



### 3.4.3. DISCUSSION

In this work, we assess the capability of genetic information for improving the discrimination capacity of CVD over a score based only on clinical information.

Genetic variants selected in this study to analysed the association between nuclear GRS and the incidence of CVD, have been shown previously to be associated with this disease in multiple large independent samples and populations (Lluis-Granella et al. 2012) and are not related to cardiovascular classic risk factors. Of a total of eleven nuclear SNP, only one was significantly associated with CVD incidence. Is no surprise that most of these variants were not associated with this disease in our study, mainly due to their sample size and because the risk effects of each variant, in themselves, are very weak to identify individuals with a high propensity to develop heart disease (Franchini et al. 2008). However, the relevant of these variants for CVD risk has been validated in different meta-analyses (Schunkert et al. 2011) and constitute a useful framework for substantially improve knowledge of disease architecture and to investigate gene-environment interactions.

On what concerns, first, our results show that the nuclear GRS described in Lluis-Ganella et al. (2012) and used to analyse the improvement in discrimination of coronary heart disease, have also shown its utility in CVD (specifically for MI and stroke) in the population analysed in the present study. Moreover, when mtDNA variables are also considered in the combined score (based on clinical variables and nDNA), we obtain a significant improvement in the discrimination capacity over the clinical variables and over the clinical variables together with the nuclear GRS. In this regard, as previously indicated, recent evidence associated the cardiovascular disease (CVD) with specific mitochondrial DNA (mtDNA) defects, mainly driven by the central role of mitochondria in cellular metabolism (Ashar et al. 2017; Ide et al. 2001; Panth et al. 2016; Taverne et al. 2013). The ability of mtDNA mutation to influence in the development of CVDs is directly related to its prevalence and the severity of its impact on mitochondrial function.

In this study, we have used a case-control design, but considering that the nuclear genetic variants have shown not only discriminative capacity but also predictive capacity, it is also credible that the mitochondrial variants will also have predictive capability. The genetic variants included are invariable over time. These variants indicate a predisposition that will be recognised phenotypically sooner or later or never in a CV event according to environmental and lifestyle variables. For this reason, the AUC of mitochondrial GRS is relatively low as it is that of the nuclear GRS alone. In the study, we have introduced clinical variables such as hypertension and hyperlipidaemia as manifestation of environmental and lifestyle variables, which are associated with a greater risk of suffering an event, in order to demonstrate that clinical variables when added to the genetic variants, would improve the discrimination capability.

To date, there are many studies using multiple variants previously associated with different CVDs hoping to improve the discrimination capacity and the predictive risk (Christiansen et al. 2017; Goldstein et al. 2014; Pereira et al. 2017). To our knowledge, the present study is the first to demonstrate that the employment of a GRS based on mitochondrial variants significantly improve discrimination capacity of CVD beyond the information provided by classic CVRFs and nuclear GRS.

At this time, all studies in which we can reference our results have always used nuclear variants for analysis. Mega et al. (2015) investigated an association of a GRS based on 27 genetic variants with incident or recurrent CHD. This GRS divided the population into low, intermediate and high-risk groups, permitting that people with the highest burden of genetic risk derived the large clinical benefit from statin therapy. From here, several studies also showed an improved in discrimination and reclassification of risk beyond established clinical criteria (Abraham et al. 2016; Beaney et al. 2017; Muse et al. 2018; Natarajan et al. 2017; Tada et al. 2016). In a recent study conducted by Khera et al. (2016), using a GRS to quantified generic risk for CAD in three prospective cohorts, the authors determined that relative risk of cardiac events among patients at high GRS was 91% higher than in patients at low GRS. Furthermore, they showed that a favourable lifestyle (no current smoking, no obesity, regular physical activity, and a healthy diet) was associated with a nearly 50% lower risk of CAD than was an unfavourable lifestyle among patients at high GRS, indicating that genetic and classic CVRFs are mostly independently associated with susceptibility to CVDs. The results of Inouye et al. (2018), which took into account 1.7 million nuclear genetic variants, also demonstrated that the predictive capacity of the genetic risk score is independent of conventional risk factors. In this sense, similar results have been obtained with the nuclear genetic variants we have used in our study (Iribarren et al. 2016). Such results would be in line with our finding that use a nuclear GRS improved discrimination capacity of CVD, and for the time being, these findings could be extrapolated to the results obtained with mitochondrial GRS analysis. Therefore, our finding would promote new studies to include mitochondrial variants together with nuclear variants into a GRS.

The possible clinical utility of our results relies on their reproduction in a cohort setting. Kullo et al. (2016) found that disclosure of 10-year genetic risk estimates for coronary artery disease (CAD) resulted in LDL-C levels that were ~10 mg/dl lower among participants with high genetic risk compared to participants undergoing risk assessment restricted to conventional risk factors. However, other studies concluded that providing a GRS to the participants not function as a motivator to improve adherence to risk-reducing strategies (Hollands et al. 2016; Knowles et al. 2017). Even so, this finding could improve cost effectiveness of genetic testing for CVD because this mitochondrial GRS involves only the genotyping of five SNPs.

Despite our promising results, some limitations of our study should be acknowledge. In this work, the relevant clinical variables were hypertension and hypercholesterolemia. One could think on the REGICOR score (which is the Framingham score calibrated to the Spanish population) as a best option to consider for this purpose (Marrugat et al. 2007), but in our population, we do not have the clinical variables included in REGICOR but collected 10 years before the CVD as this is a case-control study and cases have been already treated and some variables included in the Framingham score (like total cholesterol) are highly influenced by the effect of treatment (D'Agostino et al. 2001; Marrugat et al. 2003).

This study indicates that the use of genetic information improve the discrimination capacity of CV events. The combination of nuclear and mitochondrial GRS increases the AUC results, enlarging the discrimination power of analysis (0.774 vs 0.722,  $p=0.0007$ ). However, the clinical implication of the addition of genetic factors for discrimination and reclassification of risk remain unknown. In near future, this will be of clinical utility, but further studies are needed to validate the results and confirm the cost benefit to their implementing and the acceptability of such genetic test to the society.



04 ■

Discussió general



#### 4.1. Situació de la mortalitat i morbiditat cardiovascular a Espanya.

La realització d'un estudi epidemiològic descriptiu com el plantejat en el capítol 1 [Malaltia cardiovascular a España - Estudi epidemiològic descriptiu 2000-2015] respon a la necessitat d'actualitzar a l'estat espanyol les dades d'un dels problemes de salut més greus a nivell mundial, les MCV. La realització d'aquests tipus d'estudis és una pràctica que es porta a terme periòdicament en el nostre país. No obstant, en el moment d'iniciar la present tesi doctoral, no hi havia cap treball actualitzat publicat enfocat en l'anàlisi, per edat i sexe, de la mortalitat i morbiditat cardiovascular en totes les comunitats autònomes d'Espanya. Per a poder contextualitzar l'impacte poblacional de les malalties cardiovasculars més rellevants, es va decidir fer un estudi epidemiològic amb l'objectiu d'estimar la tendència temporal i geogràfica d'aquestes malalties durant un període de 15 anys, des de l'any 2000 fins l'any 2015.

L'estudi de les tendències de mortalitat i morbiditat hospitalària juga un paper molt important en la epidemiologia i la salut pública (Mensha et al 2017). Les malalties cardiovasculars continuen sent una de les principals causes de morbimortalitat a Espanya i a la resta de països industrialitzats (Naghavi et al. 2017). No obstant, cal destacar que al llarg del temps s'observa una disminució de les taxes de mortalitat estandarditzades per edat per la MCV total (al voltant del 30% en homes i dones), a diferència d'altres malalties com les respiratòries que no disminueixen. Aquesta reducció de la mortalitat no només s'explica millores de l'assistència sanitària amb circuits assistencial, com el codi infart, i el desenvolupament de fàrmacs i tècniques de tractament, sinó també per canvis poblacionals d'estil de vida saludables, i d'envelliment de la població (Cinza Sanjurjo et al. 2017; Ruiz-García et al. 2018).

Així doncs, conèixer l'evolució i les tendències temporals d'aquestes malalties en la població d'Espanya, pot ajudar des d'un punt de vista de la gestió sanitària pública a elaborar una estratègia per la planificació dels serveis de salut, de les necessitats d'atenció mèdica, i finalment, per interpretar l'efectivitat de les campanyes sobre la salut

cardiovascular, mentre que des d'un punt de vista més científic, poden ajudar a plantejar hipòtesis per a múltiples treballs d'investigació bàsica, clínica i epidemiològica enfocats en la prevenció d'aquestes malalties (Vasan and Benjamin 2016).

Actualment, hi ha un interès creixent en recolzar els resultats de les investigacions per a que serveixin de guia en la presa de decisions basada en l'evidència, i aplicar aquesta informació tant en la prevenció com en el tractament de les MCV (Dainis and Ashley 2018). Cal potenciar la recerca a diferents nivells, des de la recerca bàsica dels mecanismes moleculars i els factors genètics fins a la recerca clínica i epidemiològica amb l'anàlisi dels procediments diagnòstics i terapèutics o dels factors ambientals com són els estils de vida. De manera que si l'objectiu de la recerca és avançar en la comprensió i la capacitat de maneig d'aquestes MCV i assolir la disminució de les seves taxes de morbiditat i mortalitat, cal abordar la recerca en tots aquests nivells. En aquest sentit, la medicina de precisió és una estratègia de diagnòstic que integra la variabilitat individual de causa genètica, fisiològica o patològica, el medi ambient i l'estil de vida de cada persona per a centrar-se en la prevenció i el tractament de les malalties cardiovasculars (Leopold and Loscalzo 2018). Aquest enfoc aprofita les ciències emergents (genètica i genòmica), la tecnologia digital i les ciències de la comunicació, i els determinants socials de la salut (Vasan and Benjamin 2016). Per tant, la perspectiva de la medicina de precisió i la de la salut pública han de ser dos estratègies sanitàries complementàries en l'abordatge de les malalties cardiovasculars.

#### **4.2. Relació entre la variació de la regió control del genoma mitocondrial i la susceptibilitat a desenvolupar un IM o un ACV.**

L'IM i l'ACV constitueixen dues de les principals causes de mort a l'estat espanyol i de manera similar que en altres patologies d'origen multifactorial, el seu inici, progressió i severitat es poden veure modificades per múltiples factors extrínsecs e intrínsecs com són els factors ambientals, hormonals i en cada pacient es poden veuen implicats múltiples gens. D'aquesta manera, la influència del component genètic en les MCV no és encara del tot clara, però la seva investigació ha permès aportar noves dades a la fisiopatologia de la malaltia, procurar nous elements de diagnòstic i prevenció així com identificar noves dianes terapèutiques més enllà de les probes actuals dels factors de risc clàssics (Dainis and Ashley 2018).

Tot i que existeixi un nombre molt elevat de polimorfismes nuclears considerats factors de risc genètic per a la MCV, aquests poden ajudar a explicar només una part de la variabilitat de les manifestacions clíniques de l'IM i l'ACV. Les mutacions del genoma mitocondrial, que sovint se'ls hi ha atorgat un paper secundari, han passat a ser l'objectiu de nombrosos estudis degut al paper de la mitocòndria en la producció d'energia, metabolisme, homeòstasi del calci i l'estrès oxidatiu. En aquest sentit, els capítols 2 [*Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: a case-control study in Castile and Leon (Spain) population*] i 3 [*The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction*] d'aquesta tesi, aborden els resultats del disseny d'un estudi cas-control realitzat amb la intenció de determinar la influència de determinats polimorfismes mitocondrials que podrien accelerar o ralentir el desenvolupament de dues de les MCV més freqüents, l'IM i l'ACV. En un primer enfocament, s'estudia l'associació amb dels haplogrups mitocondrials i en una segona fase,

s'investiga el paper dels SNPs mitocondrials de la regió control que actuen com a factors de risc independents als haplogrups.

**Haplogrups mitocondrials i malaltia cardiovascular.** En general, les variants definitòries d'haplogrup no són patològiques de *per se*, no obstant, si que poden modular el metabolisme mitocondrial (Krzywanski et al. 2016). Degut a que el cor i el cervell tenen la taxa més elevada de consum d'oxigen en el cos, petites diferències en l'eficiència del transport d'energia en aquests teixits podrien conduir a importats efectes fisiològics (Pittman 2016). En aquest sentit, el deteriorament de la funció mitocondrial resultant d'una variació de l'ADN mitocondrial i/o nuclear es probable que contribueixi a un desequilibri de la homeòstasi de la energia cel·lular, augmenti la vulnerabilitat a l'estrès oxidatiu i el deteriorament de la producció d'ATP que s'ha relacionat amb desenvolupament dels esdeveniments cardiovasculars (Bray and Ballinger 2017). De fet, en el treball realitzat en el capítol 2 s'han trobat associacions significatives entre l'haplogrup mitocondrial H i el desenvolupament de l'IM. Tot i no haver estat possible demostrar estadísticament aquesta associació entre els casos d'ACV i els controls, existeix una tendència a l'augment del percentatge d'H en els casos d'ACV (51,3%) en comparació amb els controls (42,9%), el que indicaria que l'haplogrup H també podria actuar com un factor de risc per a l'ACV.

Són varis els estudis que han demostrat l'associació entre l'haplogrup H i el desenvolupament de certs esdeveniments cardiovasculars. Rosa et al. (2008) van reportar una freqüència més elevada de la variant m.7028C>T, definitòria de l'haplogrup H, en els pacients portuguesos amb risc d'ACV en comparació als controls. L'haplogrup H s'ha relacionat també amb l'IM precoç en població asturiana (Palacin et al. 2011) i esdevé un factor de risc genètic per el desenvolupament de la CI (Fernández-Caggiano et al. 2012), la miocardiopatia dilatada (Fernandez-Caggiano et al. 2013) i podria participar en el desenvolupament de l'estenosis aòrtica greu (Serrano et al. 2018) en població espanyola. Hagen et al. (2013) també van reportar una associació entre l'haplogrup H i la miocardiopatia hipertròfica en població danesa, mentre que aquesta malaltia també s'ha relacionat amb l'haplogrup T en població asturiana (Castro et al. 2006). L'haplogrup T també s'ha associat amb el risc d'arteriopatia coronària en població d'Àustria (Kofler et al. 2009), i l'haplogrup U amb el risc d'augmentar la probabilitat de desenvolupar un ACV de tipus isquèmic (Finnila et al. 2001; Hudson et al. 2014; Martikainen and Majamaa 2010).

Les diferències observades entre aquests estudis es poden produir a causa de les característiques específiques de les poblacions analitzades. Per exemple trobem treballs com el de Kofler et al. (2009) que van trobar una major freqüència de l'haplogrup T en pacients austríacs amb arteriopatia coronària, mentre que per aquesta mateixa malaltia Fernández-Caggiano et al. (2012) va detectar associacions significatives per l'haplogrup J en població espanyola. En el nostre estudi, en canvi, no es van trobar diferències en les freqüències dels haplogrups T i J entre casos i controls. Existeixen, per tant, una sèrie de factors associats a la població d'estudi, com l'especificitat geogràfica dels subhaplogrups i altres factors com l'estil de vida, l'efecte de l'estratificació en la població i la mida de la mostra que poden influir en els resultats dels estudis d'associació i que probablement poden explicar les discrepàncies entre els diferents estudis (Hellwege et al. 2017). No obstant, els resultats obtinguts en relació a l'haplogrup H van ser consistents amb els d'altres estudis d'associació (Fernández-Caggiano 2012; 2013; Hagen et al. 2013; Hudson et al, 2014; Palacin et al. 2011) realitzats en altres poblacions espanyoles i europees, on l'haplogrup H abarca més del 40% de la variació total de l'ADNmt. Demostrant, per tant, que existeix una



associació sòlida entre l'haplogrup H i la susceptibilitat a desenvolupar un esdeveniment cardiovascular. Tanmateix, aquests tipus d'estudis també s'han realitzat en altres poblacions no europees, on la freqüència de l'haplogrup H és baixa. En aquest sentit, són varis els estudis que han trobat associació entre algun dels haplogrups específics d'Àsia i les MCV. Nishigaki et al. (2007b) van reportar que l'haplogrup A podria actuar com un factor de risc per l'ACV aterotrombòtic, a més, aquest mateix haplogrup juntament amb l'haplogrup M7a, també confereixen un risc significatiu d'aterosclerosi coronària (Sawabe et al. 2011). En la mateixa línia, l'haplogrup D4b també pot actuar com un factor protector contra l'ACV de tipus isquèmic (Yang et al. 2014). Per tant, aquests resultats posen de manifest la importància que té la composició genètica d'una població alhora de determinar les possibles causes relacionades amb el desenvolupament d'una malaltia.

En relació als haplogrups mitocondrials i els FRC, l'anàlisi realitzada en el capítol 2 va considerar com la hipertensió, la diabetis, la hipercolesterolèmia, el sobrepès u obesitat, el perímetre abdominal i els nivells de triglicèrids, de manera similar al que s'ha observat en altres estudis (Ruiz-García et al. 2018), s'associen independentment al risc de desenvolupar una cardiopatia isquèmica o un accident cerebrovascular. No obstant, quan es va analitzar la freqüència d'aquests factors estratificats per haplogrups, només l'haplogrup J presentava una elevada freqüència en els individus no hipertensius, indicant que posseir aquest haplogrup disminueix el risc d'hipertensió.

Aquests resultats estan en concordança amb els presentats en altres estudis realitzats prèviament en població europea (Nardelli et al. 2013; Rea et al. 2013). Tanmateix, s'han trobat d'altres associacions entre factors de risc clàssics com l'obesitat i l'haplogrup T (Ebner et al. 2015) i el clúster JT amb una deficiència en el control glucèmic relacionat amb diabetis mellitus de tipus 2 (Diaz-Morales et al. 2018). Per tant, això demostra que la influència del genotip mitocondrial no es relaciona amb la malaltia cardiovascular directament.

**SNPs mitocondrials i malaltia cardiovascular.** Una de les troballes més significatives d'aquesta tesi és la descripció, en el capítol tres, de cinc variants genètiques mitocondrials que estan situades a les regió control de l'ADNmt. Dues d'aquestes variants determinen un potencial factor de risc genètic per a l'ACV (m.16145G>A i m.16311T>C); mentre que les altres tres (m.72T>C, m.73A>G i m.16356T>C) actuen com a factors de protecció en relació a l'IM. Aquests SNPs mitocondrials no formen part de la col·lecció de polimorfismes que defineixen un haplogrup mitocondrial concret, i per tant, actuen com a factors de risc independents del haplogrup.

El paper de la RC de l'ADNmt és molt important per la regulació de l'expressió gènica d'aquest ADN. Es tracta d'una regió no codificant, de manera que un canvi en la seva seqüència no afectarà directament l'estabilitat de la cadena d'electrons, sinó que pot alterar els processos de replicació i transcripció mitocondrial, modulant el nombre de còpies d'ADNmt, disminuint el ràtio ATP:ADP e incrementant la producció de ROS (Huang et al. 2016a; Tsutsui et al. 2008). En aquests sentit, la transició 16145G>A i la 16311T>C, que es situen en la regió TAS (seqüència de terminació) i la regió entre els elements de control mt5 i mt3I, respectivament, són posicions d'una gran importància biològica (Nicholls and Minczuk 2014; Pereira et al. 2008). A més, el fet d'haver observat que la posició m.16311T>C implica una reducció de l'estabilitat de l'estructura secundària de la regió control, suggereix que en el nostre estudi aquestes posicions també puguin ser responsables d'alterar la intensitat dels processos de replicació i transcripció del genoma mitocondrial per acabar participant en el desenvolupament de l'ACV. No obstant, encara no estar del tot clar com els SNP d'aquesta

regió reguladora de la transcripció augmenten el risc de MCV, tot i que aquestes variants també s'han detectat en diferents tipus de càncers (Akouchejian et al. 2009; Chen et al. 2002; Silkjaer et al. 2013).

En aquets mateix capítol s'observa que les variants 72T>C, 73A>G i 16356T>C actuen com a factors beneficiosos per a l'IM. Malgrat que aquestes variants també hagin estat relacionades en diferents estudis amb el càncer de pròstata (Kalsbeek et al. 2017), renal (Bai et al. 2014) i d'ovari (Liu et al. 2016b), la seva ampla distribució en l'arbre filogenètic després d'haver estat sota pressió selectiva milers d'anys, no suggereix directament la possibilitat de que tinguin un efecte patogènic. En tot cas, aquests resultats corroboren que les mutacions de la RC mitocondrial puguin mostrar diferents efectes, de risc o beneficiosos, en diferents malalties (Hudson et al. 2014).

És evident que la etiologia de la MCV és complexa, i la mitocòndria desenvolupa un paper fonamental en aquest procés. Les variants mitocondrials poden actuar sinèrgicament amb altres factors genètics i components ambientals, contribuint al desenvolupament de la malaltia. En efecte, i atès l'especificitat poblacional de l'ADNmt, les associacions observades en el capítol 3 haurien de ser replicades en una cohort del mateix entorn. No obstant, s'ha pogut observar que 3 de les posicions analitzades (m.16145G>A, m.16311T>C i m.16356T>C) presenten una distribució generalitzada a nivell mundial (<http://www.phylotree.org/>). És a dir, a excepció de les m.72T>C i m.73A>G que es poden observar en varis haplogrups europeus com l'HV i H, la resta es troben en diferents branques de la filogènia representatives dels haplogrups L1, L2, L3\* i M1 característics d'Àfrica; M5, M6, M31 i altres subgrups M característics del sud d'Àsia; A, C, D, G, N9 i F característics de l'est d'Àsia, inclús M29, Q, P i S característics del continent australià. Per aquest motiu, seria interessant poder comprovar si els nostres resultats són extrapolables a la resta de poblacions, ja que en un context genètic diferent, aquestes posicions podrien no presentar els mateixos efectes. Alhora, també s'ha de considerar en un futur realitzar anàlisis de la seqüència completa del genoma mitocondrial, que podran identificar tots aquells polimorfismes responsables del grau de desenvolupament de la MCV per a senyalar-los com a factors de risc o de protecció. De tota manera, amb els resultats obtinguts en aquest dos estudis es contribueix a la idea que el perfil genètic d'un individu és important per a l'avaluació del risc real en el desenvolupament d'una MCV.

#### **4.3. Potencial de les variants mitocondrials en la millora de la capacitat de discriminació del risc cardiovascular. Nou score genètic mitocondrial.**

L'últim dels objectius generals d'aquesta tesi doctoral és el que es recull en el capítol 4 [*New mitochondrial genetic risk score improve discrimination capacity of cardiovascular events*] en el que es presenten i discuteixen els resultats obtinguts de la creació d'una nova puntuació de risc genètic associada al risc cardiovascular que inclou 5 variants mitocondrials. Aquest estudi té com a objectiu determinar la magnitud de l'associació entre una puntuació de risc individual basada en les posicions m.16145G>A; m.16311T>C; m.16356T>C; m.72T>C i m.73A>G i la presència de la MCV. Es tracta d'un treball innovador, ja que és el primer en avaluar l'ús d'una puntuació de risc que incorpora el genoma mitocondrial i que aconsegueix millorar significativament la capacitat de discriminació dels esdeveniments CV.

Avaluar el risc cardiovascular s'ha convertit en el mètode més acceptat per a la presa de decisions en la prevenció primària per als pacients sense malaltia cardiovascular. Actualment, la solució implementada en el sistema sanitari per a calcular el risc cardiovascular consisteix en la seva estimació a partir de funcions de risc clàssiques les quals utilitzen taules de risc cardiovascular per a prioritzar el nombre d'intervencions i per identificar els pacients amb un major risc (Piepoli et al. 2016). Durant anys, els factors de risc clàssic han permès als clínics classificar el risc global individual en la pràctica clínica diària d'una manera relativament acceptable; no obstant, no es pot perdre de vista que continua existint una gran proporció d'individus que han patit un esdeveniment cardiovascular però que només tenen un o pocs d'aquests factors de risc. En aquest sentit, fer una predicció del risc es dificulta encara més en individus joves, quan el moment d'aparició de l'esdeveniment cardiovascular coincideix amb tenir un nombre reduït d'aquests factors. Actualment, a Espanya, els metges d'atenció primària acostumen a utilitzar diferents mètodes de càlcul, ja que encara existeix la discussió sobre quina és l'equació més adequada per emprar en la població general del nostre entorn, entre les quals s'hi troben les de Framingham originals (Wilson et al. 1998), les de Framingham calibrades per a la població espanyola (REGICOR) (Marrugat et al. 2007) i les SCORE (Sans et al. 2007).

La millora del càlcul del risc té un valor clínic molt elevat, tant per a la predicció del risc de la MCV com alhora d'establir prioritats en prevenció primària. Tanmateix, és difícil d'obtenir ja que les funcions basades en els factors de risc clàssics es caracteritzen per tenir una baixa sensibilitat. Les equacions de risc disponibles per si soles són un mètode bastant imprecís per predir el risc individual, ja que diferents estudis prospectius (Marrugat et al. 2003a; Ramos et al. 2003; Sans et al. 2007) varen mostrar que sovint sobreestimen el risc d'ACV i CI en poblacions amb baixes taxes de morbiditat cardiovascular com és l'espanyola. La millora en la predicció del risc va fer créixer l'interès en analitzar diferents biomarcadors amb la finalitat de progressar en la reclassificació e identificar els individus que tindran un esdeveniment. Mentre que la mesura al llarg del temps de biomarcadors com el colesterol total pot millorar aquesta predicció, s'ha observat que l'exposició de per vida als factors de risc cardiovasculars es captura millor tenint en compte la susceptibilitat genètica (Voight et al. 2012). Per aquest motiu, actualment la cerca s'ha centrat en el desenvolupament de les puntuacions de risc genètic (Dainis and Ashley 2018).

La millora de l'àrea sota la corba ROC respecta a l'àrea vinculada a la dels factors de risc tradicionals indica l'habilitat del nou biomarcador d'addicionar informació a la dels factors clàssics. La major part dels estudis que han avaluat el valor afegit d'incloure la informació genètica nuclear en les funcions de risc clàssiques (Anderson et al. 2010; Brautbar et al. 2009; Davies et al. 2010; de Vries et al. 2015; Ganna et al. 2013; Goldstein et al. 2014; Gransbo et al. 2013; Hughes et al. 2012; Iribarren et al. 2016; Isaacs et al. 2013; Kathiresan et al. 2008; Krarup et al. 2015; Lv et al. 2012; Lluís-Ganella et al. 2012; Morrison et al. 2007; Patel et al. 2012; Paynter et al. 2009; Paynter et al. 2010; Qi et al. 2011a; Qi et al. 2011b; Ripatti et al. 2010; Shiffman et al. 2011; Tada et al. 2016; Talmud et al. 2008; Thanassoulis et al. 2012; Tikkanen et al. 2013; Vaarhorst et al. 2012) van mostrar una major capacitat per identificar els individus amb un major risc, així com millores en la reclassificació dels individus en categories de risc, especialment en aquells amb risc moderat. No obstant, la majoria d'aquest no han trobat una millora en la capacitat de discriminació dels esdeveniments cardiovasculars (Elosua and Sayols-Baixeras 2017). Els resultats obtinguts en el nostre estudi van demostrar que la utilització d'una puntuació de risc genètic basada en SNPs mitocondrials va millorar la capacitat de discriminació de les MCV

(AUC>0.75) d'una manera similar a la dels SNPs nuclears prèviament provada en el test Cardio inCode® (Gendiag.exe). A més, aquesta capacitat de discriminació es va veure augmentada quan en el càlcul de la puntuació de risc es varen combinar les variables clíniques, els SNPs nuclears i els SNPs mitocondrials (AUC = 0.774 [95%CI: 0.733-0.817]), demostrant que l'addició de la informació genètica, en concret de les variants mitocondrials, millora la capacitat de discriminació de les malalties cardiovasculars.

Fins on sabem, aquest és el primer estudi en utilitzar SNPs mitocondrials en una puntuació de risc cardiovascular. En virtut del paper funcional de les mitocòndries en el metabolisme oxidatiu i en la producció de les espècies reactives de l'oxigen, s'ha de tenir en compte que les mutacions de l'ADN mitocondrial són potencials factors de risc candidats per a l'estudi de la MCV, ja que poden donar lloc a defectes replicatius i transcripcionals, i conseqüentment disfunció de la cadena respiratòria mitocondrial. Altrament, hem de tenir en compte que la metodologia estàndard utilitzada fins ara en el camp ha estat crear puntuacions de risc utilitzant únicament SNP nuclears provinents d'estudis d'associació del genoma complet (GWAS) replicables i amb un nivell de significació robusta ( $p > 5 \times 10^{-8}$ ) en cohorts extremadament grans (Liu et al. 2016a; Preuss et al. 2010). No obstant, l'inconvenient d'utilitzar únicament els SNPs nuclears més significatius podria devaluar altres variants amb efectes reals que no aconseguen els estrictes nivells de significació a nivell de tot el genoma (Smith et al. 2015). Per tant, tal i com s'explica a la discussió del capítol quatre, aquests SNPs mitocondrials associats a MCV són possibles candidats per a millorar la capacitat predictiva de les funcions de risc actuals. A més, tenint en compte l'especificitat poblacional de l'ADNmt, la nostra troballa podria fomentar, en un futur, als nous estudis a incloure aquestes variants en la creació de puntuacions de risc genètic conjuntament amb les variants nuclears tant en poblacions europees com en d'altres poblacions africanes i asiàtiques.

En aquest sentit, la nostra investigació ha donat lloc a la patent europea *Method for evaluating risk of cardiovascular disease*, amb número de referència: EP18382393 (Annex III). Aquesta incorpora part dels resultats continguts en els capítols tres i quatre de la present tesi doctoral, així com metodologia inèdita creada especialment per a la seva aplicació en futures comercialitzacions.

De tota manera, un aspecte crític a considerar en la utilitat d'aquesta o qualsevol altre puntuació genètica en el panorama actual, és el seu impacte en la pràctica clínica. El cribratge i l'assessorament genètic són eficaços en algunes condicions, recomanant-se el seu ús en la guia de prevenció cardiovascular espanyola per a la hipertensió (Whelton et al. 2018) i la hipercolesterolèmia familiar (Nayor and Vasan 2016). Però, un cop demostrat que les prediccions de les puntuacions de risc genètic superen a la dels factors de risc convencionals, perquè aquestes no s'incorporen a la pràctica clínica diària? La mateixa guia de prevenció cardiovascular comenta que degut a la falta d'acord sobre quins gens (i SNPs) s'han d'incloure en la puntuació de risc, els dubtes sobre com s'han de calcular els índex de risc genètic i la incertesa sobre la millora que suposen les prediccions de risc cardiovasculars, encara no se'n recomana el seu ús a Espanya (Piepoli et al. 2016). Altrament, també s'hauria de tenir en compte que la puntuació de risc tradicional, basada en dades recopilades prèviament, és efectivament gratuïta per el sistema nacional de salut espanyol.

Tot i que fer una puntuació de risc avui en dia tingui un cost addicional moderat, es raonable exigir que es demostrï un benefici en els resultats abans d'argumentar a favor

d'incrementar la despesa sanitària. No obstant, si entre els avantatges s'inclou que les variants genètiques només s'han de determinar una vegada a la vida a partir d'un mètode no invasiu, i que en el nostre cas, podrien millorar la rentabilitat de les proves genètiques degut a que només involucra el genotipat de cinc SNPs, és raonable pensar que en un futur la identificació de pacients amb risc elevat mitjançant tests genètics i la implementació de mesures preventives per evitar els episodis cardiovasculars reduiran els costos directes i indirectes d'aquests en el sistema sanitari (Leopold and Loscalzo 2018). A més, la facilitat amb la qual les dades genètiques són computables, permet una implementació directa i una millora de les puntuacions de risc genètic quan es disposi de més dades (Ng et al. 2009). Per tant, existeixen raons de pes per considerar la incorporació de les puntuacions de risc genètic en la pràctica clínica (Knowles and Ashley 2018).

Malgrat aquests resultats, algunes limitacions del nostre estudi s'han de tenir en compte. Primer, no ha estat possible fer una predicció del risc cardiovascular a 10 anys utilitzant una equació com la de REGICOR, degut a que la població analitzada parteix d'un estudi cas-control amb pacients que ja han patit un esdeveniment, i on la majoria dels individus estaven sent tractats amb fàrmacs antihipertensius i hipolipemians. Segon, tot i que en el capítol 4 també es va voler analitzar la capacitat de discriminació d'una puntuació de risc basada únicament en la combinació de les variables clíniques i el genoma mitocondrial (és a dir, sense SNPs nuclears) obtenint un  $AUC=0,764$  [95% CI: 0.722-0.806], aquest resultat finalment no es va considerar degut a que la comparativa de referència entre el model creat i validat prèviament per Gendiag.exe S.L. (Lluís-Ganella et al. 2012) i la utilitzada en aquest model no va ser l'equació de REGICOR, al no ser aplicable a la nostre mostra.

05



## Conclusions



### **Epidemiologia descriptiva de la malaltia cardiovascular (període 2000-2015)**

1. La cardiopatia isquèmica, les malalties cerebrovasculars i la insuficiència cardíaca segueixen sent la principal causa de mort i altes hospitalàries a Espanya. No obstant, en els darrers 15 anys s'ha aconseguit disminuir (al voltant del 30%) de les taxes de mortalitat estandarditzades per edat i el manteniment de la morbiditat cardiovascular en ambdós sexes.
2. Les millores en l'assistència sanitària i els canvis poblacionals en l'estil de vida saludables i d'envelliment de la població es reflecteixen en les anàlisis de les tendències de mortalitat i morbiditat cardiovascular. S'observa que les dones tenen menor risc coronari que els homes i, per tant, major probabilitat d'arribar a edats avançades en les quals la mortalitat per ictus, insuficiència cardíaca i malalties hipertensives és més freqüent.
3. La distribució geogràfica de la mortalitat per MCV sembla seguir un gradient decreixent del sud cap al nord. Tot i que encara no es coneixen amb exactitud quines són les raons que expliquen aquest patró, hi ha evidències que ho correlacionen amb canvis de les condicions de vida i hàbits socioculturals de l'àrea geogràfica de residència.
4. Aquestes diferències també s'han detectat per a les taxes de morbiditat hospitalària, on sembla ser que la grandària de la població, l'estructura d'edat de cada comunitat autònoma o la variació en l'eficàcia de detecció i diagnòstic de les MCV, podrien explicar algunes de les diferències observades.

### **Variació del genoma mitocondrial i malaltia cardiovascular**

5. L'associació entre els haplogrups mitocondrials i les malalties cardiovasculars revela que l'haplogrup mitocondrial H podria actuar com un potencial factor de



risc genètic en el desenvolupament de l'infart de miocardi. Tot i que ningun dels haplogrups va augmentar significativament el risc de desenvolupar un accident cerebrovascular, una comparació de les dades obtingudes entre els grups amb infart de miocardi i accident cerebrovascular permet suggerir que l'haplogrup H podria actuar com un factor de susceptibilitat genètica per ambdós malalties.

6. L'associació entre els haplogrups mitocondrials i els factors de risc cardiovasculars suggereix un paper beneficiós de l'haplogrup J contra la hipertensió.
7. Les variants m.16.145G>A i m.16.311T>C podrien actuar com possibles factors de risc genètic de l'accident cerebrovascular.
8. Les variants m.72T>C, m.73A>G i m.16.356T>C podrien actuar com a possibles factors genètics beneficiosos per a l'infart de miocardi.

### **Puntuació de risc genètic utilitzant variants mitocondrials**

9. La utilització d'una puntuació de risc genètic basada en SNPs mitocondrials va millorar significativament la capacitat de discriminació dels esdeveniments cardiovasculars més enllà de la informació proporcionada per els factors de risc clàssics i els SNPs nuclears.
10. La puntuació de risc genètic basada en SNP nuclears descrita per Lluís-Granella et al. (2012) i utilitzada únicament per analitzar la millora en la capacitat de discriminació de la cardiopatia coronària, també ha demostrat la seva utilitat en la malaltia cardiovascular (específicament per l'infart de miocardi i l'accident cerebrovascular) en la població d'estudi.
11. Aquest és el primer treball on s'incorpora la informació de l'ADN mitocondrial en una puntuació de risc genètic per analitzar els esdeveniments cardiovasculars. Tenint en compte la poca informació prèvia disponible, es difícil estimar quina serà la implicació clínica de l'addició d'aquests factors genètics en la discriminació i reclassificació del risc cardiovascular.

06



## Bibliografia



- Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mousa A, Gonzalez AM, Larruga JM, Cabrera VM, et al. 2010. The mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs. *Genet Test Mol Biomarkers* 14(1):43-47.
- Abu-Amero KK, Larruga JM, Cabrera VM, and González AM. 2008. Mitochondrial DNA structure in the Arabian Peninsula. *BMC Evol Biol* 8(1):45.
- Abraham G, Havulinna AS, Bhalala OG, Byars SG, De Livera AM, Yetukuri L, et al. 2016. Genomic prediction of coronary heart disease. *Eur Heart J*. 37(43):3267–3278.
- Achilli A, Rengo C, Battaglia V, Pala M, Olivieri A, Fornarino S, et al. 2005. Saami and Berbers—An Unexpected Mitochondrial DNA Link. *Am J Hum Genet* 76(5):883-886.
- Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, et al. 2004. The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms That the Franco-Cantabrian Glacial Refuge Was a Major Source for the European Gene Pool. *Am J Hum Genet* 75(5):910-918.
- Adegbija O, Hoy W, and Wang Z. 2015. Prediction of cardiovascular disease risk using waist circumference among Aboriginals in a remote Australian community. *BMC Public Health* 15:57.
- Agaronyan K, Morozov YI, Anikin M, and Temiakov D. 2015. Mitochondrial biology. Replication-transcription switch in human mitochondria. *Sci* 347(6221):548-551.
- Akouchekian M, Houshmand M, Hemati S, Ansaripour M, and Shafa M. 2009. High rate of mutation in mitochondrial DNA displacement loop region in human colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 52(3):526-530.
- Anderson JL, Horne BD, Camp NJ, Muhlestein JB, Hopkins PN, Cannon-Albright LA, et al. 2010. Joint effects of common genetic variants from multiple genes and pathways on the risk of premature coronary artery disease. *Am Heart J* 160(2):250-256 e253.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290(5806):457-465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, and Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genet* 23(2):147.
- Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, Ramos-Carrera N, and Lázaro-Masedo S. 2016. Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. *Rev Esp Cardiol* 69(06):579-587.
- Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Foz Sala M, Mantilla T, Serra Majem L, Moreno B, et al. 2004. Tablas de evaluación del riesgo coronario adaptadas a la población española. Estudio DORICA. *Medicina Clínica* 123(18):686-691.
- Ashar FN, Zhang Y, Longchamps RJ, Lane J, Moes A, Grove ML, et al. 2017. Association of Mitochondrial DNA Copy Number With Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiol* 2:1247–1255

- Assmann G, Cullen P, and Schulte H. 2002. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 105(3):310-315.
- Baena Díez JM, Álvarez Pérez B, Piñol Forcadell P, Martín Peñacoba R, Sabaté MN, and Boronat AA. 2002. Asociación entre la agrupación (clustering) de factores de riesgo cardiovascular y el riesgo de enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Salud Pública* 76:07-15.
- Bai Y, Guo Z, Xu J, Zhang J, Cui L, Zhang H, et al. 2014. Association of sequence polymorphism in the mitochondrial D-loop with chronic kidney disease. *Renal failure* 36(5):781-784.
- Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhala N, P et al. 2010. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 376(9753):1670-1681.
- Bang OY, Lee PH, Yoon SR, Lee MA, Joo IS, and Huh K. 2005. Inflammatory markers, rather than conventional risk factors, are different between carotid and MCA atherosclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(8):1128-1134.
- Beaney K, Drenos F, and Humphries SE. 2017. How close are we to implementing a genetic risk score for coronary heart disease?. *Expert Rev Mol Diagn* 17(10):905-915.
- Beaney KE, Smith AJP, Folkersen L, Palmén J, Wannamethee SG, Jefferis BJ, et al. 2017. Functional Analysis of the Coronary Heart Disease Risk Locus on Chromosome 21q22. *Dis Markers* 2017:1096916.
- Beckstead WA, Ebbert MTW, Rowe MJ, and McClellan DA. 2009. Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome is consistent with a role of Cytb17T affecting longevity during caloric restriction. *PLoS one* 4(6):e5836.
- Behar DM, Harmant C, Manry J, van Oven M, Haak W, Martínez-Cruz B, et al. 2012. The Basque paradigm: genetic evidence of a maternal continuity in the Franco-Cantabrian region since pre-Neolithic times. *Am J Hum Genet* 90(3):486-493.
- Bellenguez C, Bevan S, Gschwendtner A, Spencer CC, Burgess AI, Pirinen M, et al. 2012. Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nat Genet* 44(3):328-333.
- Bernal-Mizrachi C, Gates AC, Weng S, Imamura T, Knutsen RH, DeSantis P, et al. 2005. Vascular respiratory uncoupling increases blood pressure and atherosclerosis. *Nat* 435(7041):502-506.
- Bevan S, Traylor M, Adib-Samii P, Malik R, Paul NL, Jackson C, F, et al. 2012. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genomewide associations. *Stroke* 43(12):3161-3167.
- Bodmer W, and Bonilla C. 2008. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 40(6):695-701.
- Bogenhagen DF. 1999. Repair of mtDNA in vertebrates. *Am J Hum Genet* 64(5):1276-1281.
- Boix Martínez R, Aragonés Sanz N, and Medrano Albero MJ. 2003. Tendencias en la mortalidad por cardiopatía isquémica en 50 provincias españolas. *Rev Esp Cardiol* 56(09):850-856.
- Bonawitz ND, Clayton DA, and Shadel GS. 2006. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell* 24(6):813-825.
- Bots SH, Peters SAE, and Woodward M. 2017. Sex differences in coronary heart disease and stroke mortality: a global assessment of the effect of ageing between 1980 and 2010. *BMJ Global Health* 2(2).

- Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, et al. 2003. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 278(51):50961-50969.
- Brandon M, Baldi P, and Wallace DC. 2006. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25(34):4647-4662.
- Bratic A, Kauppila TES, Macao B, Grönke S, Siibak T, Stewart JB, et al. 2015. Complementation between polymerase- and exonuclease-deficient mitochondrial DNA polymerase mutants in genomically engineered flies. *Nat Commun* 6:8808.
- Brautbar A, Ballantyne CM, Lawson K, Nambi V, Chambless L, Folsom AR, et al. 2009. Impact of adding a single allele in the 9p21 locus to traditional risk factors on reclassification of coronary heart disease risk and implications for lipid-modifying therapy in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circ Cardiovasc Genet* 2(3):279-285.
- Bray AW, and Ballinger SW. 2017. Mitochondrial DNA mutations and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 10.1097/HCO.0000000000000383.
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. 2001. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345(12):861-869.
- Breton S, and Stewart DT. 2015. Atypical mitochondrial inheritance patterns in eukaryotes. *Genome* 58(10):423-431.
- Burgess S, Ference BA, Staley JR, and et al. 2018. Association of lpa variants with risk of coronary disease and the implications for lipoprotein(a)-lowering therapies: A mendelian randomization analysis. *JAMA Cardiology* 3(7):619-627.
- Busiello RA, Savarese S, and Lombardi A. 2015. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol* 6:36-36.
- Cadenas S. 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859(9):940-950.
- Cai B, Zhang Z, Liu K, Fan W, Zhang Y, Xie X, et al. 2015. Mitochondrial DNA haplogroups and short-term neurological outcomes of ischemic stroke. *Sci Rep* 5:9864.
- Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, et al. 2015. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 372(25):2387-2397.
- Cardena MM, Mansur AJ, Pereira Ada C, and Fridman C. 2013. A new duplication in the mitochondrially encoded tRNA proline gene in a patient with dilated cardiomyopathy. *Mitochondrial DNA* 24(1):46-49.
- Carelli V, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O, Pala M, et al. 2006. Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Am J Hum Genet* 78(4):564-574.
- Casas JP, Cooper J, Miller GJ, Hingorani AD, and Humphries SE. 2006. Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies. *Ann Hum Genet* 70(Pt 2):145-169.
- Castro MG, Huerta C, Reguero JR, Soto MI, Domenech E, Alvarez V, et al. 2006. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 112(2):202-206.
- Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, et al. 2016. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* 37(39):2999-3058.
- Cavero-Redondo I, Peleteiro B, Álvarez C, Rodríguez F, and Martínez V. 2017. Glycated haemoglobin A1c as a risk factor of cardiovascular outcomes and all-cause mortality in

- diabetic and non-diabetic populations: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7(7):e015949.
- Christiansen MK, Nyegaard M, Larsen SB, Grove EL, Würtz M, Neergaard-Petersen S, et al. 2017. A genetic risk score predicts cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. *Int J Cardiol* 241:411-416.
- Cinza Sanjurjo S, Prieto Díaz MÁ, Llisterri Caro JL, Pallarés Carratalá V, Barquilla García A, et al. 2017. Características basales y manejo clínico de los primeros 3.000 pacientes incluidos en el estudio IBERICAN (Identificación de la población española de riesgo cardiovascular y renal). *SEMERGEN - Medicina de Familia* 43(7):493-500.
- Clayton DA. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28(4):693-705.
- Cluett TJ, Akman G, Reyes A, Kazak L, Mitchell A, Wood SR, et al. 2018. Transcript availability dictates the balance between strand-asynchronous and strand-coupled mitochondrial DNA replication. *Nucleic Acids Res* 46(20):10771-10781.
- Cogliati S, Lorenzi I, Rigoni G, Caicci F, and Soriano ME. 2018. Regulation of Mitochondrial Electron Transport Chain Assembly. *J Mol Biol* 430(24):4849-4873.
- Cooke Bailey JN, and Igo RP, Jr. 2016. Genetic Risk Scores. *Curr Protoc Hum Genet* 91:1.29.21-21.29.29.
- Cordero A, and Fácila L. 2015. Situación actual de la dislipemia en España: la visión del cardiólogo. *Rev Esp Cardiol* 15(Supl.A):2-7.
- Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. 2011. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43(4):339-44
- Crews S, Ojala D, Posakony J, Nishiguchi J, and Attardi G. 1979. Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nat* 277:192.
- Critchley JA, and Capewell S. 2012. WITHDRAWN: Smoking cessation for the secondary prevention of coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev* 15(2):CD003041.
- Chang J-C, Kou S-J, Lin W-T, and Liu C-S. 2010. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World J Cardiol* 2(6):150-159.
- Chapman JM, Goerke LS, Dixon W, Loveland DB, and Phillips E. 1957. Measuring the risk of coronary heart disease in adult population groups. The clinical status of a population group in Los Angeles under observation for two to three years. *Am J Public Health Nations Health* 47(4 Pt 2):33-42.
- Chaubey G, Metspalu M, Kivisild T, and Villems R. 2007. Peopling of South Asia: investigating the caste-tribe continuum in India. *Bioessays* 29(1):91-100.
- Chauhan G, Arnold C, Chu A, Fornage M, Reyahi A, Bis J, et al. 2016. Identification of additional risk loci for stroke and small vessel disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol* 15(7):695-707.
- Chen A, Raule N, Chomyn A, and Attardi G. 2012. Decreased Reactive Oxygen Species Production in Cells with Mitochondrial Haplogroups Associated with Longevity. *PLoS one* 7(10):e46473.
- Chen JY, Ye ZX, Wang XF, Chang J, Yang MW, Zhong HH, Hong FF, and Yang SL. 2018. Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. *Biomed Pharmacother* 97:423-428.
- Chen JZ, Gokden N, Greene GF, Mukunyadzi P, and Kadlubar FF. 2002. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res* 62(22):6470-6474.

- Chen YR, and Zweier JL. 2014. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 114(3):524-537.
- Chinnery PF, Elliott HR, Syed A, and Rothwell PM. 2010. Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. *Lancet Neurol* 9(5):498-503.
- Chinnery PF, Mowbray C, Patel SK, Elson JL, Sampson M, Hitman GA, et al. 2007. Mitochondrial DNA haplogroups and type 2 diabetes: a study of 897 cases and 1010 controls. *J Med Genet* 44(6):e80.
- D'Agostino RB, Grundy S, Sullivan LM, and Wilson P. 2001. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *Jama* 286(2):180-187.
- D'Armiento FP, Bianchi A, de Nigris F, Capuzzi DM, D'Armiento MR, Crimi G, et al. 2001. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke* 32(11):2472-2479.
- D'Souza AR, and Minczuk M. 2018. Mitochondrial transcription and translation: overview. *Essays Biochem* 62(3):309-320.
- Dainis AM, and Ashley EA. 2018. Cardiovascular Precision Medicine in the Genomics Era. *JACC Basic Transl Sci* 3(2):313-326.
- Davies R, Dandona S, Stewart A, Chen L, Ellis S, T. W, et al. 2010. Improved Prediction of Cardiovascular Disease Based on a Panel of Single Nucleotide Polymorphisms Identified Through Genome-Wide Association Studies. *Circulation* 121(5):468-474.
- Dawber TR, Meadors GF, and Moore FE. 1951. Epidemiological Approaches to Heart Disease: The Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health* 41(3):279-286.
- De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, et al. 1999. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J* 13(12):1532-1536.
- de Vries PS, Kavousi M, Ligthart S, Uitterlinden AG, Hofman A, Franco OH, et al. 2015. Incremental predictive value of 152 single nucleotide polymorphisms in the 10-year risk prediction of incident coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Int J Epidemiol* 44(2):682-688.
- DeLong ER, DeLong DM, and Clarke-Pearson DL. 1988. Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach. *Biometrics* 44(3):837-845.
- Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. 2013. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 45(1):25-33.
- Derenko M, Malyarchuk B, Bahmanimehr A, Denisova G, Perkova M, Farjadian S, et al. 2013. Complete mitochondrial DNA diversity in Iranians. *PloS one* 8(11):e80673.
- Diaz-Morales N, Lopez-Domenech S, Iannantuoni F, Lopez-Gallardo E, Sola E, Morillas C, et al. 2018. Mitochondrial DNA Haplogroup JT is Related to Impaired Glycaemic Control and Renal Function in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Med* 7(8).
- Diebold L, and Chandel NS. 2016. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic Biol Med* 100:86-93.
- Do R, Stitzel NO, Won HH, Jorgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, et al. 2015. Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nat* 518(7537):102-106.
- Dorn G. 2018. Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. *Annu Rev Physiol* 81(1).



- Doyle JT, Heslin AS, Hilleboe HE, Formel PF, and Kornis RF. 1957. A prospective study of degenerative cardiovascular disease in Albany: report of three years' experience. I. Ischemic heart disease. *Am J Public Health Nations Health* 47(4 Pt 2):25-32.
- Dudylyna AL, Ivanova MV, Shumaev KB, and Ruuge EK. 2018. Superoxide Formation in Cardiac Mitochondria and Effect of Phenolic Antioxidants. *Cell Biochem Biophys* 2018(1).
- Ebner S, Mangge H, Langhof H, Halle M, Siegrist M, Aigner E, et al. 2015. Mitochondrial Haplogroup T Is Associated with Obesity in Austrian Juveniles and Adults. *PloS one* 10(8):e0135622.
- Edeas M. 2011. Strategies to Target Mitochondria and Oxidative Stress by Antioxidants: Key Points and Perspectives. *Pharm Res* 28(11):2771-2779.
- Eichler K, Puhan MA, Steurer J, and Bachmann LM. 2007. Prediction of first coronary events with the Framingham score: a systematic review. *Am Heart J* 153(5):722-731, 731 e721-728.
- Elosua R, Lluisa C, and Lucas G. 2009. Estudio del componente genético de la cardiopatía isquémica: de los estudios de ligamiento al genotipado integral del genoma. *Rev Esp Cardiol* 09(Supl.B):24-38.
- Elosua R, and Morales Salinas A. 2011. Determinación del riesgo cardiovascular total. Caracterización, modelización y objetivos de la prevención según el contexto sociogeográfico. *Rev Esp Cardiol* 11(Supl.E):2-12.
- Elosua R, and Sayols-Baixeras S. 2017. Genética de la cardiopatía isquémica: del conocimiento actual a las implicaciones clínicas. *Rev Esp Cardiol* 70(9):754-762.
- Enriquez JA. 2016. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol* 78:533-561.
- Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, et al. 2009. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet* 41(3):280-282.
- ESH/ESC. 2003. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21(6):1011-1053.
- Eurostat MaWp. 2013. Revision of the European Standard Population : report of Eurostat's task force : 2013 edition. In: Union LE, editor. Luxembourg.
- Falkenberg M. 2018. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays Biochem* 62(3):287-296.
- Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, et al. 2008. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Sci* 319(5865):958-962.
- Farrer S. 2018. Beyond Statins: Emerging Evidence for HDL-Increasing Therapies and Diet in Treating Cardiovascular Disease. *Ad Prev Med* 2018:6024747-6024747.
- Fernandez-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Perez I, Crespo-Leiro MG, Paniagua MJ, Grille Z, et al. 2013. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion* 13(4):263-268.
- Fernández-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Pérez I, Crespo-Leiro MG, Paniagua MJ, Grillé Z, et al. 2012. Mitochondrial Haplogroups H and J: Risk and Protective Factors for Ischemic Cardiomyopathy. *PloS one* 7(8):e44128.
- Filippatos TD, Florentin M, Georgoula M, and Elisaf MS. 2017. Pharmacological management of diabetic dyslipidemia. *Expert Rev Clin Pharmacol* 10(2):187-200.

- Finnila S, Hassinen IE, and Majamaa K. 2001. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke. Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region. *Mutat Res* 458(1-2):31-39.
- Floros VI, Pyle A, Dietmann S, Wei W, Tang WCW, Irie N et al. 2018. Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. *Nat Cell Biol* 20(2):144-151.
- Franchini M, Peyvandi F, and Mannucci PM. 2008. The genetic basis of coronary artery disease: from candidate genes to whole genome analysis. *Trends Cardiovas Med* 18(5):157-162.
- Fu Q, Mitnik A, Johnson PLF, Bos K, Lari M, Bollongino R, et al. 2013. A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. *Curr Biol* 23(7):553-559.
- Gabriel R, Brotons C, Tormo MJ, Segura A, Rigo F, Elosua R, et al. 2015. The ERICE-score: the new native cardiovascular score for the low-risk and aged Mediterranean population of Spain. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 68(3):205-215.
- Ganna A, Magnusson PK, Pedersen NL, de Faire U, Reilly M, Arnlov J, et al. 2013. Multilocus genetic risk scores for coronary heart disease prediction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(9):2267-2272.
- Garcia AL, Morillo-Santander G, Parrett A, and Mutoro AN. 2018. Misrepresentation of health and nutrition claims in food marketing to children could adversely affect food choice and increase risk of obesity. *Arch Dis Child*. pii: archdischild-2018-315870.
- Garlid AO, Jaburek M, Jacobs JP, and Garlid KD. 2013. Mitochondrial reactive oxygen species: which ROS signals cardioprotection? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305(7):H960-H968.
- Gaweł B, Głogowska-Ligus J, and Mazurek U. 2008. The G16319A substitution frequency in a hemorrhagic stroke. *Ann Indian Acad Neurol* 11(3):154-158.
- George J, Rapsomaniki E, Pujades-Rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, Herrett E, et al. 2015. How Does Cardiovascular Disease First Present in Women and Men? Incidence of 12 Cardiovascular Diseases in a Contemporary Cohort of 1,937,360 People. *Circulation* 132(14):1320-1328.
- Ghezzi D, and Zeviani M. 2018. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. *Essays Biochem* 62(3):271-286.
- Ghosh S, Crampin EJ, Hanssen E, and Rajagopal V. 2017. A computational study of the role of mitochondrial organization on cardiac bioenergetics. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC) 2017*:2696-2699.
- Ghosh S, Vivar J, Nelson CP, Willenborg C, Segre AV, Makinen VP, et al. 2015. Systems Genetics Analysis of Genome-Wide Association Study Reveals Novel Associations Between Key Biological Processes and Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(7):1712-1722.
- Gijón-Conde T, Gorostidi M, Camafort M, Abad M, Martín E, Morales F, et al. 2018. Documento de la Sociedad Española de Hipertensión - Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA) sobre las guías ACC/AHA 2017 de hipertensión arterial. *Hipertens Riesgo Vasc*. (in press).
- Giorgi C, Marchi S, and Pinton P. 2018. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(11):713-730.
- Goldsmith T. 2013. *The evolution of aging - how new theories will change the future of medicine*. Azinet press; 3 edition. 190p.

- Goldstein BA, Knowles JW, Salfati E, Ioannidis JP, and Assimes TL. 2014. Simple, standardized incorporation of genetic risk into non-genetic risk prediction tools for complex traits: coronary heart disease as an example. *Front Genet* 5:254.
- Golubenkov MV, Nazarenko MS, Frolov AV, Sleptsov AA, Markov AV, Glushkova ME, et al. 2016. Analysis of Heteroplasmy in the Major Noncoding Region of Mitochondrial DNA in the Blood and Atherosclerotic Plaques of Carotid Arteries. *Genetika* 52(4):497-502.
- Gómez-Durán A, Pacheu D, Lopez E, Diez C, Montoya J, Lopez MJ, et al. 2010. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19(17):3343-3353.
- González AM, García O, Larruga JM, and Cabrera VM. 2006. The mitochondrial lineage U8a reveals a Paleolithic settlement in the Basque country. *BMC Genom* 7:124-124.
- Gonzalez AM, Maceira BM, Perez E, Cabrera VM, Lopez AJ, and Larruga JM. 2012. Genetics, environment, and diabetes-related end-stage renal disease in the Canary Islands. *Genet Test Mol Biomarkers* 16(8):859-864.
- Goto Y, Nonaka I, and Horai S. 1990. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nat* 348(6302):651-653.
- Graciani A, Leon-Munoz LM, Guallar-Castillon P, Rodriguez-Artalejo F, and Banegas JR. 2013. Cardiovascular health in a southern Mediterranean European country: a nationwide population-based study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 6(1):90-98.
- Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, et al. 2007. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14 Suppl 2:E1-40.
- Gransbo K, Almgren P, Nilsson PM, Hedblad B, Engstrom G, and Melander O. 2016. Risk factor exposure in individuals free from cardiovascular disease differs according to age at first myocardial infarction. *Eur Heart J* 37(25):1977-1981.
- Gransbo K, Almgren P, Sjogren M, Smith JG, Engstrom G, Hedblad B, et al. 2013. Chromosome 9p21 genetic variation explains 13% of cardiovascular disease incidence but does not improve risk prediction. *J Intern Med* 274(3):233-240.
- Greaves LC, Nootboom M, Elson JL, Tuppen HA, Taylor GA, Commane DM, et al. 2014. Clonal expansion of early to mid-life mitochondrial DNA point mutations drives mitochondrial dysfunction during human ageing. *PLoS Genet* 10(9):e1004620.
- Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, et al. 2007. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nat* 448(7151):353-357.
- Gudbjartsson DF, Bjornsdóttir US, Halapi E, Helgadóttir A, Sulem P, Jonsdóttir GM, et al. 2009a. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* 41(3):342-347.
- Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdóttir S, Thorleifsson G, Walters GB, Thorgeirsson G, et al. 2009b. A sequence variant in ZFX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet* 41(8):876-878.
- Gungor NK. 2014. Overweight and obesity in children and adolescents. *J Clin Res Ped Endocrinol* 6(3):129-143.
- Guo Y, Jiang X, Chen S, Zhang S, Zhao H, and Wu Y. 2003. Aortic arch and intra-/extracranial cerebral arterial atherosclerosis in patients suffering acute ischemic strokes. *Chin Med J (Engl)* 116(12):1840-1844.

- Gustafsson CM, Falkenberg M, and Larsson NG. 2016. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 85:133-160.
- Hackshaw A, Morris JK, Boniface S, Tang J-L, and Milenković D. 2018. Low cigarette consumption and risk of coronary heart disease and stroke: meta-analysis of 141 cohort studies in 55 study reports. *BMJ* 360:j5855-j5855.
- Hagen CM, Aidt FH, Hedley PL, Jensen MK, Havndrup O, Kanters JK, et al. 2013. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS one* 8(8):e71904.
- Hartley A, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkil MB, Maruthappu M, and Shalhoub J. 2016. Trends in Mortality From Ischemic Heart Disease and Cerebrovascular Disease in Europe: 1980 to 2009. *Circulation* 133(20):1916-1926.
- He Y, Wu J, Dressman DC, Iacobuzio-Donahue C, Markowitz SD, Velculescu VE, et al. 2010. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nat* 464(7288):610-614.
- Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdóttir S, Steinthorsdóttir V, Manolescu A, et al. 2008. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet* 40(2):217-224.
- Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, et al. 2007. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Sci* 316(5830):1491-1493.
- Hellwege JN, Keaton JM, Giri A, Gao X, Velez Edwards DR, and Edwards TL. 2017. Population Stratification in Genetic Association Studies. *Curr Prot Hum Genet* 95:1.22.1-1.22.23.
- Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, and Labuda D. 2001. Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of control region mutations in deep-rooting pedigrees. *Am J Hum Genet* 69(5):1113-1126.
- Hippisley-Cox J, Coupland C, Robson J, and Brindle P. 2010. Derivation, validation, and evaluation of a new QRISK model to estimate lifetime risk of cardiovascular disease: cohort study using QResearch database. *BMJ* 341.
- Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, Robson J, May M, and Brindle P. 2007. Derivation and validation of QRISK, a new cardiovascular disease risk score for the United Kingdom: prospective open cohort study. *BMJ* 335(7611):136.
- Hollands GJ, French DP, Griffin SJ, Prevost AT, Sutton S, King S, et al. 2016. The impact of communicating genetic risks of disease on risk-reducing health behaviour: systematic review with meta-analysis. *BMJ* 352:i1102.
- Holliday EG, Maguire JM, Evans TJ, Koblar SA, Jannes J, Sturm JW, et al. 2012. Common variants at 6p21.1 are associated with large artery atherosclerotic stroke. *Nat Genet* 44(10):1147-1151.
- Holt IJ, Lorimer HE, and Jacobs HT. 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100(5):515-524.
- Howson JMM, Zhao W, Barnes DR, Ho WK, Young R, Paul DS, et al. 2017. Fifteen new risk loci for coronary artery disease highlight arterial-wall-specific mechanisms. *Nat Genet* 49(7):1113-1119.
- Huang M-E, Facca C, Fatmi Z, Baille D, Bénakli S, and Vernis L. 2016a. DNA replication inhibitor hydroxyurea alters Fe-S centers by producing reactive oxygen species in vivo. *Scientific Reports* 6:29361.

- Huang J, Tan L, Shen R, Zhang L, Zuo H, and Wang DW. 2016b. Decreased Peripheral Mitochondrial DNA Copy Number is Associated with the Risk of Heart Failure and Long-term Outcomes. *Med* 95(15):e3323.
- Hublin JJ, Ben-Ncer A, Bailey SE, Freidline SE, Neubauer S, Skinner MM, et al. 2017. New fossils from Jebel Irhoud, Morocco and the pan-African origin of *Homo sapiens*. *Nat* 546(7657):289-292.
- Hudson G, Gomez-Duran A, Wilson IJ, and Chinnery PF. 2014. Recent Mitochondrial DNA Mutations Increase the Risk of Developing Common Late-Onset Human Diseases. *PLoS Genet* 10(5):e1004369.
- Hughes MF, Saarela O, Stritzke J, Kee F, Silander K, Klopp N, et al. 2012. Genetic Markers Enhance Coronary Risk Prediction in Men: The MORGAM Prospective Cohorts. *PLoS one* 7(7):e40922.
- Humphries SE, Drenos F, Ken-Dror G, and Talmud PJ. 2010. Coronary heart disease risk prediction in the era of genome-wide association studies: current status and what the future holds. *Circulation* 121(20):2235-2248.
- Hyvarinen AK, Pohjoismaki JL, Reyes A, Wanrooij S, Yasukawa T, Karhunen PJ, et al. 2007. The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 35(19):6458-6474.
- ICBP-GWAS TICfBPG-WAS. 2011. Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk. *Nature* 478(7367):103-109.
- Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. 2001. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88(5):529-535.
- IHME, Institute for Health Metrics and Evaluation. 2016. GBD Compare Data Visualization. Seattle, WA: IHME, University of Washington.
- Inouye M, Abraham G, Nelson CP, Wood AM, Sweeting MJ, Dudbridge F, et al. 2018. Genomic Risk Prediction of Coronary Artery Disease in 480,000 Adults. Implications for Primary Prevention. *J Am Coll Cardiol* 72(16):1883-1893.
- Iribarren C, Lu M, Jorgenson E, Martinez M, Lluís-Ganella C, Subirana I, et al. 2016. Clinical Utility of Multimarker Genetic Risk Scores for Prediction of Incident Coronary Heart Disease: A Cohort Study Among Over 51 Thousand Individuals of European Ancestry. *Circ Cardiovasc Genet* 9(6):531-540.
- Irwin JA, Saunier JL, Niederstatter H, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, et al. 2009. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol* 68(5):516-527.
- Isaacs A, Willems SM, Bos D, Dehghan A, Hofman A, Ikram MA, et al. 2013. Risk scores of common genetic variants for lipid levels influence atherosclerosis and incident coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(9):2233-2239.
- Itsara LS, Kennedy SR, Fox EJ, Yu S, Hewitt JJ, Sanchez-Contreras M, et al. 2014. Oxidative Stress Is Not a Major Contributor to Somatic Mitochondrial DNA Mutations. *PLOS Genetics* 10(2):e1003974.
- Ivanovic B, and Tadic M. 2015. Hypercholesterolemia and Hypertension: Two Sides of the Same Coin. *Am J Cardiovasc Drugs* 15(6):403-414.
- Janssens AC, Moonesinghe R, Yang Q, Steyerberg EW, van Duijn CM, and Khoury MJ. 2007. The impact of genotype frequencies on the clinical validity of genomic profiling for predicting common chronic diseases. *Genet Med* 9(8):528-535.

- Jemt E, Persson O, Shi Y, Mehmedovic M, Uhler JP, Davila Lopez M, et al. 2015. Regulation of DNA replication at the end of the mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE and a conserved sequence element. *Nucleic Acids Res* 43(19):9262-9275.
- Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, et al. 2014. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *eLife* 3:e02935.
- Juarez-Rojas JG, Posadas C, Martinez R, Jorge E, Reyes J, Sanchez LG, et al. 2018. Type 2 Diabetes Mellitus is Associated with Carotid Artery Plaques in Patients with Premature Coronary Heart Disease. *Rev Invest Clin* 70(6):301-309.
- Kachur S, Lavie CJ, de Schutter A, Milani RV, and Ventura HO. 2017. Obesity and cardiovascular diseases. *Minerva Med* 108(3):212-228.
- Kadenbach B. 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604(2):77-94.
- Kalogeris T, Bao Y, and Korthuis RJ. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* 2(0):702-714.
- Kalsbeek AMF, Chan EKF, Corcoran NM, Hovens CM, and Hayes VM. 2017. Mitochondrial genome variation and prostate cancer: a review of the mutational landscape and application to clinical management. *Oncotarget* 8(41):71342-71357.
- Kang D, Miyako K, Kai Y, Irie T, and Takeshige K. 1997. In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 272(24):15275-15279.
- Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, Roos C, et al. 2008. Polymorphisms Associated with Cholesterol and Risk of Cardiovascular Events. *New Engl J Med* 358(12):1240-1249.
- Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, et al. 2009. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* 41(3):334-341.
- Kaul P, McAlister FA, Ezekowitz JA, Grover VK, and Quan H. 2011. Ethnic differences in 1-year mortality among patients hospitalised with heart failure. *Heart* 97(13):1048-1053.
- Kelly-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, and Wolf PA. 2003. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 12(3):119-126.
- Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. 2014a. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet* 23(13):3537-3551.
- Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. 2014b. Molecular and Bioenergetic Differences between Cells with African versus European Inherited Mitochondrial DNA Haplogroups: Implications for Population Susceptibility to Diseases. *Biochim Biophys Acta* 1842(2):208-219.
- Khera AV, Emdin CA, Drake I, Natarajan P, Bick AG, Cook NR, et al. 2016. Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease. *N Engl J Med* 75(24):2349-2358.
- Keys A. 1953. Atherosclerosis: a problem in newer public health. *J Mt Sinai Hosp N Y* 20(2):118-139.
- Keys A, Taylor HL, Blackburn H, Brozek J, Anderson JT, and Simonson E. 1963. Coronary heart disease among minnesota business and professional men followed fifteen years. *Circulation* 28:381-395.

- Khan SS, Ning H, Wilkins JT, Allen N, Carnethon M, Berry JD, et al. 2018. Association of Body Mass Index With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease and Compression of Morbidity. *JAMA Cardiol* 3(4):280-287.
- Khera AV, and Kathiresan S. 2017. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet* 18(6):331-344.
- Kilariski LL, Achterberg S, Devan WJ, Traylor M, Malik R, Lindgren A, et al. 2014. Meta-analysis in more than 17,900 cases of ischemic stroke reveals a novel association at 12q24.12. *Neurol* 83(8):678-685.
- Kirches E, Krause G, Warich-Kirches M, Weis S, Schneider T, Meyer-Puttlitz B, et al. 2001. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. *Int J Cancer* 93(4):534-538.
- Kivisild T. 2015. Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investig Genet* 6(1):3.
- Kivisild T, Shen P, Wall DP, Do B, Sung R, Davis K, et al. 2006. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genet* 172(1):373-387.
- Kloss-Brandstatter A, Pacher D, Schonherr S, Weissensteiner H, Binna R, Specht G, et al. 2011. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum Mutation* 32(1):25-32.
- Knowles JW, and Ashley EA. 2018. Cardiovascular disease: The rise of the genetic risk score. *PLOS Medicine* 15(3):e1002546.
- Knowles JW, Zarafshar S, Pavlovic A, Goldstein BA, Tsai S, Li J, et al. 2017. Impact of a Genetic Risk Score for Coronary Artery Disease on Reducing Cardiovascular Risk: A Pilot Randomized Controlled Study. *Front Cardiovasc Med* 4:53.
- Kofler B, Mueller EE, Eder W, Stanger O, Maier R, Weger M, et al. 2009. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet* 10:35.
- Kosmas CE, Martinez I, Surlas A, Bouza KV, Campos FN, Torres V, et al. 2018. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context* 7:212525.
- Kraru NT, Borglykke A, Allin KH, Sandholt CH, Justesen JM, Andersson EA, et al. 2015. A genetic risk score of 45 coronary artery disease risk variants associates with increased risk of myocardial infarction in 6041 Danish individuals. *Atherosclerosis* 240(2):305-310.
- Krumholz HM, Normand SL, and Wang Y. 2014. Trends in hospitalizations and outcomes for acute cardiovascular disease and stroke, 1999-2011. *Circulation* 130(12):966-975.
- Krzywanski DM, Moellering DR, Fetterman JL, Dunham-Snary KJ, Sammy MJ, and Ballinger SW. 2011. The mitochondrial paradigm for cardiovascular disease susceptibility and cellular function: a complementary concept to Mendelian genetics. *Lab Invest* 91(8):1122-1135.
- Krzywanski DM, Moellering DR, Westbrook DG, Dunham-Snary KJ, Brown J, Bray AW, et al. 2016. Endothelial Cell Bioenergetics and Mitochondrial DNA Damage Differ in Humans Having African or West Eurasian Maternal Ancestry. *Circ Cardiovasc Genet* 9(1):26-36.
- Kukat C, Davies KM, Wurm CA, Spahr H, Bonekamp NA, Kuhl I, et al. 2015. Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(36):11288-11293.
- Kullo IJ, Jouni H, Austin EE, Brown SA, Kruisselbrink TM, Isseh IN, et al. 2016. Incorporating a genetic risk score into coronary heart disease risk estimates: effect on low-density

- lipoprotein cholesterol levels (the MI-GENES clinical trial). *Circulation* 133(12):1181-1188.
- Kung HC, and Xu J. 2015. Hypertension-related Mortality in the United States, 2000-2013. *NCHS data brief*(193):1-8.
- Lacey B, Herrington WG, Preiss D, Lewington S, and Armitage J. 2017. The Role of Emerging Risk Factors in Cardiovascular Outcomes. *Curr Athero Rep* 19(6):28-28.
- Lee SR, and Han J. 2017. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev* 2017:8060949.
- Lee MY, Griending KK. 2008. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10(6):1045-1059.
- Lenaz G, and Genova ML. 2007. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(4):C1221-1239.
- Leopold JA, and Loscalzo J. 2018. Emerging Role of Precision Medicine in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 122(9):1302-1315.
- Levitsky S, Laurikka J, Stewart RD, Campos CT, Lahey SJ, and McCully JD. 2003. Mitochondrial DNA deletions in coronary artery bypass grafting patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 24(5):777-784.
- Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, et al. 2007. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 370(9602):1829-1839.
- Li M, Schröder R, Ni S, Madea B, and Stoneking M. 2015. Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(8):2491-2496.
- Lind L, Sundstrom J, Arnlov J, and Lampa E. 2018. Impact of Aging on the Strength of Cardiovascular Risk Factors: A Longitudinal Study Over 40 Years. *J Am Heart Assoc* 7(1).
- Liou CW, Lin TK, Huang FM, Chen TL, Lee CF, Chuang YC, et al. 2004. Association of the mitochondrial DNA 16189 T to C variant with lacunar cerebral infarction: evidence from a hospital-based case-control study. *Ann NY Acad Sci* 1011:317-324.
- Liu C, Kraja AT, Smith JA, Brody JA, Franceschini N, Bis JC, et al. 2016a. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. *Nat Genet* 48(10):1162-1170.
- Liu L, You L, Tan L, Wang DW, and Cui W. 2015. Genetic insight into the role of MRAS in coronary artery disease risk. *Gene* 564(1):63-66.
- Liu S, Shi S, Li Y, and Kong D. 2016b. Identification of sequence nucleotide polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for epithelial ovarian cancer. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* 27(1):9-11.
- López-Messa JB, Andrés-de Llano JM, López-Fernández L, García-Cruces J, García-Crespo J, and Prieto González M. 2018. Evolución de las tasas de hospitalización y mortalidad hospitalaria por enfermedades cardiovasculares agudas en Castilla y León, 2001-2015. *Rev Esp Cardiol* 71(02):95-104.
- Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, Xie HM, Chalkia D, Sarmady M, et al. 2013. mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Curr Protoc Bioinformatics* 44(123):1.23.21-26.



- Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N-C, Slone J, Gui B, et al. 2018. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*:201810946.
- Lv X, Zhang Y, Rao S, Qiu J, Wang M, Luo X, et al. 2012. Joint effects of genetic variants in multiple loci on the risk of coronary artery disease in Chinese Han subjects. *Circ J* 76(8):1987-1992.
- Lluis-Ganella C, Lucas G, Subirana I, Senti M, Jimenez-Conde J, Marrugat J, et al. 2010. Additive effect of multiple genetic variants on the risk of coronary artery disease. *Rev Esp Cardiol* 63(8):925-933.
- Lluis-Ganella C, Subirana I, Lucas G, Tomas M, Munoz D, Senti M, et al. 2012. Assessment of the value of a genetic risk score in improving the estimation of coronary risk. *Atherosclerosis* 222(2):456-463.
- MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, et al. 2017. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res* 45(Database issue):D896-D901.
- Maiques Galán A, Brotons C, Banegas JR, Martín E, Lobos-Bejarano JM, Villar F, et al. 2016. Recomendaciones preventivas cardiovasculares. PAPPs 2016. *Atención Primaria* 48:4-26.
- Malik D, Hsu T, Falatoonzadeh P, Cáceres-del-Carpio J, Tarek M, Chwa M, et al. 2014. Human Retinal Transmitochondrial Cybrids with J or H mtDNA Haplogroups Respond Differently to Ultraviolet Radiation: Implications for Retinal Diseases. *PloS one* 9(6):e99003.
- Malik R, Chauhan G, Traylor M, Sargurupremraj M, Okada Y, Mishra A, et al. 2018. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet* 50(4):524-537.
- Malik R, Traylor M, Pulit SL, Bevan S, Hopewell JC, Holliday EG, et al. 2016. Low-frequency and common genetic variation in ischemic stroke: The METASTROKE collaboration. *Neurol* 86(13):1217-1226.
- Malyarchuk B, Derenko M, Grzybowski T, Perkova M, Rogalla U, Vanecek T, et al. 2010. The peopling of Europe from the mitochondrial haplogroup U5 perspective. *PloS one* 5(4):e10285.
- Malyarchuk B, Derenko M, Perkova M, and Vanecek T. 2008. Mitochondrial haplogroup U2d phylogeny and distribution. *Hum Biol* 80(5):565-571.
- Mancia G, Parati G, Borghi C, Ghironzi G, Andriani E, Marinelli L, et al. 2006. Hypertension prevalence, awareness, control and association with metabolic abnormalities in the San Marino population: the SMOOTH study. *J Hypertens* 24(5):837-843.
- Marcuello A, Martinez-Redondo D, Dahmani Y, Casajus JA, Ruiz-Pesini E, Montoya J, et al. 2009. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion* 9(1):27-30.
- Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, Ordovas J, et al. 2003a. An adaptation of the Framingham coronary heart disease risk function to European Mediterranean areas. *J Epidemiol Community Health* 57(8):634-638.
- Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, Sullivan L, Ordovas J, Cordón F, et al. 2003b. Estimación del riesgo coronario en España mediante la ecuación de Framingham calibrada. *Rev Esp Cardiol* 56(03):253-261.
- Marrugat J, Subirana I, Comín E, Cabezas C, Vila J, Elosua R, et al. 2007. Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA study. *J Epidemiol Community Health* 61(1):40-47.

- Marrugat J, Subirana I, Ramos R, Vila J, Marin-Ibanez A, Guembe MJ, et al. 2014. Derivation and validation of a set of 10-year cardiovascular risk predictive functions in Spain: the FRESCO Study. *Prev Med* 61:66-74.
- Martikainen MH, and Majamaa K. 2010. Epidemiology and characteristics of occipital brain infarcts in young adults in southwestern Finland. *J Neurol* 257(2):259-263.
- Martinez-Redondo D, Marcuello A, Casajus JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, et al. 2010. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* 10(2):102-107.
- McBride HM, Neuspiel M, and Wasiak S. 2006. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biol* 16(14):R551-R560.
- McPhee SJ, Papadakis MA, and Rabow MW. 2011. *CURRENT Medical Diagnosis and Treatment 2012, Fifty-First Edition*: McGraw-Hill Education.
- McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. 2007. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Sci* 316(5830):1488-1491.
- Meeks KAC, Freitas-Da-Silva D, Adeyemo A, Beune EJAJ, Modesti PA, Stronks K, et al. 2016. Disparities in type 2 diabetes prevalence among ethnic minority groups resident in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Intern Emerg Med* 11(3):327-340.
- Mega JL, Stitziel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield M, Devlin JJ, et al. 2015. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet* 385(9984):2264–2271.
- Melvin RG, and Ballard JWO. 2017. Cellular and population level processes influence the rate, accumulation and observed frequency of inherited and somatic mtDNA mutations. *Mutagenesis* 32(3):323-334.
- Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, Prieto MA, Bordiú E, Calle A, et al. 2016. Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. Resultados del estudio Di@bet.es. *Rev Esp Cardiol* 69(06):572-578.
- Mensah GA, Wei GS, Sorlie PD, Fine LJ, Rosenberg Y, Kaufmann PG, Mussolino ME, Hsu LL, Addou E, Engelgau MM et al. 2017. Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications. *Circulation* 120(2):366-380.
- Messner B, and Bernhard D. 2014. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(3):509-515.
- Minczuk M, He J, Duch AM, Ettema TJ, Chlebowski A, Dzionek K, et al. 2011. TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Res* 39(10):4284-4299.
- Mitchell P. 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191(4784):144-148.
- Mitchell SL, Neiningner AC, Bruce CN, Chocron IM, Bregman JA, Estopinal CB, et al. 2017. Mitochondrial Haplogroups Modify the Effect of Diabetes Duration and HbA1c on Proliferative Diabetic Retinopathy Risk in Patients With Type 2 Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(14):6481-6488.
- Mitrofanov KY, Zhelankin AV, Shiganova GM, Sazonova MA, Bobryshev YV, Postnov AY, et al. 2016. Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmic mutations A1555G, C3256T, T3336C, capital ES, Cyrillic5178capital A, Cyrillic, G12315A, G13513A, G14459A, G14846capital A, Cyrillic and G15059A in CHD patients with the history of myocardial infarction. *Exp Mol Pathol* 100(1):87-91.

- Mitrousi K, Lip GYH, and Apostolakis S. 2013. Age as a Risk Factor for Stroke in Atrial Fibrillation Patients: Implications in Thromboprophylaxis in the Era of Novel Oral Anticoagulants. *J Atr Fibrillation* 6(1):783-783.
- Mohamed Yussuf AA. 2015. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumours: A mini-review. *J Cancer Res Ther* 11(3):535-544.
- Mohlke KL, Jackson AU, Scott LJ, Peck EC, Suh YD, Chines PS, et al. 2005. Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Hum Genet* 118(2):245-254.
- Montefiori LE, Sobreira DR, Sakabe NJ, Aneas I, Joslin AC, Hansen GT. 2018. *Elife* 7. pii: e35788.
- Morrison AC, Bare LA, Chambless LE, Ellis SG, Malloy M, Kane JP, et al. 2007. Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 166(1):28-35.
- Mosca L, Barrett-Connor E, and Wenger NK. 2011. Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. *Circulation* 124(19):2145-2154.
- Mueller EE, Eder W, Ebner S, Schwaiger E, Santic D, Kreindl T, et al. 2011. The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations. *PLoS one* 6(1):e16455.
- Murabito JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, and Wilson WF. 1997. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation* 96(1):44-49.
- Murakami H, Ota A, Simojo H, Okada M, Ajisaka R, and Kuno S. 2002. Polymorphisms in control region of mtDNA relates to individual differences in endurance capacity or trainability. *Jpn J Physiol* 52(3):247-256.
- Muse ED, Wineinger NE, Spencer EG, Peters M, Henderson R, Zhang Y, et al. 2018. Validation of a genetic risk score for atrial fibrillation: A prospective multicenter cohort study. *PLoS Med* 15:e1002525.
- Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, et al. 2017. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390(10100):1151-1210.
- Nagle N, Ballantyne KN, van Oven M, Tyler-Smith C, Xue Y, Wilcox S, et al. 2017. Mitochondrial DNA diversity of present-day Aboriginal Australians and implications for human evolution in Oceania. *J Hum Genet* 62(3):343-353.
- Nardelli C, Labruna G, Liguori R, Mazzaccara C, Ferrigno M, Capobianco V, et al. 2013. Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int* 2013:631082.
- Natarajan P, Young R, Stitzel NO, Padmanabhan S, Baber U, Mehran R, et al. 2017. Polygenic risk score identifies subgroup with higher burden of atherosclerosis and greater relative benefit from statin therapy in the primary prevention setting. *Circulation* 135(22):2091-2101.
- Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, and Fogelman AM. 2011. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 8(4):222-232.
- Nayor M, and Vasan RS. 2016. Recent Update to the US Cholesterol Treatment Guidelines: A Comparison With International Guidelines. *Circulation* 133(18):1795-1806.
- Nelson CP, Goel A, Butterworth AS, Kanoni S, Webb TR, Marouli E, et al. 2017. Association analyses based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 49:1385-1391.

- Ng PC, Murray SS, Levy S, and Venter JC. 2009. An agenda for personalized medicine. *Nat* 461(7265):724-726.
- Nicholls TJ, and Minczuk M. 2014. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol* 56:175-181.
- Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylha M, and Majamaa K. 2003. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 112(1):29-33.
- Nikpay M, Goel A, Won HH, Hall LM, Willenborg C, Kanoni S, et al. 2015. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet* 47(10):1121-1130.
- Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, et al. 2007a. Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. *Hum Genet* 120(6):827-836.
- Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, et al. 2007b. Mitochondrial haplogroup A is a genetic risk factor for atherothrombotic cerebral infarction in Japanese females. *Mitochondrion* 7(1-2):72-79.
- Nordestgaard BG, and Varbo A. 2014. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet* 384(9943):626-635.
- O'Donnel CJ, and Elosua R. 2008. Factores de riesgo cardiovascular. Perspectivas derivadas del Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol* 61(03):299-310.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, and Zhivotovsky B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12(5):913-922.
- Owolabi M, Sarfo F, Howard VJ, Irvin MR, Gebregziabher M, Akinyemi R, et al. 2017. Stroke in Indigenous Africans, African Americans, and European Americans. Interplay Racial and Geographic Factors. *Stroke* 48(5):1169-1175.
- Palacin M, Alvarez V, Martin M, Diaz M, Corao AI, Alonso B, et al. 2011. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion* 11(1):176-181.
- Panth N, Paudel KR, and Parajuli K. 2016. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Adv Med* 2016:9152732.
- Paquette M, Dufour R, and Baass A. 2018. PHACTR1 genotype predicts coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 12(4):966-971.
- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, and Petrosillo G. 2018. Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia/reperfusion injury. Implications for pharmacological cardioprotection. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*.
- Park CB, and Larsson N-G. 2011. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 193(5):809-818.
- Patel RS, Sun YV, Hartiala J, Veledar E, Su S, Sher S, Liu YX, et al. 2012. Association of a genetic risk score with prevalent and incident myocardial infarction in subjects undergoing coronary angiography. *Circ Cardiovasc Genet* 5(4):441-449.
- Paynter NP, Chasman DI, Buring JE, Shiffman D, Cook NR, and Ridker PM. 2009. Cardiovascular disease risk prediction with and without knowledge of genetic variation at chromosome 9p21.3. *Ann Intern Med* 150(2):65-72.
- Paynter NP, Chasman DI, Pare G, Buring JE, Cook NR, Miletich JP, et al. 2010. Association between a literature-based genetic risk score and cardiovascular events in women. *Jama* 303(7):631-637.

- Peluso I, Morabito G, Urban L, Ioannone F, and Serafini M. 2012. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 12(4):351-360.
- Pereira A, Mendonca MI, Sousa AC, Borges S, Freitas S, Henriques E, et al. 2017. Genetic risk score and cardiovascular mortality in a southern european population with coronary artery disease. *Int J Clin Pract* 71:e12956.
- Pereira F, Soares P, Carneiro J, Pereira L, Richards M, Samuels D, et al. 2008. Evidence for Variable Selective Pressures at a Large Secondary Structure of the Human Mitochondrial DNA Control Region. *Mol Biol Evol* 25(12):2759-2770.
- Perera S, Ramos A, Alvarez L, Jurado D, Guardiola M, Lima M, et al. 2018. Reappraising the human mitochondrial DNA recombination dogma. *bioRxiv* 304535; doi: <https://doi.org/10.1101/304535>
- Pérez-Hernández B, García-Esquinas E, Graciani A, Guallar-Castillón P, López-García E, León-Muñoz LM, et al. 2017. Desigualdades sociales en los factores de riesgo cardiovascular de los adultos mayores de España: estudio ENRICA-Seniors. *Rev Esp Cardiol* 70(03):145-154.
- Perini W, Kunst AE, Snijder MB, Peters RJG, and van Valkengoed IGM. 2018. Ethnic differences in metabolic cardiovascular risk among normal weight individuals: Implications for cardiovascular risk screening. The HELIUS study. *NMCD* 29(1):15-22.
- Pham XH, Farge G, Shi Y, Gaspari M, Gustafsson CM, and Falkenberg M. 2006. Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *J Biol Chem* 281(34):24647-24652.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). *Eur Heart J* 37(29):2315-2381.
- Pierron D, Chang I, Arachiche A, Heiske M, Thomas O, Borlin M, P et al. 2011. Mutation Rate Switch inside Eurasian Mitochondrial Haplogroups: Impact of Selection and Consequences for Dating Settlement in Europe. *PloS one* 6(6):e21543.
- Pinto M, and Moraes CT. 2015. Mechanisms Linking mtDNA Damage and Aging. *Free Radic Biol Med* 85:250-258.
- Pittis AA, and Gabaldon T. 2016. Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nat* 531(7592):101-104.
- Pittman R. 2016. Regulation of Tissue Oxygenation, Second Edition: Morgan & Claypool Life Sciences.
- Posse V, and Gustafsson CM. 2017. Human Mitochondrial Transcription Factor B2 Is Required for Promoter Melting during Initiation of Transcription. *J Biol Chem* 292(7):2637-2645.
- Posth C, Renaud G, Mitnik A, Drucker DG, Rougier H, Cupillard C, et al. 2016. Pleistocene Mitochondrial Genomes Suggest a Single Major Dispersal of Non-Africans and a Late Glacial Population Turnover in Europe. *Curr Biol* 26(6):827-833.
- Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, and Wareham NJ. 2002. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet* 11(13):1581-1583.
- PPRG - The Pooling Project Research Group. 1978. Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: Final report of the pooling project. *J Chronic Dis* 31(4):201-306.

- Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, and Avadhani NG. 2006. Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem* 281(4):2061-2070.
- Prescott C, and Bottle SE. 2017. Biological Relevance of Free Radicals and Nitroxides. *Cell Biochem Biophys* 75(2):227-240.
- Preuss M, König IR, Thompson JR, Erdmann J, Absher D, Assimes TL, et al. 2010. Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circ Cardiovasc Genet* 3(5):475-483.
- Pulit SM, Wong Q, Malik R, Gwinn K, Achterberg S, Algra A, et al. 2016. Loci associated with ischaemic stroke and its subtypes (SiGN): a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 15(2):174-184.
- Qi L, Ma J, Qi Q, Hartiala J, Allayee H, and Campos H. 2011a. Genetic risk score and risk of myocardial infarction in Hispanics. *Circulation* 123(4):374-380.
- Qi L, Parast L, Cai T, Powers C, Gervino EV, Hauser TH, et al. 2011b. Genetic susceptibility to coronary heart disease in type 2 diabetes: 3 independent studies. *J Am Coll Cardiol* 58(25):2675-2682.
- Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, and Brand MD. 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem* 287(32):27255-27264.
- Raab W. 1932. Alimentäre faktoren in der entstehung von arteriosklerose und hypertonie. *Med Klin*(28):487-521.
- Ramos A, Santos C, Mateiu L, Gonzalez M, Alvarez L, Azevedo L, et al. 2013. Frequency and pattern of heteroplasmy in the complete human mitochondrial genome. *PloS one* 8(10):e74636.
- Ramos A, Aluja MP, Lima M, Santos C. 2016. Somatic vs Germinal Mutations in Mitochondrial DNA: Is There Any Relation with Human Health and Aging? in *Anthropology: Current and Future Developments*, Bentham Science Publishers, 50-64p.
- Ramos R, Solanas P, Cerdón F, Rohlf I, Elosua R, Sala J, et al. 2003. Comparación de la función de Framingham original y la calibrada del REGICOR en la predicción del riesgo coronario poblacional. *Med Clín* 121(14):521-526.
- Rea IM, McNerlan SE, Archbold GP, Middleton D, Curran MD, Young IS, et al. 2013. Mitochondrial J haplogroup is associated with lower blood pressure and anti-oxidant status: findings in octo/nonagenarians from the BELFAST Study. *Age (Dordr)* 35(4):1445-1456.
- Richter C, Park JW, and Ames BN. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(17):6465-6467.
- Ridker PM, Buring JE, Rifai N, and Cook NR. 2007. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *Jama* 297(6):611-619.
- Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, and Cook NR. 2008. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation* 118(22):2243-2251, 2244p following 2251.
- Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, Havulinna AS, Silander K, Sharma A, et al. 2010. A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet* 376(9750):1393-1400.

- Rishishwar L, and Jordan IK. 2017. Implications of human evolution and admixture for mitochondrial replacement therapy. *BMC Genom* 18(1):140.
- Roostalu U, Kutuev I, Loogvali EL, Metspalu E, Tambets K, Reidla M, et al. 2007. Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Mol Biol Evol* 24(2):436-448.
- Rosa A, Fonseca B, Krug T, Manso H, Gouveia L, Albergaria I, et al. 2008. Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients. *BMC Medical Genetics* 9(1):1-10.
- Rose G, Passarino G, Scornaienchi V, Romeo G, Dato S, Bellizzi D, et al. 2007. The mitochondrial DNA control region shows genetically correlated levels of heteroplasmy in leukocytes of centenarians and their offspring. *BMC Genom* 8(1):293.
- Ross JM, Stewart JB, Hagstrom E, Brene S, Mourier A, Coppotelli G, et al. 2013. Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nat* 501(7467):412-415.
- Ross OA, McCormack R, Curran MD, Duguid RA, Barnett YA, Rea IM, et al. 2001. Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol* 36(7):1161-1178.
- Ruiz-García A, Arranz-Martínez E, García-Álvarez JC, Morales-Cobos LE, García-Fernández ME, de la Peña-Antón N, et al. 2018. Población y metodología del estudio SIMETAP: Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas relacionadas. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 30(5):197-208.
- Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, et al. 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* 35(Database issue):D823-D828.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, and Wallace DC. 2004. Effects of Purifying and Adaptive Selection on Regional Variation in Human mtDNA. *Sci* 303(5655):223-226.
- Rydén L, Grant P, Anker S, Berne C, Cosentino F, Danchin N. 2014. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diabetes, prediabetes y enfermedad cardiovascular, en colaboración con la European Society for the Study of Diabetes. *Rev Esp Cardiol* 67:136.e1-e56
- Saccone C, and Gadaleta G. 2017. Mitochondrial Genome. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- Sahakyan H, Hooshiar Kashani B, Tamang R, Kushniarevich A, Francis A, et al. 2017. Origin and spread of human mitochondrial DNA haplogroup U7. *Sci Rep* 7:46044-46044.
- Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabaei A, Bristow MR, et al. 2005. Increased Reactive Oxygen Species Production and Functional Alterations in Antioxidant Enzymes in Human Failing Myocardium. *J Card Fail* 11(6):473-480.
- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. 2007. Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 357(5):443-453.
- Samuels DC, Li C, Li B, Song Z, Torstenson E, Boyd Clay H, et al. 2013. Recurrent Tissue-Specific mtDNA Mutations Are Common in Humans. *PLoS Genetics* 9(11):e1003929.
- SanGiovanni JP, Arking DE, Iyengar SK, Elashoff M, Clemons TE, Reed GF, et al. 2009. Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration. *PLoS one* 4(5):e5508.

- Sans S, Fitzgerald AP, Royo D, Conroy R, and Graham I. 2007. Calibración de la tabla SCORE de riesgo cardiovascular para España. *Rev Esp Cardiol* 60(05):476-485.
- Santos C, Montiel R, Angles N, Lima M, Francalacci P, Malgosa A, et al. 2004. Determination of human caucasian mitochondrial DNA haplogroups by means of a hierarchical approach. *Hum Biol* 76(3):431-453.
- Santos C, Montiel R, Sierra B, Bettencourt C, Fernandez E, Alvarez L, et al. 2005. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol Biol Evol* 22(6):1490-1505.
- Santos C, Sierra B, Alvarez L, Ramos A, Fernandez E, Nogues R, et al. 2008. Frequency and pattern of heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 67(2):191-200.
- Savarese G, and Lund LH. 2017. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac failure review* 3(1):7-11.
- Sawabe M, Tanaka M, Chida K, Arai T, Nishigaki Y, Fuku N. 2011. Mitochondrial haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese elderly: an autopsy study of 1,536 patients. *J Atheroscler Thromb* 18(2):166-75.
- Sazonova MA, Shkurat TP, Demakova NA, Zhelankin AV, Barinova VA, Sobenin IA, et al. 2016. Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next? *Curr Pharm Des* 22(3):390-396.
- Sazonova MA, Sinyov VV, Barinova VA, Ryzhkova AI, Bobryshev YV, Orekhov AN, et al. 2015. Association of mitochondrial mutations with the age of patients having atherosclerotic lesions. *Exp Mol Pathol* 99(3):717-719.
- Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. 2011. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43(4):333-338.
- Secher B, Fregel R, Larruga JM, Cabrera VM, Endicott P, Pestano JJ, et al. 2014. The history of the North African mitochondrial DNA haplogroup U6 gene flow into the African, Eurasian and American continents. *BMC Evol Biol* 14:109.
- Segovia J. 2013. Los números de la insuficiencia cardiaca: una oportunidad para mejorar. *Rev Clín Esp* 213(1):25-27.
- Sepuri NBV, Tammineni P, Mohammed F, and Paripati A. 2017. Nuclear Transcription Factors in the Mitochondria: A New Paradigm in Fine-Tuning Mitochondrial Metabolism. *Handb Exp Pharmacol* 240:3-20.
- Serrano ME, Garcia M, Rego I, Domenech N, Blanco F, Cuenca JJ, et al. 2018. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of aortic stenosis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 8:218492318813220.
- Shaikh K, Nakanishi R, Kim N, and Budoff MJ. 2018. Coronary artery calcification and ethnicity. *J Cardiovasc Comput Tomogr pii: S1934-5925(18)30405-2*.
- Sharrief AZ, Johnson B, Abada S, and Urrutia VC. 2016. Stroke Knowledge in African Americans: A Narrative Review. *Ethnicity & Disease* 26(2):255-262.
- Shiffman D, O'Meara ES, Rowland CM, Louie JZ, Cushman M, Tracy RP, et al. 2011. The contribution of a 9p21.3 variant, a KIF6 variant, and C-reactive protein to predicting risk of myocardial infarction in a prospective study. *BMC Cardiovasc Disord* 11:10.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, and Wallace DC. 1990. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61(6):931-937.



- Shokolenko IN, and Alexeyev MF. 2017. Mitochondrial transcription in mammalian cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 22:835-853.
- Silkjaer T, Norgaard JM, Aggerholm A, Ebbesen LH, Kjeldsen E, Hokland P, et al. 2013. Characterization and prognostic significance of mitochondrial DNA variations in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 90(5):385-396.
- Singleton A, Erby LH, Foisie KV, and Kaphingst KA. 2012. Informed choice in direct-to-consumer genetic testing (DTCGT) websites: a content analysis of benefits, risks, and limitations. *J Genet Counseling* 21(3):433-439.
- Sjaarda J, Gerstein H, Chong M, Yusuf S, Meyre D, Anand SS, et al. 2018. Blood CSF1 and CXCL12 as Causal Mediators of Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* 72(3):300-310.
- Smith JA, Ware EB, Middha P, Beacher L, Kardia SL. 2015. Current Applications of Genetic Risk Scores to Cardiovascular Outcomes and Subclinical Phenotypes. *Curr Epidemiol Rep* 2(3):180-190.
- Smith JG, Melander O, Lovkvist H, Hedblad B, Engstrom G, Nilsson P, et al. 2009. Common genetic variants on chromosome 9p21 confers risk of ischemic stroke: a large-scale genetic association study. *Circ Cardiovasc Genet* 2(2):159-164.
- Snijder MB, Agyemang C, Peters RJ, Stronks K, Ujic-Voortman JK, and van Valkengoed IGM. 2017. Case Finding and Medical Treatment of Type 2 Diabetes among Different Ethnic Minority Groups: The HELIUS Study. *J Diabetes Res* 2017: 9896849.
- Soares P, Achilli A, Semino O, Davies W, Macaulay V, Bandelt HJ, et al. 2010. The archaeogenetics of Europe. *Curr Biol* 20(4):R174-183.
- Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Röhl A, et al. 2009. Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock. *Am J Hum Genet* 84(6):740-759.
- Sobenin IA, Sazonova MA, Postnov AY, Salonen JT, Bobryshev YV, and Orekhov AN. 2013. Association of Mitochondrial Genetic Variation with Carotid Atherosclerosis. *PLoS one* 8(7):e68070.
- Stevens RJ, Kothari V, Adler AI, and Stratton IM. 2001. The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in Type II diabetes (UKPDS 56). *Clin Sci (Lond)* 101(6):671-679.
- Stevens SL, Wood S, Koshiaris C, Law K, Glasziou P, Stevens RJ, et al. 2016. Blood pressure variability and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 354:i4098-i4098.
- Stewart JB, and Chinnery PF. 2015. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* 16(9):530-542.
- Stoneking M, and Delfin F. 2010. The human genetic history of East Asia: weaving a complex tapestry. *Curr Biol* 20(4):R188-193.
- Sugiyama D, Okamura T, Watanabe M, Higashiyama A, Okuda N, Nakamura Y, et al. 2015. Risk of hypercholesterolemia for cardiovascular disease and the population attributable fraction in a 24-year Japanese cohort study. *J Atheroscler Thromb* 22(1):95-107.
- Szeto HH. 2018. Stealth Peptides Target Cellular Powerhouses to Fight Rare and Common Age-Related Diseases. *Protein Pept Lett* 2018(1).
- Tada H, Melander O, Louie JZ, Catanese JJ, Rowland CM, Devlin JJ, et al. 2016. Risk prediction by genetic risk scores for coronary heart disease is independent of self-reported family history. *Eur Heart J* 37(6):561-567.

- Talmud PJ, Cooper JA, Palmen J, Lovering R, Drenos F, Hingorani AD, et al. 2008. Chromosome 9p21.3 coronary heart disease locus genotype and prospective risk of CHD in healthy middle-aged men. *Clin Chem* 54(3):467-474.
- Tao L, Pu C, Shen S, Fang H, Wang X, Xuan Q, et al. 2015. Tendency for age-specific mortality with hypertension in the European Union from 1980 to 2011. *Int J Clin Exp Med* 8(2):1611-1623.
- Taverne YJ, Bogers AJ, Duncker DJ, and Merkus D. 2013. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidat Med Cell Longe* 2013:862423.
- Thanassoulis G, Peloso GM, Pencina MJ, Hoffmann U, Fox CS, Cupples LA, 2012. A genetic risk score is associated with incident cardiovascular disease and coronary artery calcium: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Genet* 5(1):113-121.
- Tibazarwa KB; Damasceno AA. 2014. Hypertension in developing countries. *Can J Cardiol*. 30(5):527-533.
- Tikkanen E, Havulinna AS, Palotie A, Salomaa V, and Ripatti S. 2013. Genetic risk prediction and a 2-stage risk screening strategy for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(9):2261-2266.
- Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, and Prudent J. 2018. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* 62(3):341-360.
- Traylor M, Makela KM, Kilarski LL, Holliday EG, Devan WJ, Nalls MA, et al. 2014. A novel MMP12 locus is associated with large artery atherosclerotic stroke using a genome-wide age-at-onset informed approach. *PLoS Genet* 10(7):e1004469.
- Traylor M, Malik R, Nalls MA, Cotlarciuc I, Radmanesh F, Thorleifsson G, et al. 2017. Genetic variation at 16q24.2 is associated with small vessel stroke. *Ann Neurol* 81(3):383-394.
- Treberg JR, Quinlan CL, and Brand MD. 2011. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 286(31):27103-27110.
- Tregouet DA, Konig IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS, Hall AS, et al. 2009. Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat Genet* 41(3):283-285.
- Tsutsui H, Kinugawa S, and Matsushima S. 2008. Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ J* 72 Suppl A:A31-37.
- Tun NN, Arunagirinathan G, Munshi SK, and Pappachan JM. 2017. Diabetes mellitus and stroke: A clinical update. *World J Diabetes* 8(6):235-248.
- Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(2):335-344.
- Umbria M, Ramos A, Caner J, Vega T, Lozano JE, Santos C, and Aluja MP. 2019. Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: A case-control study in Castile and Leon (Spain) population. *Mitochondrion* 44:1-6.
- Vaarhorst AA, Lu Y, Heijmans BT, Dolle ME, Bohringer S, Putter H, et al. 2012. Literature-based genetic risk scores for coronary heart disease: the Cardiovascular Registry Maastricht (CAREMA) prospective cohort study. *Circ Cardiovasc Genet* 5(2):202-209.
- Valente WJ, Ericson NG, Long AS, White PA, Marchetti F, and Bielas JH. 2016. Mitochondrial DNA exhibits resistance to induced point and deletion mutations. *Nucleic Acids Res* 44(18):8513-8524.
- van Oven M, and Kayser M. 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30(2):E386-E394.

- Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, and Nordestgaard BG. 2013. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 61(4):427-436.
- Vasan RS, and Benjamin EJ. 2016. The Future of Cardiovascular Epidemiology. *Circulation* 133(25):2626-2633.
- Vega Alonso AT, Lozano Alonso JE, Álamo Sanz R, Lleras Muñoz S, Escribano Hernández A, and de la Iglesia Rodríguez P. 2007. Diseño de un estudio poblacional del riesgo cardiovascular en Castilla y León a través de los equipos de atención primaria. *Gaceta Sanitaria* 21:84-87.
- Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. 2012. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 380(9841):572-580.
- Walker JE. 2013. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans* 41(1):1-16.
- Wallace DC. 2013a. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1622):20120267.
- Wallace DC. 2013b. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest* 123(4):1405-1412.
- Wallace DC, and Chalkia D. 2013. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(11):a021220.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al. 1988a. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Sci* 242(4884):1427-1430.
- Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, et al. 1988b. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55(4):601-610.
- Wanagat J, Ahmadieh N, Bielas J, Ericson NG, and Van Remmen H. 2015. Skeletal muscle mitochondrial DNA deletions are not increased in CuZn-superoxide dismutase deficient mice. *Exp Gerontol* 61:15-19.
- Wang Y, and Hekimi S. 2016. Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol* 26(5):367-378.
- Wang J, Lin F, Guo L-l, Xiong X-j, and Fan X. 2015. Cardiovascular Disease, Mitochondria, and Traditional Chinese Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:143145.
- Wang J, Schmitt ES, Landsverk ML, Zhang VW, Li FY, Graham BH, et al. 2012. An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience. *Genet Med* 14(6):620-626.
- Wannamethee SG, Shaper AG, and Walker M. 2000. Physical activity and mortality in older men with diagnosed coronary heart disease. *Circulation* 102(12):1358-1363.
- Webb TR, Erdmann J, Stirrups KE, Stitzel NO, Masca NG, Jansen H, K et al. 2017. Systematic Evaluation of Pleiotropy Identifies 6 Further Loci Associated With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* 69(7):823-836.
- Wei JP, Li K, Zhao H, He JF, Wen J, Zhou CY, et al. 2007. The relationship between coronary atherosclerotic stenosis and cerebral atherosclerotic stenosis. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 35(10):889-892.
- Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2018. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in

- Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 71(19):e127-e248.
- Whitworth JA. 2003. World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21(11):1983-1992.
- Wiedemann N, and Pfanner N. 2017. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Ann Rev Biochem* 86(1):685-714.
- Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al. 2017. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network Brussels.
- Wilson ME. 2013. Stroke: understanding the differences between males and females. *Pflugers Archiv. Eur J Physiol* 465(5):595-600.
- Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, and Kannel WB. 1998. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation* 97(18):1837-1847.
- Williams FMK, Carter AM, Hysi PG, Surdulescu G, Hodgkiss D, Soranzo N, et al. 2013. Ischemic Stroke Is Associated with the ABO Locus: The EuroCLOT Study. *Ann Neurol* 73(1):16-31.
- Woo D, Falcone GJ, Devan WJ, Brown WM, Biffi A, Howard TD, et al. 2014. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 1q22 as a susceptibility locus for intracerebral hemorrhage. *Am J Hum Genet* 94(4):511-521.
- Woodward M, Barzi F, Martiniuk A, Fang X, Gu DF, Imai Y, et al. 2006. Cohort profile: the Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. *Int J Epidemiol* 35(6):1412-1416.
- WTCCC. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nat* 447(7145):661-678.
- Yang D, Wang Q, Shi Y, Fan Y, Zheng HX, Song G, et al. 2014. Mitochondrial DNA haplogroup D4b is a protective factor for ischemic stroke in Chinese Han population. *Mol Genet Genomics* 289(6):1241-1246.
- Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, Nyholt DR, et al. 2010. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet* 42(7):565-569.
- Yano Y, Reis JP, Colangelo LA, Shimbo D, Viera AJ, Allen NB, et al. 2018. Association of Blood Pressure Classification in Young Adults Using the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association Blood Pressure Guideline With Cardiovascular Events Later in Life. *Jama* 320(17):1774-1782.
- Yasukawa T, and Kang D. 2018. An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms. *J Biochem* 164(3):183-193.
- Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, et al. 2006. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J* 25(22):5358-5371.
- Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, and Gu Z. 2014. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *PNAS* 111(29):10654-10659.
- Ye S, Willeit J, Kronenberg F, Xu Q, and Kiechl S. 2008. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study. *J Am Coll Cardiol* 52(5):378-384.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364(9438):937-952.

- Zabalza M, Subirana I, Lluís-Ganella C, Sayols-Baixeras S, de Groot E, Arnold R, et al. 2015. Association Between Coronary Artery Disease Genetic Variants and Subclinical Atherosclerosis: An Association Study and Meta-analysis. *Rev Esp Cardiol (English Edition)* 68(10):869-877.
- Zaimkohan H, Keramatipour M, Mirhafez SR, Tavakkoly-Bazzaz J, Tahooni A, Piryaei M, et al. 2016. The Relationship Between Coronary Artery Disease and Genetic Polymorphisms of Melanoma Inhibitory Activity 3. *Iran Red Crescent Med J* 18(9):e31146-e31146.
- Zárate A, Manuel-Apolinar L, Saucedo R, Hernández-Valencia M, and Basurto L. 2016. Hypercholesterolemia As a Risk Factor for Cardiovascular Disease: Current Controversial Therapeutic Management. *Archives Med Res* 47(7):491-495.
- Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, and De Faire U. 2002. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med* 252(3):247-254.
- Zeyl C. 2007. How missing genes interact. *Nat Genet* 39:440-442.
- Zhang G, Qu Y, Dang S, Yang Q, Shi B, and Hou P. 2013. Variable copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts worse prognosis in advanced gastric cancer patients. *Diagn Pathol* 8:173.
- Zhong J, Chen X, Ye H, Wu N, Chen X, and Duan S. 2017. CDKN2A and CDKN2B methylation in coronary heart disease cases and controls. *Exp Ther Med* 14(6):6093-6098.
- Zhu HY, Wang SW, Martin LJ, Liu L, Li YH, Chen R, et al. 2009. The role of mitochondrial genome in essential hypertension in a Chinese Han population. *Eur J Hum Genet* 17(11):1501-1506.
- Zuk O, Schaffner SF, Samocha K, Do R, Hechter E, Kathiresan S, et al. 2014. Searching for missing heritability: Designing rare variant association studies. *Proc Natl Acad USA* 111(4):E455-E464.

07



Annex 1



Els annexos d'aquesta tesi estan organitzats segons el capítol on es citen, i es presenten de la següent manera:

#### Capítol 1: Malaltia cardiovascular a Espanya – Estudi epidemiològic descriptiu 2000-2015

**Taula I.1.1.** Taxes de mortalitat de les malalties de l'aparell circulatori (dades globals, malalties hipertensives, IM, altres isquèmiques del cor, insuficiència cardíaca, malalties cerebrovasculars i aterosclerosi) per el període 2000-2015, segons grups d'edat, sexe i comunitat autònoma.

**Taula I.1.2.** Taxes de morbiditat hospitalària de les malalties de l'aparell circulatori (dades globals, malalties hipertensives, IM, altres isquèmiques del cor, insuficiència cardíaca, malalties cerebrovasculars i aterosclerosi) per el període 2005-2015, segons grups d'edat, sexe i comunitat autònoma.

Aquesta informació es troba disponible en el pen-drive adjunt dins de la carpeta anomenada “Annex 1\_Capítol 1” i dins dels arxius Excel anomenats Taula I.1.1. i Taula I.1.2.

#### Capítol 2: Implicació dels haplogrups mitocondrials en l'infart de miocardi i l'accident cerebrovascular; estudi cas-control en la població de Castellà i Lleó (Espanya)

**Taula II.1.1.** Compilació de les mutacions de la regió control de l'ADN mitocondrial entre les posicions 15.907-16.569 i 1-580 en 211 individus amb infart de miocardi i els seus respectius 211 controls. Les heteroplàsmies puntuals i de longitud es mostren en negreta. També es reporten els polimorfismes informatius de la regió codificant analitzats [(+) enzim de restricció que confirma l'haplogrup; (-) enzim de restricció que no confirma l'haplogrup].

**Taula II.1.2.** Compilació de les mutacions de la regió control de l'ADN mitocondrial entre les posicions 15.907-16.569 i 1-580 en 154 individus amb accident cerebrovascular i els seus respectius 154 controls. Les heteroplàsmies puntuals i de longitud es mostren en negreta. També es reporten els polimorfismes informatius de la regió codificant analitzats [(+) enzim de restricció que confirma l'haplogrup; (-) enzim de restricció que no confirma l'haplogrup].

Aquesta informació es troba disponible en el pen-drive adjunt dins de la carpeta anomenada “Annex 1\_Capítol 2” i dins dels arxius Excel anomenats Taula II.1.1. i Taula II.1.2.



Capítol 3: El paper de les mutacions de la regió control de l'ADN mitocondrial en les malalties cardiovasculars: infart de miocardi i accident cerebrovascular

**Taula III.1.1.** Llistat dels números d'accés i les espècies de primats utilitzades per a calcular els índex de conservació a nivell nucleotídic en la regió control.

**Taula III.1.2.** Matriu de mutacions de la regió control de l'ADN mitocondrial per a 154 individus amb accident cerebrovascular i els seus respectius 154 controls.

**Taula III.1.3.** Matriu de mutacions de la regió control de l'ADN mitocondrial per a 211 individus amb infart de miocardi i els seus respectius 211 controls.

Aquesta informació es troba disponible en el pen-drive adjunt dins de la carpeta anomenada "Annex 1\_Capítol 3" i dins els arxius Excel anomenats Taula III.1.1., Taula III.1.2. i Taula III.1.3.

08

Annex 2



Part dels resultats presentats en aquesta Tesi, han quedat recollits en les següents publicacions científiques:

*Umbria M, Aluja MP, Rafel J, Santos C. 2014. Enfermedad cardiovascular en España: estudio epidemiológico descriptivo 1999-2010. Antropo. 32: 1-13*

*Umbria M, Ramos A, Caner J, Vega T, Lozano JE, Santos C, Aluja MP. 2019. Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: a case-control study in Castile and Leon (Spain) population. Mitochondrion. 44:1-6.*

*Umbria M, Ramos A, Aluja MP, Santos C. The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction. Scientific Reports. Under Review (January 2019). Available in: <https://doi.org/10.1101/382374>*

*Umbria M, Ortega I, Santos C, Castillo S, Salas E, Aluja MP. New mitochondrial genetic risk score improve discrimination capacity of cardiovascular events. Atherosclerosis. Under Review (January 2019).*

## Enfermedad cardiovascular en España: Estudio epidemiológico descriptivo 1999-2010

*Cardiovascular disease in Spain: Descriptive epidemiological study 1999-2010*

Miriam Umbria<sup>1</sup>, Josefa Rafel<sup>2</sup>, Maria Pilar Aluja<sup>1</sup>, Cristina Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Unidad de Antropología Biológica. Facultad de Biociencias. Universitat Autònoma de Barcelona.

<sup>2</sup>Servicio de cardiología del Hospital Sagrat Cor, Barcelona.

**Dirección para correspondencia:** Cristina Santos. Unitat d'Antropologia Biològica. Edifici C. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona), España. E-mail: cristina.santos@uab.cat

**Palabras clave:** Enfermedad cardiovascular; Epidemiología; Hipertensión; Cardiopatía isquémica; Insuficiencia cardíaca; Enfermedad Cerebrovascular; Aterosclerosis

**Key words:** Cardiovascular disease; Epidemiology; Hypertension; Ischemic heart disease; Heart failure; Stroke; Atherosclerosis.

### Resumen

#### *Objetivo*

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte y altas hospitalarias en nuestro país. El objetivo de este estudio es describir la mortalidad y la morbilidad hospitalaria para las enfermedades del sistema circulatorio de mayor relevancia, en las diferentes comunidades autónomas de España en el periodo de 1999 a 2010.

#### *Métodos*

Los datos utilizados fueron obtenidos a través del Instituto Nacional de Estadística. Se calcularon las tasas brutas y específicas de mortalidad y morbilidad por 100.000 habitantes, para cada una de las comunidades autónomas, por sexo, por grupos de edad y por año.

#### *Resultados*

Las enfermedades cardiovasculares presentan un crecimiento exponencial significativo a partir de los 50 años. Los datos de mortalidad muestran diferencias significativas entre sexos, a excepción de la aterosclerosis (t-test:  $t=-1,316$ ;  $p=0,395$ ). Salvo para "otras enfermedades isquémicas", la mortalidad en el resto de enfermedades tiende a disminuir a lo largo del periodo estudiado. Los datos de morbilidad hospitalaria solo muestran diferencias significativas entre sexo para cardiopatía isquémica (CI) y aterosclerosis. Además, su evolución temporal no sigue el mismo patrón que la mortalidad para insuficiencia cardíaca y aterosclerosis. Importantes diferencias regionales existen para las tasas de mortalidad y morbilidad.

### ***Discusión***

Los datos estadísticos demuestran que estas enfermedades, en concreto la CI, son la causa principal de muertes y altas hospitalarias en el país durante el periodo de 1999 a 2010. La tendencia de las tasas de mortalidad a disminuir es mayor que las de morbilidad.

### **Abstract**

#### ***Objective***

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death and hospital admissions in our country. The aim of this study was to describe mortality and hospital morbidity for diseases of the circulatory system of greater relevance in the different regions of Spain in the period 1999 to 2010.

#### ***Methods***

Data used were obtained from Spanish National Institute for Statistics. Crude and specific rates of mortality and morbidity per 100.000 inhabitants, for each autonomous communities, by sex, age groups and year were calculate.

#### ***Results***

Cardiovascular diseases have a significant exponential growth after 50 years. Mortality data showed significant gender differences, less for atherosclerosis (t-test:  $t=-1.316$ ,  $p=0.395$ ). Except for "other ischemic diseases", mortality in other diseases tends to decreases over the study period. The only hospital morbidity data show significant gender difference for ischemic heart disease (IHD) and atherosclerosis. Moreover, its temporal evolution does not follow the same pattern as mortality for heart failure and atherosclerosis. Significant regional differences exist for mortality and morbidity.

#### ***Discussion***

The statistical data show that CVD, in particular IHD, are the leading cause of deaths and hospital admissions in the country during the period 1999-2010. The trend of decreasing mortality rates is greater than morbidity.

### **Introducción**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) hacen referencia a cualquier enfermedad que afecta al sistema cardiovascular, es decir, que afecta al corazón o a los vasos sanguíneos. Según la Organización Mundial de la Salud [O.M.S (2011)], los grandes grupos de ECV son la cardiopatía coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la arteriopatía periférica, la cardiopatía reumática, la cardiopatía congénita y la trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

El nivel de conocimiento adquirido sobre los procesos que intervienen en la progresión y desarrollo de las ECV ha avanzado significativamente, sin embargo, los últimos datos epidemiológicos conocidos no presentan modificaciones de las tasas de mortalidad y morbilidad hospitalarias. La falta de comprensión de las respuestas genéticas individuales a estas enfermedades, corrobora el hecho de que el desarrollo de las ECV está influenciado por la combinación de factores genéticos y ambientales en distinto porcentaje, en función de los diferentes estudios (Krzywanski et al., 2011). La presencia simultánea de varios de ellos tiene un efecto no solo aditivo, sino multiplicativo del riesgo de cada factor por separado. En la actualidad, han sido identificados más de 300 factores de riesgo relacionados con ECV.

En España, se han realizado numerosos estudios epidemiológicos sobre los factores de riesgo cardiovascular. Los análisis más recientes abarcan, por un lado, importantes estudios transversales realizados en distintas regiones peninsulares [ver por ej. Soriguer et al. (2012)], así como metaanálisis que tienen como objetivo principal establecer una distribución geográfica más amplia de dichos factores (Gabriel et al., 2008; Grau et al., 2011) y, estudios longitudinales (Gutiérrez et al., 2011; Estruch et al., 2013), que permiten una monitorización de las tendencias temporales, complementando estos datos para una posterior detección de situaciones de riesgo en la población. Por otro lado, la realización de estudios epidemiológicos descriptivos que representan la distribución de variables, se llevan a cabo cada cierto tiempo en nuestro país

(Marrugat et al., 2002; Bertomeu et al., 2008), dando lugar a eventuales hipótesis de trabajo. Los últimos estudios de estas características son los publicados por Dégano (2013), donde nos muestra las últimas estimaciones del número de casos del síndrome coronario agudo y su tendencia entre 2005 y 2049, y por Brotons (2013) y Brea (2013), los cuales revisan la epidemiología de la cardiopatía isquémica y la enfermedad vascular cerebral (EVC) en España, respectivamente.

Tomando como base el uso de las tasas específicas de mortalidad y morbilidad hospitalaria, el objetivo de este estudio es describir la mortalidad y morbilidad hospitalaria para las enfermedades del sistema circulatorio de mayor relevancia, en las diferentes comunidades autónomas de España en el periodo de 1999 a 2010. Se hará una evaluación de los datos para distintas edades y sexo, y se valorará su evolución y tendencia.

## **Métodos**

### ***Fuente de datos***

Los datos utilizados en el presente estudio fueron obtenidos del Instituto Nacional de Estadística [INE (2012)] para los años 1999 a 2010. La selección de los mismos se llevó a cabo utilizando la novena y décima revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE 9<sup>o</sup> y CIE 10<sup>o</sup>) para altas hospitalarias y defunciones, respectivamente, que estuvieran relacionadas con las enfermedades del sistema circulatorio de mayor relevancia (código I00-I99 de la CIE 10<sup>o</sup>). En el análisis se consideraron: las Enfermedades hipertensivas (I10-I15), el Infarto agudo de miocardio (I21), otras enfermedades isquémicas del corazón (I20, I22-I25), la Insuficiencia cardíaca (I50), las Enfermedades cerebrovasculares (I60-I69) y la Aterosclerosis (I70). Se han obtenido los datos correspondientes al número de muertes separados por sexo, grupos de edad y comunidades autónomas para el periodo mencionado. Además, se compilaron los datos de morbilidad hospitalaria a través de la lista reducida internacional Eurostat/OCDE/OMS (2008) para el periodo de 2005 a 2010. A diferencia de los datos de mortalidad, en los datos de morbilidad no se dispone de la información separada por sexo para las comunidades autónomas.

La comparación de poblaciones mediante la diferencia de tasas ajustadas por edad solo se permite entre diferentes periodos, cuando la tendencia es similar en cada grupo de edad (Choi et al., 1999). La ECV en España no cumple este requisito. De este modo, se han calculado las tasas específicas teniendo en cuenta las distintas variables consideradas. Para ello se han empleado las proyecciones de la población anual de España y de cada una de sus comunidades autónomas, separadas por sexo y grupos de edad.

### ***Análisis de datos***

Se han calculado las tasas brutas y específicas por 100.000 habitantes de todas las rúbricas seleccionadas, para cada una de las comunidades autónomas, por sexos y por 5 grupos de edad (< 20, [20-34], [35-49], [50-75] y  $\geq 75$ ). En los datos de morbilidad no se ha realizado la separación por sexo cuando en la clasificación se incluían las comunidades autónomas, ya que los datos no estaban disponibles. También se analizó la evolución de la tasa de mortalidad de 1999 a 2010 en dos periodos, de 1999 a 2004 y de 2005 a 2010. La evolución de la tasa de morbilidad se ha realizado para el periodo de 2005 a 2010. Finalmente, se obtuvo la media de los años para cada enfermedad y sexo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 17.0 (SPSS Inc.).

## **Resultados**

### ***Magnitud de las enfermedades cardiovasculares en España. Mortalidad y Morbilidad hospitalaria***

Las tasas específicas de mortalidad y morbilidad hospitalaria de las 6 ECV estudiadas para los periodos 1999 a 2010 y 2005 a 2010, respectivamente, separados por sexo, edad y comunidades autónomas, se encuentran disponibles como material suplementario (Tablas Suplementarias S1-S14).

Durante el periodo de 1999 a 2010, se produjeron 376.915 defunciones. Las ECV fueron la principal causa de mortalidad con un total de 124.591 fallecidos para este mismo periodo. A diferencia de las mujeres, donde la ECV sigue siendo la primera causa proporcional de muerte, en

los varones ha pasado a ser la segunda (después de la mortalidad por cáncer) a partir de 1999 [Eurostat/OCDE/OMS (2008)]. La tasa de mortalidad en 1999 y 2010 en ambos sexos, junto al correspondiente cálculo del cambio porcentual para este periodo, muestra una disminución de 256,36 casos por cada 100.000 habitantes (tabla 1). Entre este conjunto de enfermedades, las más representativas son la cardiopatía isquémica (CI), que incluye el IAM y las patologías denominadas como “otras enfermedades isquémicas del corazón”, con una diferencia de 73,81 casos por cada 100.000 habitantes y la enfermedad cerebrovascular con una disminución de 64,24 casos (tabla 1).

En relación a la morbilidad, entre los años 2005 y 2010 se produjeron 4.750.663 altas hospitalarias, de las cuales 591.907 (12,46%) representan altas para las ECV. En varones, las altas hospitalarias por ECV fueron la primera causa de hospitalización (15,02%), mientras que en las mujeres (10,25%) también lo fueron, sólo por detrás de las complicaciones en el embarazo, parto y puerperio. La Insuficiencia cardíaca se muestra como la enfermedad con el cambio porcentual más elevado de tasa de morbilidad con un incremento de 232,41 altas por cada 100.000 habitantes, seguida de la Enfermedad cerebrovascular con 221,17 altas y la CI con 221,10 (tabla 1).

#### ***Distribución por sexo y edad***

La distribución de la mortalidad media para los datos generales de ECV en el periodo de 1999 a 2010 por edad y sexo se observa en la figura 1a. Se aprecia que la media de las tasas específicas de mortalidad para este periodo no muestra diferencias significativas entre varones y mujeres. Al contrario, sí se han observado diferencias entre sexos para todas las ECV cuando son consideradas separadamente, a excepción de la aterosclerosis (t-test:  $t=-1,316$ ;  $p=0,395$ ) (Tablas Suplementarias S1-S14). Las tasas específicas de mortalidad fueron superiores en mujeres para la enfermedad hipertensiva (t-test:  $t=2,371$ ;  $p<0,001$ ), insuficiencia cardíaca (t-test:  $t=1,058$ ;  $p<0,001$ ) y enfermedades cerebrovasculares (t-test:  $t=-2,396$ ;  $p=0,042$ ); en cambio, las tasas para el IAM (t-test:  $t=-9,783$ ;  $p<0,001$ ) y otras enfermedades isquémicas del corazón (t-test:  $t=-7,559$ ;  $p<0,001$ ) eran más elevadas en varones.

Entre grupos específicos de edad, la mortalidad por ECV sufre un crecimiento exponencial, significativo a partir de los 50 años de edad para ambos sexos y en todas las enfermedades analizadas (Tablas Suplementarias S1-S14). Los grupos de edad de < 20, [20-34] y [35-49], se mantienen bajos y estables en mujeres y varones, mientras que los mayores valores, sin lugar a dudas, se alcanzan a partir de los 70-75 años (fig. 1a).

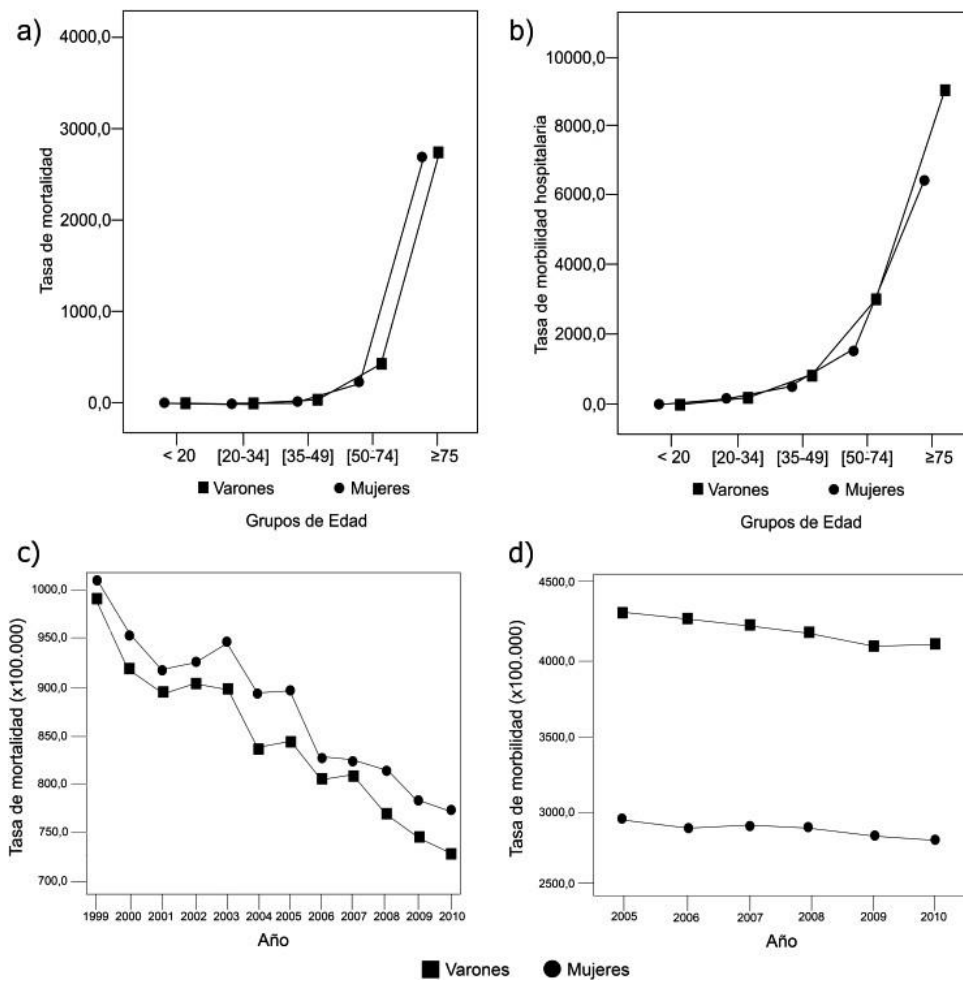
La distribución de los datos generales de ECV para la morbilidad hospitalaria media [Eurostat/OCDE/OMS (2008)] en el periodo de 2005 a 2010 por edad y sexo, se encuentra representado en la figura 1b. Observamos que la media de las tasas específicas de morbilidad para este periodo tampoco muestra diferencias significativas entre varones y mujeres. El análisis llevado a cabo en cada una de las enfermedades estudiadas sólo muestra diferencias significativas entre sexo para el IAM (t-test:  $t=-2,293$ ;  $p<0,001$ ), otras enfermedades isquémicas del corazón (t-test:  $t=-2,807$ ;  $p<0,001$ ), y aterosclerosis (t-test:  $t=-2,643$ ;  $p<0,001$ ), en que los valores son significativamente más altos en varones.

La morbilidad hospitalaria por ECV también experimenta un crecimiento exponencial con la edad (fig. 1b), alcanzando los mayores valores en las edades más avanzadas. El incremento de las tasas de morbilidad para la CI y la enfermedad cerebrovascular se observa antes de los 50 años (Tablas Suplementarias S1-S14).



|   | Tasa de mortalidad |        |    |        |        | Tasa de morbilidad hospitalaria |        |        |        |         |         |                   |         |         |         |         |         |         |        |
|---|--------------------|--------|----|--------|--------|---------------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
|   | Ambos              | 1999   | ** | Ambos  | 2010   | Ambos                           | 2005   | **     | Ambos  | 2010    | Ambos   | Cambio porcentual |         |         |         |         |         |         |        |
| Enfermedades del sistema circulatorio     | 328,05             | 303,41 | ** | 257,36 | 237,52 | 276,65                          | 256,36 | 236,52 | 275,65 | 1350,07 | 1356,17 | 1169,86           | 1303,31 | 1478,17 | 1133,27 | 1302,31 | 1477,17 | 1132,27 |        |
| Enfermedad hipertensiva                   | 12,31              | 7,91   | ** | 20,56  | 13,73  | 27,19                           | 19,56  | 12,73  | 26,19  | 59,60   | 51,17   | 67,77             | 64,22   | 55,57   | 72,62   | 63,22   | 54,57   | 71,62   |        |
| LAM                                       | 63,25              | 77,66  | ** | 49,44  | 40,10  | 47,32                           | 33,07  | 39,10  | 46,32  | 32,07   | 133,80  | 188,24            | 81,08   | 117,77  | 168,99  | 67,98   | 116,77  | 167,99  | 66,98  |
| Otras enfermedades isquémicas del corazón | 37,22              | 38,70  | ** | 35,80  | 35,71  | 40,53                           | 31,02  | 34,71  | 39,53  | 30,02   | 171,50  | 248,32            | 97,110  | 105,33  | 161,79  | 50,43   | 104,33  | 160,79  | 49,43  |
| Insuficiencia cardiaca                    | 51,59              | 35,15  | ** | 67,36  | 7,22   | 5,03                            | 9,35   | 6,22   | 4,03   | 8,35    | 206,62  | 190,20            | 222,52  | 233,41  | 217,52  | 248,87  | 232,41  | 216,52  | 247,87 |
| Enfermedades cerebrovasculares            | 96,85              | 81,97  | ** | 111,13 | 65,24  | 55,34                           | 74,87  | 64,24  | 54,34  | 73,87   | 224,66  | 245,89            | 204,11  | 222,17  | 241,55  | 203,33  | 221,17  | 240,55  | 202,33 |
| Aterosclerosis                            | 11,55              | 8,32   | ** | 14,64  | 4,11   | 3,14                            | 5,05   | 3,11   | 2,14   | 4,05    | 36,50   | 56,05             | 17,57   | 38,82   | 59,44   | 18,77   | 37,82   | 58,44   | 17,77  |

**Tabla 1.** Tasas de mortalidad y morbilidad hospitalaria (por 100,000 habitantes) para las enfermedades del sistema circulatorio.  
**Table 1.** Rates of mortality and hospital morbidity (per 100,000 population) for diseases of the circulatory system.



**Figura 1.** a) Tasas de mortalidad y b) tasas de morbilidad hospitalaria de la enfermedad cardiovascular (ECV), por grupos de edad y sexo (periodo 1999 – 2010). c) Tasas de mortalidad y d) tasas de morbilidad hospitalaria de la enfermedad cardiovascular (ECV), por sexos, en individuos  $\geq 50$  años.

**Figure 1.** a) Mortality and b) hospital morbidity rates of the cardiovascular disease (CVD) by age group and sex (period 1999 – 2010). c) Mortality and b) hospital morbidity rates of the cardiovascular disease (CVD) by sex in individuals  $\geq 50$  years.

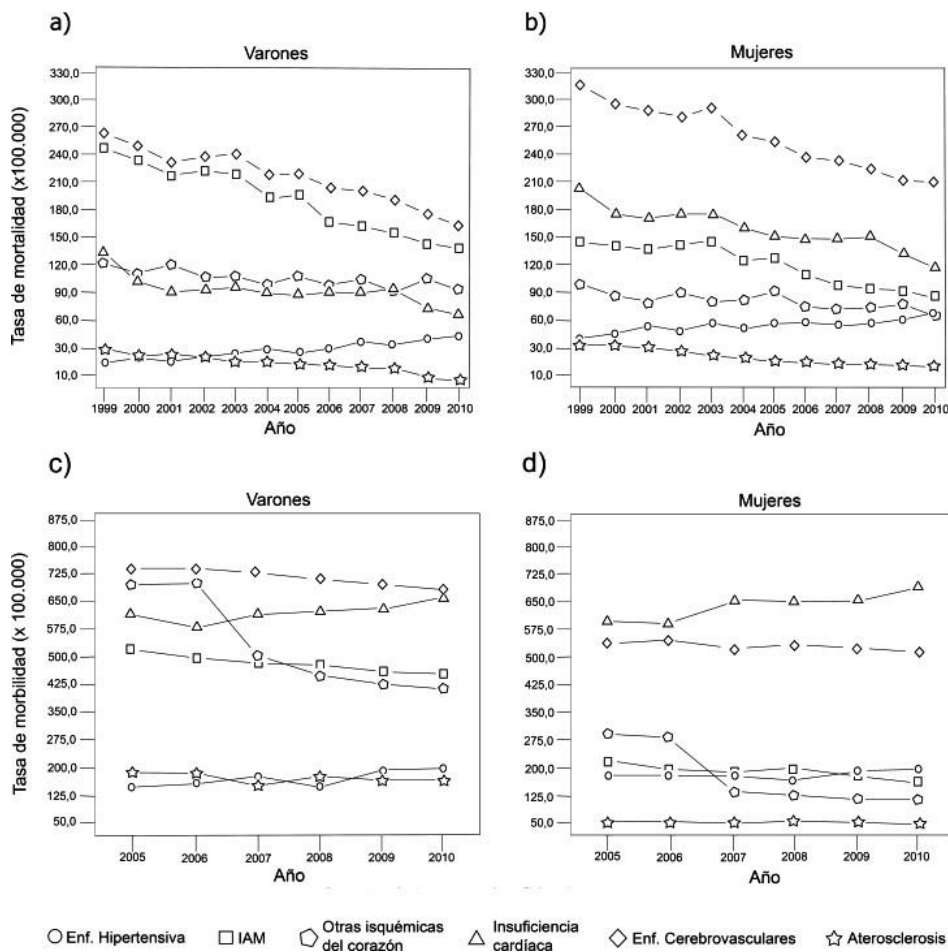
### *Tendencia temporal*

Al analizar la evolución de la mortalidad en individuos  $\geq 50$  años desde 1999 hasta el 2010 en los datos nacionales, se observa en general, un descenso de las tasas de mortalidad para la ECV en ambos sexos (fig. 1c). En varones, pasamos de obtener valores alrededor de 969,43 muertos por 100.000 habitantes en 1999 a 718,55 en 2010. En mujeres, las tasas pasaron de 1000,45 en 1999 a 746,32 muertes por 100.000 habitantes en el 2010.

La evolución de las tasas de mortalidad de las enfermedades analizadas des de 1999 a 2010 para individuos  $\geq 50$  años, se muestran en la figura 2a-b. A excepción de la categoría “otras isquémicas del corazón”, el resto de enfermedades analizadas presentaron diferencias significativas entre los años estudiados (ANOVA:  $p < 0.001$ ). Podemos observar que las enfermedades hipertensivas son las únicas en donde los valores de mortalidad no han descendido (Regresión:  $F=86,399$  en varones y  $F=101,668$  en mujeres;  $p < 0.001$ ), aunque las tasas son muy superiores en mujeres durante el periodo estudiado. En el conjunto de enfermedades clasificadas como CI observamos un ligero descenso, más acusado para el IAM (Regresión:  $F=145,438$  en varones y  $F=85,387$  en mujeres;  $p < 0.001$ ). El mismo patrón descendiente ocurre para la insuficiencia cardiaca (Regresión:  $F=31,608$  en varones y  $F=67,108$  en mujeres;  $p < 0.001$ ), las enfermedades cerebrovasculares (Regresión:  $F=93,603$  en varones y  $F=71,392$  en mujeres;

$p < 0.001$ ) y la aterosclerosis (Regresión:  $F=121,466$  en varones y  $F=126,830$  en mujeres;  $p < 0.001$ ), donde las tasas de las mujeres vuelven a superar a las de los varones.

La evolución de la tasa de morbilidad hospitalaria en la ECV general para individuos  $\geq 50$  años analizada a partir del año 2005 permanece constante hasta el 2010 (fig. 1d). La tendencia temporal de las tasas de morbilidad hospitalaria para el resto de enfermedades analizadas en el mismo periodo de tiempo se encuentra representada en la figura 2c-d. El patrón evolutivo de las altas hospitalarias, no siempre sigue el mismo comportamiento de la mortalidad para una misma enfermedad. El procedimiento inverso es vigente para la insuficiencia cardíaca y la aterosclerosis. En cambio, las series temporales de morbilidad para las enfermedades hipertensivas, las pertenecientes a CI y las enfermedades cerebrovasculares, siguen el mismo comportamiento que los valores de mortalidad, destacando un descenso de otras enfermedades isquémicas del corazón entre los años 2006 y 2007.



**Figura 2.** Tasas de mortalidad y morbilidad hospitalaria para distintas enfermedades cardiovasculares (ECV) por sexo, en individuos  $\geq 50$  años. a) Tasas de mortalidad en varones; b) Tasas de mortalidad en mujeres; c) Tasas de morbilidad en varones; d) Tasas de morbilidad en mujeres.

**Figure 2.** Mortality and hospital morbidity rates for various cardiovascular diseases (CVD) by sex, in individuals  $\geq 50$  years. a) Mortality rate in men; b) Mortality rate in women; c) Morbidity rate in men; d) Morbidity rate in women.

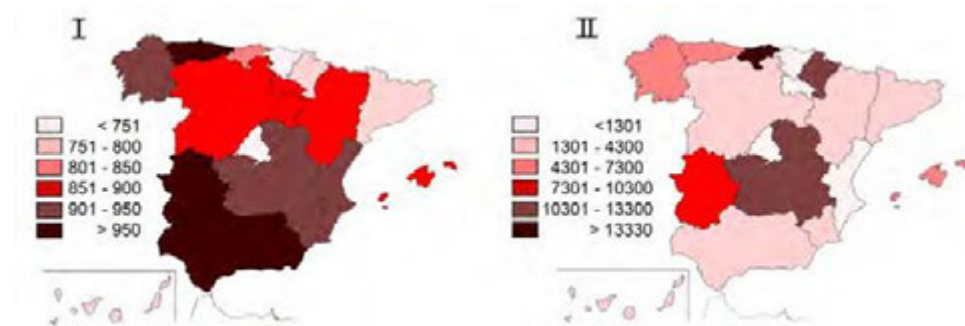
### Diferencias interregionales

Considerando únicamente el grupo de edad de  $\geq 50$  años, la media de la tasa de mortalidad de la ECV general para el periodo de 1999 a 2010, muestra diferencias significativas entre comunidades autónomas (fig. 3). Además, estas diferencias también están presentes en las 6 subdivisiones analizadas (fig. 4). La región con las tasas de mortalidad más elevadas en general

para estas patologías es Andalucía. Cabe destacar el caso de las islas Canarias por tener unas de las mayores tasas de mortalidad de CI y enfermedades hipertensivas, mientras que para las enfermedades cerebrovasculares se encuentra entre las más bajas. El caso inverso sucede en la comunidad de Cantabria. Respecto a la insuficiencia cardiaca, los valores son similares en todas las comunidades.

En relación a la morbilidad hospitalaria, los datos obtenidos de las tasas de morbilidad en la ECV general y el resto de enfermedades analizadas en individuos  $\geq 50$  años para el mismo periodo (fig. 3 y 4, respectivamente), también expresan diferencias interregionales. Galicia es una de las comunidades con menores tasas de morbilidad en general (fig. 4).

Los datos de las diferencias interregionales de mortalidad cardiovascular por sexos tampoco son uniformes. Para el grupo de edad de  $\geq 50$  años, observamos que tanto los varones como las mujeres muestran diferencias significativas en todas las enfermedades estudiadas (fig. 5).



**Figura 3.** Tasas de mortalidad (I) y morbilidad hospitalaria (II) de la enfermedad cardiovascular (ECV), en individuos  $\geq 50$  años, para ambos sexos en las diferentes comunidades autónomas.

**Figure 3.** Mortality rates (I) and hospital morbidity rates (II) for cardiovascular disease (CVD), in individuals  $\geq 50$  years for both sexes in different autonomous communities.

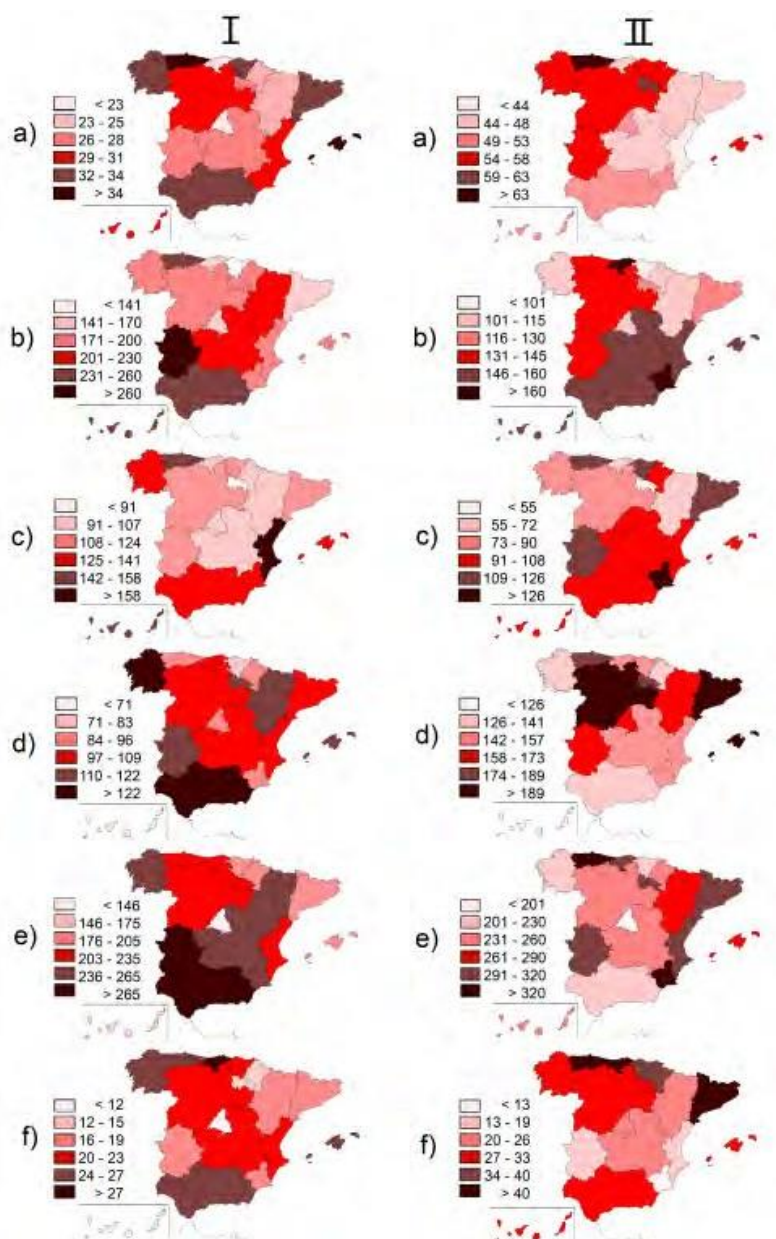
## Discusión

La interpretación de las enfermedades complejas, como las ECV, comprende de un análisis ambiental y un análisis genético, para su completo entendimiento. El desarrollo de estas enfermedades se ve incrementado por la edad, el sexo, la historia familiar (Sesso et al., 2001) y posiblemente el origen étnico (Forouhi et al., 2006). En los últimos años, se ha prosperado en el diagnóstico, tratamiento y control de los factores de riesgo involucrados. A pesar de todo, las ECV siguen siendo la principal causa de muerte y altas hospitalarias en nuestro país.

Para las ECV en general, el riesgo cardiovascular es superior en los varones y este incrementa con la edad. Los varones ostentan las tasas de morbilidad más elevadas y también muestran un mayor número absoluto de altas hospitalarias. Esto sucede porque en las mujeres la detección de las ECV suele ser más tardía (Mosca et al., 2004). En las edades más avanzadas, el número de mujeres en la población es superior al de los varones. Por este motivo, aunque el total absoluto de muertes por ECV sea más elevado en las mujeres, las tasas específicas de mortalidad son superiores en varones.

El análisis realizado para evaluar las diferencias entre sexos de las ECV en general, no mostraba diferencias significativas entre varones y mujeres, tanto para los valores de morbilidad hospitalaria como para los de mortalidad. Estas diferencias se hacían patentes cuando efectuamos un análisis por separado de las diferentes ECV. En referencia a las tasas de morbilidad, las enfermedades clasificadas como CI y la aterosclerosis fueron las únicas en presentar diferencias significativas, en cambio, para la tasa de mortalidad, la aterosclerosis fue la única que no presentó tales diferencias. Aunque las enfermedades cerebrovasculares sean la causa principal, ocasionando el mayor número de muertes cardiovasculares en mujeres, también lo sería en los hombres si no considerásemos el IAM y otras enfermedades isquémicas del corazón en un mismo subconjunto (CI). Este hecho, indicaría un adelanto de la edad promedio de muerte para las enfermedades cerebrovasculares (Medrano et al., 2005), reforzando los resultados obtenidos en el análisis de diferenciación por edad para esta misma enfermedad, en los cuales podíamos observar

un anticipo significativo (Tablas Suplementarias S1-S14) de la edad promedio de detección. Además, demostraría que en España los valores de mortalidad para ECV aún no se han estabilizado como en la mayoría de países industrializados (Fuster 1999).

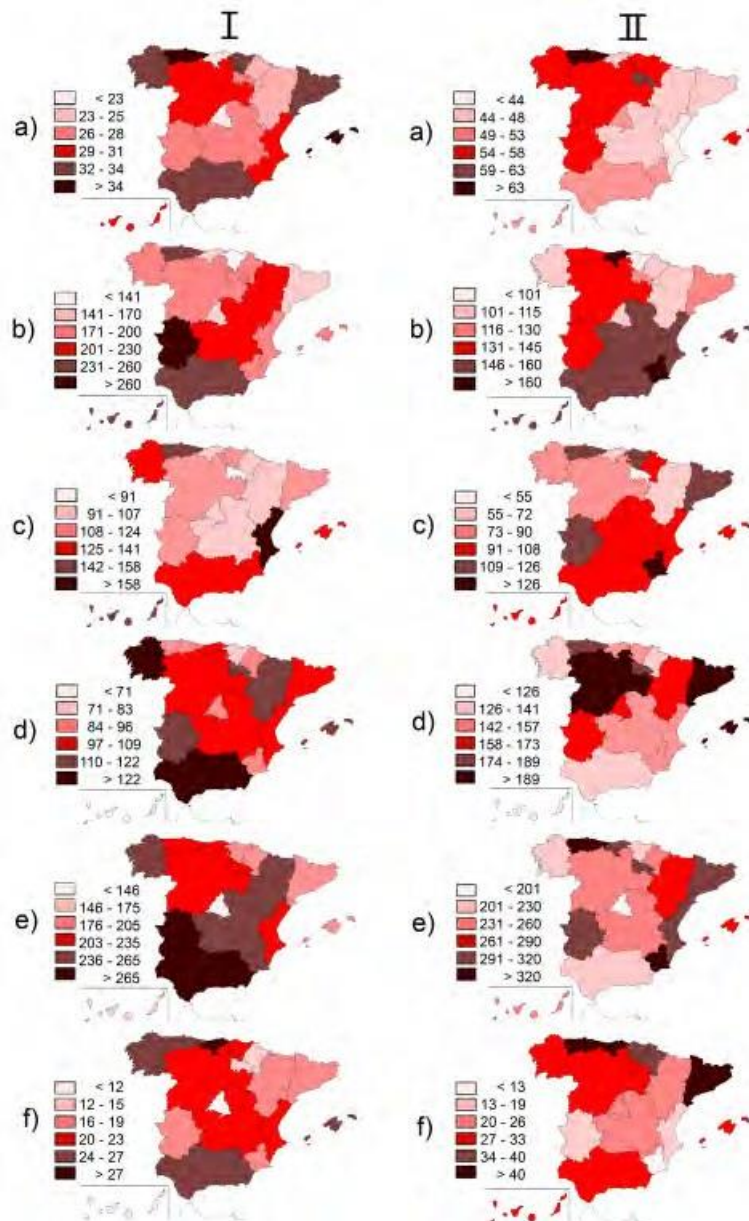


**Figura 4.** Tasas de mortalidad (I) y morbilidad hospitalaria (II) en individuos  $\geq 50$  para ambos sexos en las diferentes comunidades autónomas. a) Enfermedad hipertensiva; b) IAM; c) Otras enfermedades isquémicas del corazón; d) Insuficiencia cardíaca; e) Enfermedades cerebrovasculares; f) Aterosclerosis.

**Figura 4.** Mortality rates (I) and hospital morbidity rates (II) in individuals  $\geq 50$  years for both sexes in different autonomous communities. a) Hypertension; b) AMI; c) Other ischemic heart disease; d) Heart failure; e) Stroke; f) Atherosclerosis.

España no ha sido ajena a los cambios globales en los patrones de riesgo. A pesar de todo, observamos que en la ECV en general, la tendencia a disminuir de la tasa de mortalidad es mayor que la tendencia en morbilidad (fig. 1c-d). Este descenso ha ocasionado que la ECV haya pasado

a ser la segunda causa de muerte en los varones a partir de 1999, por detrás del grupo de tumores. Salvo por otras enfermedades isquémicas del corazón, el resto de ECV muestran diferencias significativas en sus tasas de mortalidad entre 1999 y 2010, con mayores y menores tasas, respectivamente. La excepción se encuentra en las enfermedades hipertensivas, donde su mortalidad y morbilidad se han visto aumentadas. En determinados casos se ha infravalorado el verdadero impacto demográfico de esta enfermedad, pues se le atribuye el desarrollo del 51% de las enfermedades cerebrovasculares, el 45% de las CI y otras enfermedades como la insuficiencia hepática [WHO (2009)].



**Figura 5.** Tasas de mortalidad por varones (I) y mujeres (II) en individuos  $\geq 50$  en las diferentes comunidades autónomas. a) Enfermedad hipertensiva; b) IAM; c) Otras enfermedades isquémicas del corazón; d) Insuficiencia cardíaca; e) Cerebrovasculares; f) Aterosclerosis

**Figure 5.** Mortality rates por males (I) and women (II) in individuals  $\geq 50$  years in different autonomous communities. a) Hypertension; b) AMI; c) Other ischemic heart disease; d) Heart failure; e) Stroke; f) Atherosclerosis.

Para el IAM y las enfermedades cerebrovasculares se observa una disminución de las tasas específicas de mortalidad. Sin embargo, aunque en la insuficiencia cardíaca y la aterosclerosis también hayan experimentado un descenso, en estas enfermedades las tasas de morbilidad siguen en aumento. El envejecimiento de la población, la aparición de nuevos instrumentos para el diagnóstico y la mejora en los índices de supervivencia, permiten un mayor número de hospitalizaciones e incremento de la carga sociosanitaria. Datos como los obtenidos en diversos registros y estudios clínicos nacionales como el PRIAMHO (Cabades et al., 1999), el ARIAM (López et al., 2001) o el PREVESE II (Velasco et al., 2002), también se han de tomar en cuenta.

La distribución de la mortalidad y la morbilidad obtenida de las ECV en las diferentes comunidades autónomas de España, muestra diferencias significativas. Estos datos, consistentes con otros estudios realizados [ver por ej. Boix et al. (1998)], se han mantenido casi inalterados durante el periodo analizado, en general con tasas de mortalidad más bajas en el norte que en el sur y al contrario respecto a la morbilidad. Los factores influyentes residen fundamentalmente en los cambios de las condiciones de vida y hábitos socioculturales ligados al área geográfica de residencia, como la dieta o las desigualdades socioeconómicas<sup>6</sup>. Existen evidencias de una relación inversa entre las clases sociales y la mortalidad por estas enfermedades (Borrell et al., 2008) que ha ido aumentando en los últimos 30 años. En concreto, los últimos datos del estudio ENRICA (Banegas et al., 2011), inciden en un gradiente educativo inverso en algunos de los principales factores de riesgo.

España presenta unas de las tasas de mortalidad para ECV más bajas al compararse con otros países europeos e incluso con el resto del mundo [INE (2013)], pero los datos estadísticos obtenidos demuestran que estas enfermedades, en concreto la CI, son la causa principal de muertes y altas hospitalarias en el país durante el periodo de 1999 a 2010. Si bien hemos observado una clara disminución de las tasas de mortalidad, el número absoluto de defunciones sigue aumentando. Al mismo tiempo, importantes diferencias tanto de género como regionales existen para las tasas de mortalidad y morbilidad.

## Referencias

- Banegas JR., Graciani A., Guallar-Castillón P., León-Muñoz LM., Gutiérrez-Fisac JL., López-García E., Otero-Rodríguez A., Regidor E., Taboada JM., Aguilera MT., Villar F., Zuluaga MC., Rodríguez-Artalejo F., 2011, Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA). Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Bertomeu V., y Castillo-Castillo J., 2008, Situación de la enfermedad cardiovascular en España. Del riesgo a la enfermedad. *Revista Española de Cardiología*, 8, 2-9.
- Boix R., Aragonés N., y Medrano MJ., 2003, Tendencias en la mortalidad por cardiopatía isquémica en 50 provincias españolas. *Revista Española de Cardiología*, 56, 850-856.
- Borrell C., Azlor E., Rodríguez-Sanz M., Puigpinós R., Cano-Serral G., Pasarín MI., Martínez JM., Benach J., y Muntaner C., 2008, Trends in socioeconomic mortality inequalities in a southern European urban setting at the turn of the 21st century. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 26, 258-266.
- Brea A., Laclaustra M., Martorell E., y Pedragosa A., 2013, Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en España. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 25, 211-217.
- Brotons C., Cuende JL., Pardo JF., Plana N., y Moral I., 2013, Cardiopatía isquémica. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 25, 203-210.
- Cabades A., López-Bescós L., Arós F., Loma-Osorio A., Bosch X., Pabón P., y Marrugat J., 1999, Variabilidad en el manejo y pronóstico a corto y medio plazo del infarto de miocardio en España: el estudio PRIAMHO. *Revista Española de Cardiología*, 52, 767-775.
- Choi BC., Guia NA., y Walsh P., 1999, Look before You Leap: Stratify before You Standardize. *American Journal of Epidemiology*, 149, 1087-1096.
- Dégano IR., Elousa R., y Marrugat J., 2013, Epidemiología del síndrome coronario agudo en España: estimación del número de casos y la tendencia de 2005 a 2049. *Revista Española de Cardiología*, 66, 472-481.

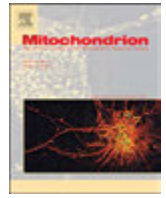
- Estruch R., Ros E., Salas-Salvadó J., Covas MI., Corella D., Arós F., Gómez-Gracia E., Ruiz-Gutiérrez V., Fiol M., Lapetra J., Lamuela-Raventos RM., Serra-Majem L., Pintó X., Basora J., Muñoz MA., Sorlí JV., Martínez JA., y Martínez-González MA., 2013, PREDIMED (Primary Prevention of cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet). *New England Journal of Medicine*, 368, 1279-1290.
- Forouhi NG., y Sattar N., 2006, CVD risk factors and ethnicity – a homogeneous relationship?. *Atherosclerosis. Supplements*, 1, 11–19.
- Fuster V., 1999, Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges. *Circulation*, 99, 1132-1137.
- Gabriel R., Alonso M., Segura A., Tormo M., Artigao L., Banegas J., Brotons C., Elosua R., Fernández-Cruz Arturo., Muñoz J., Reviriego B., y Rigo F., 2008, Prevalencia, distribución y variabilidad geográfica de los principales factores de riesgo cardiovascular en España. Análisis agrupado de datos individuales de estudios epidemiológicos poblacionales: estudio ERICE. *Revista Española de Cardiología*, 61, 1030-1040.
- Grau M., Elosua R., Cabrera de León A., Guembe MJ., Baena-Díez JM., y Vega T., 2011, Factores de riesgo cardiovascular en España en la primera década del siglo xxi: análisis agrupado con datos individuales de 11 estudios de base poblacional, estudio DARIOS. *Revista Española de Cardiología*, 64, 295-304.
- Gutiérrez JA., Gómez JA., Gómez de la Cámara A., Rubio MA., Cancelas P., y Jurado C., 2011, DRECE (Dieta y Riesgo de Enfermedades Cardiovasculares en España) 1990-2010. *Medicina Clínica Monografías*, 12, 1-39.
- Instituto Nacional de Estadística: Encuesta de morbilidad hospitalaria. Resultados según la lista reducida Eurostat/OCDE/OMS (2008). Disponible en: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>.
- Instituto Nacional de Estadística: Defunciones según la causa de muerte (citado 30 Abr 2012). Disponible en: <http://www.ine.es>
- Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte. Datos europeos (citado 27 Feb 2013). Disponible en: <http://www.ine.es>.
- Krzywanski D., Moellering D., Fetterman J., Dunham-Snary K., Sammy M., y Ballinger S., 2011, The mitochondrial paradigm for cardiovascular disease susceptibility and cellular function: a complementary concept to Mendelian genetics. *Laboratory Investigation*, 91, 1122-1135.
- López JB., Andrés de Llano JM., Berrocal CA., y Palacín RP., 2001, Características de los pacientes con infarto agudo de miocardio sometidos a ventilación mecánica. Datos del registro ARIAM. *Revista Española de Cardiología*, 54, 851-859.
- Marrugat J., Elosúa R., y Martí H., 2002, Epidemiología de la cardiopatía isquémica en España: estimaciones del número de casos y de las tendencias entre 1997 y 2005. *Revista Española de Cardiología*, 55, 337-346.
- Medrano MJ., Boix R., y Cerrato E., 2005, Relevancia epidemiológica de las enfermedades cardiovasculares. Razones para la monitorización. Usos de la monitorización. 2ª Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología, editado por Fernandez E (Madrid: Emisa) p.118.
- Mosca L., Appel LJ., Benjamin EJ., Berra K., Chandra-Strobos N., Fabunmi RP., Grady D., Haan CK., Hayes SN., Judelson DR., Keenan NL., McBride P., Oparil S., Ouyang P., Oz MC., Mendelsohn ME., Pasternak RC., Pinn, VW., Robertson RM., Schenck-Gustafsson K., Sila CA., Smith SC., Sopko G., Taylor AL., Walsh BW., Wenger NK., y Williams CL, 2004, Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. *Circulation*, 109, 672-693.
- Sesso HD., Lee IM., Gaziano JM., Rexrode KM., Glynn RJ., y Buring JE, 2001, Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women. *Circulation*, 104, 393-408.
- Soriguer F., Goday A., Bosch-Comas A., Bordiú E., Calle-Pascual A., Carmena R., Casamitjana R., Castaño L., Castell C., Catalá M., Delgado E., Franch J., Gaztambide S., Gírbés J., Gomis R., Gutiérrez G., López-Alba A., Martínez-Larrad MT., Menéndez E., Mora-Peces I., Ortega E., Pascual-Manich G., Rojo-Martínez G., Serrano-Rios M., Valdés S., Vázquez JA., y Vendrell J., 2012, Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*, 55, 88-93.



Velasco JA., Cosín J., López-Sendón JL., Teresa E., Oya M., y Sellers G., 2002, Nuevos datos sobre la prevención secundaria del infarto de miocardio en España. Resultados del estudio PREVESE II. Revista Española de Cardiología, 55, 801-809.

World Health Organization, 2009, Global Health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks (Geneva: WHO press).pp.70

World Health Organization: Enfermedades cardiovasculares. Nota informativa (Enero de 2011); Disponible en: [http://www.who.int/topics/cardiovascular\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/es/).



# Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: A case-control study in Castile and Leon (Spain) population

Miriam Umbria<sup>a</sup>, Amanda Ramos<sup>a</sup>, Jennifer Caner<sup>a</sup>, Tomás Vega<sup>b</sup>, José Eugenio Lozano<sup>b</sup>, Cristina Santos<sup>a,\*</sup>, Maria Pilar Aluja<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unitat d'Antropologia Biològica, Departament BABVE, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León, 47007 Valladolid, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Cardiovascular disease  
Myocardial infarction  
Stroke  
Hypertension  
mtDNA haplogroups  
Spain

## ABSTRACT

There are strong evidences that common mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups may influence the pathogenesis of cardiovascular diseases (CVDs). In this matched case-control study, we investigate the association between mtDNA haplogroups and two CVDs, myocardial infarction (MI) and stroke, and classical cardiovascular risk factors.

Data obtained show that haplogroup H constitute a susceptibility risk factor for MI ( $p = 0.001$ ; OR = 2.379, 95% CI [1.440–3.990]). Otherwise, our data also suggest a beneficial role of haplogroup J against hypertension ( $p = 0.019$ ; OR = 0.348, 95% CI [0.144–0.840]). These results may provide some guidance for predicting the genetic risk of these diseases in different human populations through the differences in energy efficiency between haplogroups.

## 1. Introduction

Mitochondria play a central role in energy production of eukaryotic cells and have essential metabolic functions such as the regulation of redox state (Handy and Loscalzo, 2012). These organelles possess their own genome – mitochondrial DNA (mtDNA) – encoding several subunits of the electronic transport chain (ETC) and the components of their translation machinery (Loschen et al., 1974). The mutation rate of mitochondrial genome, higher than nuclear DNA, lead to the accumulation of a high number of nucleotide changes across evolution. MtDNA polymorphisms, particularly those arising early in human evolutionary history, determine classes of continent-specific haplogroups. After early humans migrated to colder climates, their chances of survival increased when mutations in their mtDNA resulted in greater body heat production (Ruiz-Pesini et al., 2004). These mutations could have decreased the coupling efficiency of oxidative phosphorylation (OXPHOS), reducing reactive oxygen species (ROS) production, thus requiring more calories to generate the same amount of adenosine triphosphate (ATP) (Wallace, 2013a).

Results obtained during the last years suggest that mtDNA haplogroups affect differently the assembly and stability of the ETC (Chen

et al., 2012; Kalogeris et al., 2014; Kenney et al., 2014a,b; Malik et al., 2014; Marcuello et al., 2009; Martinez-Redondo et al., 2010). Tissues particularly dependent of oxidative metabolism, i.e. cardiac muscle or central nervous system, are especially vulnerable to alterations in the mitochondrial function (Gomez-Duran et al., 2010). For that reason, although mtDNA variation might have permitted our ancestors to adapt to colder climates, these findings also suggest that mtDNA haplogroups may play an important role in the predisposition to, or to protection against certain diseases (Wallace and Chalkia, 2013). In fact, recent evidences reported the association of mtDNA haplogroups with cardiovascular diseases (CVDs) in European (Castro et al., 2006; Chinnery et al., 2010; Fernandez-Caggiano et al., 2012, 2013; Finnilä et al., 2001; Hagen et al., 2013; Hudson et al., 2014; Kofler et al., 2009; Martikainen and Majamaa, 2010; Palacin et al., 2011; Rosa et al., 2008) and Asian populations (Cai et al., 2015; Nishigaki et al., 2007; Yang et al., 2014), and some classic cardiovascular (CV) risk factors (Gonzalez et al., 2012; Ebner et al., 2015; Nardelli et al., 2013; Poulton et al., 2002; Rea et al., 2013; Zhu et al., 2009) in both population. In the same line of evidence, the production of ROS appears to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and CVDs (Chang et al., 2010; Peluso et al., 2012).

**Abbreviations:** ATP, adenosine triphosphate; CI, Confidence Intervals; CV, cardiovascular; CVDs, cardiovascular diseases; ETC, electronic transport chain; MI, myocardial infarction; mtDNA, mitochondrial DNA; OR, Odds Ratios; OXPHOS, oxidative phosphorylation; rCRS, revised Cambridge Reference Sequence; ROS, reactive oxygen species

\* Corresponding authors at: Unitat Antropologia Biològica, Dep. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat Biociències Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

E-mail addresses: [cristina.santos@uab.cat](mailto:cristina.santos@uab.cat) (C. Santos), [mariapilar.aluja@uab.cat](mailto:mariapilar.aluja@uab.cat) (M.P. Aluja).

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.004>

Received 26 January 2017; Received in revised form 5 October 2017; Accepted 11 December 2017  
Available online 16 December 2017

1567-7249/ © 2017 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

Myocardial infarction (MI) and stroke are the most frequent CVDs being the two leading causes of death in Western countries. These diseases, share a common pathophysiology involving atherosclerosis and thrombosis (or clotting) (World Health Organization, 2015). Development of MI and stroke are influenced by the same genetic and modifiable, environmental factors such as hypertension, diabetes and hypercholesterolemia. In addition, MI and stroke are also associated with age, gender, family history and ethnicity (Krzyszowski et al., 2011). However, several studies suggest that reactivity of intra- and extracranial arteries to such factors could be different (Bang et al., 2005; D'Armiento et al., 2001; Guo et al., 2003; Wei et al., 2007). Thus, because of the differences in the prevalence of the main etiological factors, the association of the mtDNA haplogroups with MI and stroke could be different.

MtDNA variations affect differently the coupling efficiency of the OXPHOS, leading to changes in bioenergetics response that could be in CVDs. Moreover, the effect of mtDNA variation can be different depending on the pathophysiology of each disease. To evaluate these hypotheses, we analyzed the mtDNA haplogroups in two CVDs, MI and stroke, in the same population and considering the same risk factors. The main goals of this study were: i) to investigate the possible association between mtDNA haplogroups and MI and stroke, ii) to investigate the possible association between mtDNA haplogroups and classical CV risk factors.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample collection and DNA extraction

A case-control study was carried out using samples taken from the Cardiovascular Disease Risk Study of Castile and Leon (Vega Alonso et al., 2007) in a cross-sectional, observational and descriptive study performed in Castile and Leon (centre-north region of Spain). A random sample from general population underwent a health examination in relation with cardiovascular risk factors in 2004. These individuals were followed up with the same methodology in 2009 and 2014. Sampling was performed following Helsinki protocol after informed consent. Blood samples were placed in the National DNA Bank (University of Salamanca: [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)) where DNA extraction was carried out using an automated process on a robot Autopure LS (Genra Systems, Minneapolis, MN).

For each individual, information about age (categories  $\leq 44$ , [45–49], [50–54], [55–59], [60–64],  $\geq 65$  years), gender, geographic origin (North, Central and South regions of Castile and Leon), history of hypertension ( $\geq 140/90$  mmHg), history of diabetes, history of hypercholesterolemia ( $> 200$  mg/dl), cigarette consumption (smokers, former smokers and non-smokers), presence of overweight or obesity (body mass index  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), presence of high abdominal perimeter in risk range (risk:  $\geq 80$  cm for women and  $\geq 94$  cm for men) and presence of high levels of triglycerides ( $\geq 170$  mg/dl) was obtained from the databases of original study (Vega Alonso et al., 2007).

Cases included in the present study had a clinical history of CVD: 211 individuals presented a history of MI and 154 individuals of stroke. Two hundred eleven and 154 controls without history of MI and stroke respectively were selected and matched with cases taking into account age, gender and geographic origin.

### 2.2. MtDNA amplification and sequencing

MtDNA haplogroup was defined according to the control region sequence and coding region polymorphisms.

For each sample, the control region of the mtDNA was amplified between positions 15,907 and 580 using primers L15907: 5'-ATACAC CAGTCTTGTAACC-3' (Santos et al., 2005) and H580: 5'-TTGAGGAG GTAAGCTACATA-3' (Heyer et al., 2001). Polymerase chain reaction (PCR) was performed according to conditions described by Santos et al.,

2005.

Control region PCR products were purified using ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, California) and sequenced using two forward (L15907; L16485: 5'-GAACTGTATCCGACATCTGG-3') (Santos et al., 2005) and two reverse primers (H1\_8: 5'-GGTTAATAGGGTGATAG ACC-3'; H2\_288: 5'-GGGGTTTGGTGAAATTTT-3') (Santos et al., 2005). Sequence reactions were carried out using Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's specifications. Purification of DNA sequencing reactions were performed with BigDye XTerminator® Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and sequences were run in an ABI 3730xl sequencer (Servei de Genòmica, Universitat Autònoma de Barcelona).

Coding region phylogenetic mtDNA informative polymorphisms 7028, 11,719, 12,308, 12,705, 13,708 and 14,766 were further analyzed as previously detailed by Santos et al., 2004.

### 2.3. Data analysis

Sequences were aligned in relation to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) (Andrews et al., 1999) using the SeqScape 2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, USA). Haplogroup assignment was performed according to the nomenclature summarized by van Oven and Kayser - Phylotree build 17 (Van Oven and Kayser, 2009) using Haplogrep software (Kloss-Brandstatter et al., 2001).

The mtDNA sequences obtained were grouped in four phylogenetically related clusters according to their evolutionary proximity: R0a'b, non-R, JT and UK. Based on the results obtained, groups were split to look for the effect of particular haplogroups.

McNemar's test or marginal homogeneity test was used to compare the frequency of CV risk factors (cigarette consumption, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, abdominal perimeter and triglycerides) between MI and stroke cases and controls.

Frequencies of all mtDNA haplogroup clusters in MI and stroke cases and controls were compared using McNemar's test. To adjust the association analysis for the potential confounding effect of CV risk factors, a conditional logistic regression was applied. Each haplogroup was compared to the remaining haplogroups pooled in to a single group. Odds Ratios (OR) and their 95% Confidence Intervals (CI) were calculated adjusting for the effect of risk factors.

In order to analyze if conventional CV risk factors (hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, abdominal perimeter and levels of triglycerides) were associated with mtDNA haplogroups, a logistic regression was applied. In these analyses, only data from the 365 individuals that belong to the control group (that is, individuals without history of MI or stroke) were considered.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS ver. 22.0 (SPSS Inc.). All differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Association between mtDNA haplogroups and MI

A summary of the sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of MI cases and controls subjects is shown in Table 1. Hypertension and hypercholesterolemia were significantly higher in MI cases than in controls [(hypertension: 90.5% vs. 69.2%, respectively;  $p < 0.001$ , McNemar's test) and (hypercholesterolemia: 71.5% vs. 47.4%, respectively;  $p < 0.001$ , McNemar's test)] (Table 1). The frequency of individuals with diabetes, overweight or obesity, abdominal perimeter in risk range, and high triglycerides, was similar in MI cases and controls.

Detailed mtDNA results of MI cases and controls are reported in Supplementary Table S1 and the frequencies of mtDNA clusters are showed in Table 2. Significant differences were found in the distribution of mtDNA macrohaplogroups between MI cases and controls

**Table 1**  
Sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of myocardial infarction (MI) and stroke cases and controls.

|   | Controls             |                      | P-value <sup>a</sup> | Patients with stroke |                     | P-value <sup>b</sup> |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|   | n = 211(%)           | n = 211(%)           |                      | n = 154(%)           | n = 154(%)          |                      |
| Age (years)                                     |                      |                      |                      |                      |                     |                      |
| ≤ 44  | 4 (1.9)              | 6 (2.8)              |                      | 0 (0)                | 1 (0.6)             |                      |
| 45–49   | 11 (5.2)             | 8 (3.8)              |                      | 3 (1.9)              | 3 (1.9)             |                      |
| 50–54   | 5 (2.4)              | 7 (3.3)              | Matched              | 2 (1.3)              | 4 (2.6)             | Matched              |
| 55–59   | 13 (6.2)             | 12 (5.7)             |                      | 10 (6.5)             | 6 (3.9)             |                      |
| 60–64   | 20 (9.5)             | 24 (11.4)            |                      | 10 (6.5)             | 14 (9.1)            |                      |
| ≥ 65  | 158 (74.9)           | 154 (73.0)           |                      | 129 (83.8)           | 126 (81.8)          |                      |
| Male/female                                     | 128 (60.7)/83 (39.3) | 128 (60.7)/83 (39.3) | Matched              | 91 (59.1)/63 (40.9)  | 91 (59.1)/63 (40.9) | Matched              |
| Geographic origin                               |                      |                      |                      |                      |                     |                      |
| North   | 54 (25.6)            | 54 (25.6)            |                      | 40 (26.0)            | 40 (26.0)           |                      |
| Central   | 88 (41.7)            | 88 (41.7)            | Matched              | 75 (48.7)            | 75 (48.7)           | Matched              |
| South   | 69 (32.7)            | 69 (32.7)            |                      | 39 (25.3)            | 39 (25.3)           |                      |
| Cigarette consumption                           |                      |                      |                      |                      |                     |                      |
| Non-smoking                                     | 121 (57.3)           | 105 (49.8)           |                      | 95 (61.7)            | 86 (55.8)           |                      |
| Former smoker                                   | 57 (27)              | 82 (38.9)            | 0.566                | 41 (26.6)            | 52 (33.8)           | 0.448                |
| Smoker  | 33 (15.6)            | 24 (11.4)            |                      | 18 (11.7)            | 16 (10.4)           |                      |
| Hypertension (≥ 140/90 mmHg)                    | 146 (69.2)           | 191 (90.5)           | < 0.001              | 120 (77.9)           | 134 (87)            | 0.055                |
| Diabetes  | 40 (19)              | 54 (25.6)            | 0.099                | 22 (14.3)            | 32 (20.8)           | 0.144                |
| Hypercholesterolemia (> 200 mg/dl)              | 100 (47.4)           | 151 (71.6)           | < 0.001              | 64 (41.6)            | 92 (59.7)           | 0.002                |
| Overweight or obesity (≥ 25 kg/m <sup>2</sup> ) | 162 (76.8)           | 158 (74.9)           | 0.734                | 118 (76.6)           | 103 (66.9)          | 0.092                |
| High abdominal perimeter (> 80 or > 94 cm)      | 163 (77.3)           | 159 (75.4)           | 0.731                | 120 (77.9)           | 108 (70.1)          | 0.169                |
| Triglycerides (≥ 170 mg/dl)                     | 28 (13.3)            | 27 (12.8)            | 1.000                | 14 (9.1)             | 15 (9.7)            | 1.000                |

MI = Myocardial infarction.

P-value of a paired McNemar test for dichotomous variables samples and Marginal Homogeneity test when a category of the samples is more than two.

<sup>a</sup> P-value of McNemar or marginal homogeneity test used to compare controls and MI.

<sup>b</sup> P-value of McNemar or marginal homogeneity test used to compare controls and stroke.

(Table 2). Cluster R0a'b was more frequent in MI cases (60.7%), differing significantly from controls (50.7%) ( $p = 0.050$ , McNemar's test). After correction for the effect of CV risk factors with significant differences between MI cases and controls (hypertension and hypercholesterolemia), association remained significant for R0a'b (conditional logistic regression:  $p = 0.050$ ; OR = 1.550, 95% CI [1.001–2.399]). For looking the particular haplogroup responsible of the association, a subdivision of the R0a'b cluster was performed (Table 3). In this case, haplogroup H was significantly overrepresented in stroke cases (50.7%) when compared to controls (36.5%) ( $p = 0.002$ , McNemar's test). When corrected for the effect of CV risk factors for MI, significant association were still observed in haplogroup H (conditional logistic regression:  $p = 0.002$ ; OR = 2.379, 95% CI [1.440–3.990]), emerging as a possible genetic risk factor for MI (Table 3).

### 3.2. Association between mtDNA haplogroups and stroke

Sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of stroke cases and controls are reported in Table 1. The percentage of individuals with hypercholesterolemia were found to be significantly more frequent in stroke cases than controls (hypercholesterolemia: 59.7% vs. 41.6%, respectively;  $p = 0.002$ , McNemar's test). The cigarette consumption profile, the frequency of individuals with hypertension, diabetes, overweight or obesity, abdominal perimeter in risk range, and high triglycerides were similar in stroke cases and controls.

MtDNA characterization of stroke cases and controls is available in Supplementary Table S1 and the mtDNA cluster frequencies are showed in Table 2. No significant differences between cases and controls were observed for any of the four groups (Table 2).

**Table 2**  
Major mtDNA macrohaplogroups frequencies (%) in myocardial infarction (MI) and stroke cases and in control group.

| Haplogroup clusters | Myocardial infarction (MI) |            |                |  |                     | Stroke                    |           |                |  |                     |
|---------------------|----------------------------|------------|----------------|--|---------------------|---------------------------|-----------|----------------|--|---------------------|
|                     | Number of individuals (%)  |            | McNemar's test | Conditional logistic regression <sup>b</sup> |                     | Number of individuals (%) |           | McNemar's test | Conditional logistic regression <sup>b</sup> |                     |
|                     | Controls                   | Cases      | P-value        | P-value                                      | OR [95% CI]         | Controls                  | Cases     | P-value        | P-value                                      | OR [95% CI]         |
| R0a'b               | 107 (50.7)                 | 128 (60.7) | 0.050          | 0.050  | 1.550 [1.001–2.399] | 81 (52.6)                 | 86 (55.8) | 0.635          | 0.630  | 1.126 [0.695–1.825] |
| Non-R <sup>a</sup>  | 19 (9.0)                   | 11 (5.2)   | 0.201          | 0.235  | 0.597 [0.255–1.399] | 16 (10.4)                 | 8 (5.2)   | 0.134          | 0.170  | 0.520 [0.205–1.321] |
| JT                  | 41 (19.4)                  | 33 (15.6)  | 0.322          | 0.748  | 0.902 [0.481–1.690] | 27 (17.5)                 | 27 (17.5) | 1.000          | 0.718  | 1.129 [0.585–2.179] |
| UK                  | 44 (20.9)                  | 39 (18.5)  | 0.575          | 0.600  | 0.628 [0.322–1.119] | 30 (19.5)                 | 33 (21.4) | 0.766          | 0.984  | 1.006 [0.545–1.857] |
| Total               | 211                        | 211        |                |  |                     | 154                       | 154       |                |  |                     |

<sup>a</sup> Non-R including (L\*, M\* and N\*).

<sup>b</sup> Conditional logistic regression model was performed considering significant covariates for myocardial infarction (hypertension, hypercholesterolemia and pooled haplogroups) and stroke (hypercholesterolemia and pooled haplogroups).

**Table 3**  
Subdivision of mtDNA haplogroup R0a'b frequencies (%) in myocardial infarction (MI) cases and in control group.

| Haplogroup         | Myocardial infarction (MI) |            | McNemar's test | Conditional logistic regression <sup>c</sup> |                     |
|--------------------|----------------------------|------------|----------------|--|---------------------|
|                    | Number of individuals (%)  |            |                | P-value                                      | P-value             |
|                    | Controls                   | Cases      |                |  |                     |
| H                  | 77 (36.5)                  | 107 (50.7) | 0.002          | 0.001  | 2.379 [1.440–3.990] |
| HV0                | 26 (12.3)                  | 20 (9.5)   | 0.440          | 0.136  | 0.586 [0.290–1.182] |
| R0a'b <sup>a</sup> | 4 (1.9)                    | 1 (0.5)    | 0.375          | 0.325  | 0.328 [0.036–3.016] |
| Total <sup>b</sup> | 211                        | 211        |                |  |                     |

Data for stroke cases and controls not shown.

<sup>a</sup> Haplogroup R0a'b except HV.

<sup>b</sup> Total number of controls and cases (R0a'b, Non-R, JT and UK).

<sup>c</sup> Conditional logistic regression model was performed considering significant covariates for myocardial infarction (hypertension, hypercholesterolemia and pooled haplogroups).

### 3.3. Association between mtDNA haplogroups and CV risk factors

Classical risk factors for CVD stratified by mtDNA haplogroups are listed in Table 4. A high percentage of individuals without history of MI or stroke (those that define control group in previous analysis) present high hypertension (72.9%), overweight or obesity (76.7%) and abdominal perimeter in risk range (77.5%), but lower diabetes (17%), hypercholesterolemia (41%) and levels of triglycerides (11.5%) (Table 4).

The JT cluster was significantly more frequent in non-hypertensive individuals (11%) than hypertensive individuals (7.7%) (logistic regression:  $p = 0.016$ ; OR: 0.460, 95% CI [0.244–0.868]) (Table 4). When haplogroups J and T were considered separately, haplogroup J presents a high frequency in non-hypertensive individuals (14.1%) compared to hypertensive individuals (6.4%), appearing as a protective factor for developing hypertension (logistic regression:  $p = 0.019$ ; OR = 0.348, 95% CI [0.144–0.840]). No significant association between mtDNA haplogroups and the remaining CV risk factors (diabetes, hypercholesterolemia, BMI, abdominal perimeter and levels of triglycerides) was obtained.

**Table 4**  
MtDNA haplogroups frequencies (%) stratified by classical risk factors for CVD in control group.

| Haplogroup clusters | Hypertension <sup>a</sup>     | Diabetes <sup>b</sup> | Hypercholesterolemia <sup>c</sup> | Overweight or obesity <sup>d</sup> | Abdominal perimeter <sup>e</sup> | Triglycerides <sup>f</sup> |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|                     | – (%) / + (%)                 | – (%) / + (%)         | – (%) / + (%)                     | – (%) / + (%)                      | – (%) / + (%)                    | – (%) / + (%)              |
| R0a'b               | 49 (13.4)/139 (38.1)          | 157 (43)/31 (8.5)     | 93 (25.5)/95 (26)                 | 54 (14.8)/134 (36.7)               | 35 (9.6)/153 (41.9)              | 165 (45.2)/23 (6.3)        |
| Non-R <sup>1</sup>  | 10 (2.7)/25 (6.8)             | 29 (7.9)/6 (1.6)      | 24 (6.6)/11 (3)                   | 6 (1.6)/29 (7.9)                   | 13 (3.6)/22 (6)                  | 32 (8.8)/3 (0.8)           |
| JT                  | 28 (7.7)/40 (11) <sup>2</sup> | 53 (14.5)/15 (4.1)    | 42 (11.5)/26 (7.1)                | 12 (3.3)/56 (15.3)                 | 18 (4.9)/50 (13.7)               | 64 (17.5)/4 (1.1)          |
| UK                  | 12 (3.3)/62 (17)              | 64 (17.5)/10 (2.7)    | 42 (11.5)/32 (8.8)                | 13 (3.6)/61 (16.7)                 | 16 (4.4)/58 (15.9)               | 62 (17)/12 (3.3)           |
| Total               | 99 (27.1)/266 (72.9)          | 303 (83)/62 (17)      | 201 (59)/164 (41)                 | 85 (23.3)/280 (76.7)               | 82 (22.5)/283 (77.5)             | 323 (88.5)/42 (11.5)       |

(–) Number of individuals from a given haplogroups without hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, high abdominal perimeter and high levels of triglycerides.

(+) Number of individuals from a given haplogroups with hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, high abdominal perimeter and high levels of triglycerides.

Logistic regression model was performed considering significant covariates for a) Hypertension: age, origin, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, high abdominal perimeter and high levels of triglycerides; b) Diabetes: origin, hypertension and hypercholesterolemia; c) Hypercholesterolemia: sex, hypertension and diabetes; d) Overweight or Obesity: age, origin, cigarette consumption, hypertension and high abdominal perimeter; e) High abdominal perimeter: age, sex, origin, hypertension and overweight or obesity, and f) Triglycerides: hypertension.

<sup>1</sup> Non-R including (L\*, M\* and N\*).

<sup>2</sup> Significant association was found between hypertension and the JT cluster (Logistic regression:  $p = 0.016$ ; OR: 0.460, 95% CI [0.244–0.868]). When subdivided haplogroup J and T, significant association was remained between hypertension and haplogroup J (Logistic regression:  $p = 0.019$ ; OR: 0.348, 95% CI [0.144–0.840]).

## 4. Discussion

In the present study, we designed a case-control study to explore the relationship between mtDNA haplogroups and two of the most common CVDs -MI and stroke- risk in Castile and Leon (Spain) population. This work analyzed the mtDNA variation in two CVDs, in the same population and considering the same CV risk factors.

### 4.1. Association between mtDNA haplogroups and MI and stroke

The haplogroup distribution in MI and stroke cases was compared to controls and significant differences were found for MI, reporting haplogroup H as a potential genetic risk factor. MtDNA variations affect differently the assembly and stability of the ETC and, therefore, may cause different energetic efficiency between haplogroups. In agreement with our findings, there are several evidences that consider mtDNA haplogroups as a genetic factor that predispose to, or protect against certain CVDs (Wallace and Chalkia, 2013).

The results obtained concerning haplogroup H were consistent with other CVDs-associated studies performed for other Spanish or European populations (Fernandez-Caggiano et al., 2012, 2013; Hagen et al., 2013; Hudson et al., 2014; Palacin et al., 2011). Haplogroup H encompasses over 40% of the total mtDNA variation in most of Europe (Wallace, 2013a) and it is defined by the variants m.14766T > C (MT-CYB), m.7028T > C (MT-COI) and m.2706G > A (MT-RNR2). Based on the structural analysis, the non-synonymous variant 14,766 results in the amino acid substitution Thr7Ile. This change is involved on electron flow and proton pumping, and could leads to an increase on the efficiency of the complex III Q cycle (Beckstead et al., 2009). Accordingly, several studies reported important differences in mitochondrial functions between haplogroup H and the rest of European and African haplogroups (Gomez-Duran et al., 2010; Kenney et al., 2014a,b; Malik et al., 2014). Using cybrid models (cytoplasmic hybrid), it was showed that H cybrids appeared to produce higher levels of ROS compared to J, L and UK cybrids, resulting from the higher oxygen consumption ( $VO_{2max}$ ) of H cybrids (Gomez-Duran et al., 2010; Kenney et al., 2014a,b; Malik et al., 2014). Therefore, individuals belonging to haplogroup H may undergo more oxidative damage in their mitochondria (Marcuello et al., 2009; Martinez-Redondo et al., 2010).

Although cluster R0a'b does not present significant differences between stroke cases and controls, there was a tendency for the increase in the percentage of H in stroke cases (51.3%) when compared to controls (42.9%), indicating that haplogroup H could also act as a risk factor for stroke. In fact, in recent studies, mtDNA haplogroup H1, U

and K were associated with onset of stroke in European population (Chinnery et al., 2010; Finnilä et al., 2001; Martikainen and Majamaa, 2010; Rosa et al., 2008).

#### 4.2. MtDNA haplogroups and cardiovascular risk factors

Our findings showed a beneficial role of haplogroup J against hypertension. In accordance, previous studies have identified that haplogroups T and J are associated with blood pressure in European populations (Nardelli et al., 2013; Rea et al., 2013) and the haplogroups M and D in Asian populations (Zhu et al., 2009). Hypertension is an important contributor to atherosclerotic-related diseases (stroke and MI) and its pathogenesis is associated to endothelial dysfunction and increased oxidative stress (Ivanovic and Tadic, 2015). The relationship between enhanced ROS and hypertension is well established in many studies involving diet or endocrine-induced and surgically-induced hypertensive animals (see e.g. Lee and Griendling, 2008). In fact, if mitochondrial dysfunctions caused an inefficient metabolism in skeletal and vascular smooth muscles, these would lead to the elevation of systolic blood pressure and, therefore, would be involved in the development of hypertension (Bernal-Mizrachi et al., 2005). In this sense and in accordance with others (Rea et al., 2013), carriers of mtDNA haplogroup J may have a lower pressure profile which would benefit against hypertension.

Haplogroup J is relatively evenly distributed across all Europe, presenting the highest frequencies in the Northern regions (Ruiz-Pesini et al., 2004). This haplogroup is defined by 9 variants, 3 of them are non-synonymous (m. 15452C > A, m. 13708G > A and m. 10398A > G), leading to amino acid changes in MT-CYB: Leu236Ile; MT-ND5: Ala458Thr and MT-ND3: Thr114Ala genes, respectively (Pierron et al., 2011). These genes are located in subunits of the Complex I and III of the ETC, which are the most important source of the intracellular ROS production (Chen and Zweier, 2014; Ott et al., 2007). Consequently, a changes in these genes may mediate lower RNA expression of these complexes, promoting heat production, which is important to adaptation to colder climates by decoupling OXPHOS and lowering ATP and ROS formation (Ruiz-Pesini et al., 2004; Wallace, 2013b). The inefficiency of the OXPHOS mitochondrial energy production found in haplogroup J, could confer an important role in protection against oxidative damage, and therefore, against hypertension (Rea et al., 2013).

#### 5. Conclusions

In conclusion, although none of the mtDNA haplogroups significantly increased the risk of stroke, a comparison of the data obtained between the MI and stroke groups showed evidence suggestive that haplogroup H acts as a genetic factor of susceptibility for both diseases. Otherwise, our data also suggest a beneficial role of mtDNA haplogroup J against hypertension. These results support the idea that differences in energy efficiency between haplogroups can help to explain the different susceptibilities of some individuals and/or populations toward multifactorial disorders as MI and stroke. In these sense, mtDNA haplogroup variation can provide some guidance for the prediction of genetic risk of these diseases in different human populations.

#### Acknowledgements

This work was supported by MINECO (project: CGL2014-53781-r) and by Generalitat de Catalunya (Ref. 2009 SGR 566).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.004>.

#### References

- Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., Howell, N., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23, 147.
- Bang, O.Y., Lee, P.H., Yoon, S.R., Lee, M.A., Joo, I.S., Huh, K., 2005. Inflammatory markers, rather than conventional risk factors, are different between carotid and MCA atherosclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 1128–1134.
- Beckstead, W.A., Ebbert, M.T.W., Rowe, M.J., McClellan, D.A., 2009. Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome c is consistent with a role of Cytb17T affecting longevity during caloric restriction. *PLoS One* 4, E5836.
- Bernal-Mizrachi, C., Gates, A.C., Weng, S., Imamura, T., Knutsen, R.H., DeSantis, P., 2005. Vascular respiratory uncoupling increases blood pressure and atherosclerosis. *Nature* 435, 502–506.
- Cai, B., Zhang, Z., Liu, K., Fan, W., Zhang, Y., Xie, X., et al., 2015. Mitochondrial DNA haplogroups and short-term neurological outcomes of ischemic stroke. *Sci. Rep.* 5, 9864.
- Castro, M.G., Huerta, C., Reguero, J.R., Soto, M.I., Doménech, E., Alvarez, V., et al., 2006. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 112, 202–206.
- Chang, J.C., Kou, S.J., Lin, W.T., Liu, C.S., 2010. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World J. Cardiol.* 2, 150–159.
- Chen, Y.R., Zweier, J.L., 2014. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ. Res.* 114, 524–537.
- Chen, A., Raule, N., Chomyn, A., Attardi, G., 2012. Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial Haplogroups associated with longevity. *PLoS One* 7, E46473.
- Chinnery, P.F., Elliott, H.R., Syed, A., Rothwell, P.M., Oxford Vascular Study, 2010. Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. *Lancet Neurol.* 9, 498–503.
- D'Armiento, F.P., Bianchi, A., de Nigris, F., Capuzzi, D.M., D'Armiento, M.R., Crimi, G., et al., 2001. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke* 32, 2472–2479.
- Ebner, S., Mangge, H., Langhof, H., Halle, M., Siegrist, M., Aigner, E., et al., 2015. Mitochondrial haplogroup T is associated with obesity in Austrian juveniles and adults. *PLoS One* 10, e0135622.
- Fernandez-Caggiano, M., Barallobre-Barreiro, J., Rego-Pérez, I., Crespo-Leiro, M.G., Paniagua, M.J., Grille, Z., et al., 2012. Mitochondrial haplogroups H and J: risk and protective factors for ischemic cardiomyopathy. *PLoS One* 7, E44128.
- Fernandez-Caggiano, M., Barallobre-Barreiro, J., Rego-Perez, I., Crespo-Leiro, M.G., Paniagua, M.J., Grille, Z., et al., 2013. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion* 13, 263–268.
- Finnilä, S., Hassinen, I.E., Majamaa, K., 2001. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke. Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region. *Mutat. Res.* 458, 31–39.
- Gomez-Duran, A., Pacheu-Grau, D., Lopez-Gallardo, E., Diez-Sanchez, C., Montoya, J., Lopez-Perez, M.J., et al., 2010. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3343–3353.
- Gonzalez, A.M., Maceira, B.M., Perez, E., Cabrera, V.M., Lopez, A.J., Larruga, J.M., 2012. Genetics, environment, and diabetes-related end-stage renal disease in the Canary Islands. *Genet. Test Mol. Biomarkers* 16, 859–864.
- Guo, Y., Jiang, X., Chen, S., Zhang, S., Zhao, H., Wu, Y., 2003. Aortic arch and intra-/extracranial cerebral arterial atherosclerosis in patients suffering acute ischemic strokes. *Chin. Med. J.* 116, 1840–1844.
- Hagen, C.M., Ait, F.H., Hedley, P.L., Jensen, M.K., Havndrup, O., Kanters, J.K., et al., 2013. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS One* 8, E71904.
- Handy, D.E., Loscalzo, J., 2012. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1323–1367.
- Heyer, E., Zietkiewicz, E., Rochowski, A., Yotova, V., Puymirat, J., Labuda, D., 2001. Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of control region mutations in deep-rooting pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1113–1126.
- Hudson, G., Gomez-Duran, A., Wilson, I.J., Chinnery, P.F., 2014. Recent mitochondrial DNA mutations increase the risk of developing common late-onset human diseases. *PLoS Genet.* 10, E1004369.
- Ivanovic, B., Tadic, M., 2015. Hypercholesterolemia and hypertension: two sides of the same coin. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 15, 403–414.
- Kalogeris, T., Bao, Y., Korhuis, R.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2, 702–714.
- Kenney, M.C., Chwa, M., Atilano, S.R., Falatoozadeh, P., Ramirez, C., Malik, D., et al., 2014a. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial–nuclear interactions. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3537–3551.
- Kenney, M.C., Chwa, M., Atilano, S.R., Falatoozadeh, P., Ramirez, C., Malik, D., et al., 2014b. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 208–219.
- Kloss-Brandstatter, A., Pacher, D., Schonherr, S., Weissensteiner, H., Binna, R., Specht, G., et al., 2001. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum. Mut.* 32, 25–32.

- Kofler, B., Mueller, E.E., Eder, W., Stanger, O., Maier, R., Weger, M., et al., 2009. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med. Genet.* 10, 35.
- Krzywanski, D.M., Moellering, D.R., Fetterman, J.L., Dunham-Snary, K.J., Sammy, M.J., Ballinger, S.W., 2011. The mitochondrial paradigm for cardiovascular disease susceptibility and cellular function: a complementary concept to Mendelian genetics. *Lab. Invest.* 91, 1122–1135.
- Lee, M.Y., Griendling, K.K., 2008. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1045–1059.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., Flohé, L., 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 42, 68–72.
- Malik, D., Hsu, T., Falatoonzadeh, P., Cáceres-del-Carpio, J., Tarek, M., Chwa, M., et al., 2014. Human retinal trans-mitochondrial cybrids with J or H mtDNA haplogroups respond differently to ultraviolet radiation: implications for retinal diseases. *PLoS One* 9, E99003.
- Marcuello, A., Martínez-Redondo, D., Dahmani, Y., Casajus, J.A., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., et al., 2009. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion* 9, 27–30.
- Martikainen, M.H., Majamaa, K., 2010. Epidemiology and characteristics of occipital brain infarcts in young adults in southwestern Finland. *J. Neurol.* 257, 259–263.
- Martínez-Redondo, D., Marcuello, A., Casajus, J.A., Ara, I., Dahmani, Y., Montoya, J., et al., 2010. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO<sub>2</sub>max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* 10, 102–107.
- Nardelli, C., Labruna, G., Liguori, R., Mazzaccara, C., Ferrigno, M., Capobianco, V., et al., 2013. Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed. Res. Int.* 2013, 631082.
- Nishigaki, Y., Yamada, Y., Fuku, N., Matsuo, H., Segawa, T., Watanabe, S., et al., 2007. Mitochondrial haplogroup A is a genetic risk factor for atherothrombotic cerebral infarction in Japanese females. *Mitochondrion* 7, 72–79.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913–922.
- Palacin, M., Alvarez, V., Martín, M., Díaz, M., Corao, A.I., Alonso, B., et al., 2011. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion* 11, 176–181.
- Peluso, I., Morabito, G., Urban, L., Ioannone, F., Serafini, M., 2012. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 12, 351–360.
- Pierron, D., Chang, I., Arachiche, A., Heiske, M., Thomas, O., Borlin, M., et al., 2011. Mutation rate switch inside Eurasian mitochondrial haplogroups: impact of selection and consequences for dating settlement in Europe. *PLoS One* 6, E21543.
- Poulton, J., Luan, J., Macaulay, V., Hennings, S., Mitchell, J., Wareham, N.J., 2002. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1581–1583.
- Rea, I.M., McNERlan, S.E., Archbold, G.P., Middleton, D., Curran, M.D., Young, I.S., et al., 2013. Mitochondrial J haplogroup is associated with lower blood pressure and anti-oxidant status: findings in octo/nonagenarians from the BELFAST Study. *Age (Dordr.)* 35, 1445–1456.
- Rosa, A., Fonseca, B., Krug, T., Manso, H., Gouveia, L., Albergaria, I., et al., 2008. Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients. *BMC Med. Genet.* 9, 57.
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V., Wallace, D.C., 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303, 223–226.
- Santos, C., Montiel, R., Angles, N., Lima, M., Francalacci, P., Malgosa, A., et al., 2004. Determination of human caucasian mitochondrial DNA haplogroups by means of a hierarchical approach. *Hum. Biol.* 76, 431–453.
- Santos, C., Montiel, R., Sierra, B., Bettencourt, C., Fernandez, E., Alvarez, L., et al., 2005. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol. Biol. Evol.* 22, 1490–1505.
- Van Oven, M., Kayser, M., 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mut.* 30, E386–E394.
- Vega Alonso, A.T., Lozano Alonso, J.E., Álamo Sanz, R., Lleras Muñoz, S., Escibano Hernández, A., De la Iglesia Rodríguez, P., 2007. Design of a population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon (Spain) through primary care teams. *Gac. Sanit.* 21, 84–87.
- Wallace, D.C., 2013a. A mitochondrial bioenergetics etiology of disease. *J. Clin. Invest.* 123, 1405–1412.
- Wallace, D.C., 2013b. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 368, 20120267.
- Wallace, D.C., Chalkia, D., 2013. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmic conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a021220.
- Wei, J.P., Li, K., Zhao, H., He, J.F., Wen, J., Zhou, C.Y., et al., 2007. The relationship between coronary atherosclerotic stenosis and cerebral atherosclerotic stenosis. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 35, 889–892.
- World Health Organization, 2015. **Cardiovascular disease. In: Fact Sheet N°317. Geneva, Last accessed at:** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
- Yang, D., Wang, Q., Shi, Y., Fan, Y., Zheng, H.X., Song, G., et al., 2014. Mitochondrial DNA haplogroup D4b is a protective factor for ischemic stroke in Chinese Han population. *Mol. Gen. Genomics.* 289, 1241–1246.
- Zhu, H.Y., Wang, S.W., Martin, L.J., Liu, L., Li, Y.H., Chen, R., et al., 2009. The role of mitochondrial genome in essential hypertension in a Chinese Han population. *Eur. J. Hum. Gen.* 17, 1501–1506.

**The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction**

Miriam Umbria<sup>1</sup>, Amanda Ramos<sup>1,2,3,4</sup>, Maria Pilar Aluja<sup>1,+,\*</sup> and Cristina Santos<sup>1,+,\*</sup>

<sup>1</sup> Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade dos Açores (UAç), Ponta Delgada, Portugal

<sup>3</sup> Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S), Universidade do Porto, Portugal

<sup>4</sup> Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>+</sup>These authors contributed equally to this work

**\*Correspondence to:**

Cristina Santos and Maria Pilar Aluja

Tel.: 34 93 5811503

Fax: 34 93 5811321

E-mail: cristina.santos@uab.cat

E-mail: mariapilar.aluja@uab.cat



## **Abstract**

Recent studies associated certain type of cardiovascular disease (CVD) with specific mitochondrial DNA (mtDNA) defects, mainly driven by the central role of mitochondria in cellular metabolism. Considering the importance of the control region (CR) on the regulation of the mtDNA gene expression, the aim of the present study was to investigate the role of the mtDNA CR mutations in two CVDs: stroke and myocardial infarction (MI). Both, fixed and heteroplasmy mutations of the mtDNA CR in two population samples of demographically-matched case and controls, were analysed using 154 stroke cases, 211 MI cases and their corresponding control individuals. Significant differences were found, reporting the m.16145G>A and m.16311T>C as a potential genetic risk factors for stroke (conditional logistic regression:  $p=0.038$  and  $p=0.018$ , respectively), whereas the m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C could act as possible beneficial genetic factors for MI (conditional logistic regression:  $p=0.001$ ,  $p=0.009$  and  $p=0.016$ , respectively). Furthermore, our findings also showed a high percentage of point heteroplasmy in MI controls (logistic regression:  $p=0.046$ ; OR= 0.209, 95% CI [0.045-0.972]). These results demonstrate the possible role of mtDNA mutations in the CR on the pathogenesis of stroke and MI, and show the importance of including this regulatory region in genetic association studies.

## **Introduction**

Cardiovascular disease (CVD) is one of the most widespread and common causes of death in the world. The onset and severity of these diseases are influenced by both genetic and environmental factors. Recent evidences associate mitochondrial dysfunction with several cardiovascular manifestations, mainly driven by the central role of

mitochondria in cellular metabolism, particularly in energetically demanding tissues such as the brain and heart<sup>1,2</sup>.

Human mitochondrial DNA (mtDNA) is 16.6-kb double-stranded circular DNA molecule that encodes for 13 electron transport chain (ETC) proteins, 2 ribosomal RNAs (rRNAs) and 22 transport RNAs (tRNAs). The control region (CR) encompasses the light and heavy strand promoters, the heavy strand origin of replication ( $O_H$ ), three conserved sequence blocks and the termination associated sequences (TAS)<sup>3</sup>. MtDNA is more susceptible than nuclear DNA to oxidative damage, probably due to the lack histone complex and an inefficient DNA repair mechanisms, which may serve as a protective barrier against external and internal noxious agents as reactive oxygen species (ROS)<sup>4</sup>. However, the hypothesis of direct damage by ROS is increasingly criticized and it is suggested that errors in mtDNA replication and repair may be the main cause of its high mutation rate (~10-fold greater than in nDNA)<sup>5</sup>.

Recent evidence have linked certain CVDs with specific mtDNA mutation including base substitution<sup>6-11</sup>, deletions<sup>12</sup>, duplications<sup>13</sup> and point or length heteroplasmy<sup>14-17</sup> both in coding<sup>6,9,10,12,14,15</sup> and noncoding region<sup>6-9,11,13,16,17</sup> of mtDNA. In particular, mtDNA mutations located in CR have a potential importance since they may influence on the regulation of the mtDNA gene expression. In fact, several studies detected association of a great range of mtDNA variants (with negative or beneficial effect, both fixed or in heteroplasmy) and different diseases<sup>6,9</sup>.

In general, these disparities could occur because mtDNA mutations in the CR may not be directly tied to any form of pathology, but could capable of influencing mitochondrial function through changes in the number of copies, inducing profound effects on the expression of mitochondrial-encoded gene transcripts and related enzymatic activities (complexes I, III, and IV)<sup>18,19</sup>.

The ability of mtDNA mutation to influence in the development of CVDs is directly related to its prevalence and the severity of its impact on mitochondrial function. In addition, several studies have demonstrated that due to the differences in the prevalence of the main etiological factors between intra- and extracranial arteries, the effect of the mtDNA mutations with stroke and MI could be different<sup>20-23</sup>. The main aim of the present study was to investigate the role of CR mtDNA mutations (fixed or in heteroplasmy) in two CVDs; stroke and MI.

## **Results**

### **Analysis of fixed and heteroplasmic mtDNA mutations with stroke**

A detailed matrix of all mtDNA positions analyzed in stroke cases and controls are reported in Supplementary Table S1 and the frequencies of fixed mutations found are showed in Table 1. The percentages of m.16145G>A and m.16311T>C were overrepresented in stroke cases (5.2% and 18.2%, respectively) than controls (1.9% and 9.7%, respectively). After correction for the effect of CV risk factors with significant differences between stroke cases and controls (hypercholesterolemia<sup>24</sup>), significant association were still observed in m.16145G>A (conditional logistic regression:  $p=0.038$ ; OR= 4.407, 95% CI [1.086-17.883]) and m.16311T>C (conditional logistic regression:  $p=0.018$ ; OR= 2.417, 95% CI [1.165-5.016]), emerging as a possible genetic risks factors for stroke (Table 1).

Stability analyses were performed to predict the impact of these mutations. Several measures as the number of hits in the mtDNA phylogeny, the probability of mutation, the frequency in the population database and the conservation index (CI) at nucleotide level, were calculated, and results are showed in Table 1. The results obtained revealed m.16145G>A and m.16311T>C as non-stable position since they present a

minimum of 37 hits in the phylogeny, a high probability of mutation, a high frequency of the variant in the population database (here denoted by minor allele frequency [MAF] >5%) detected on m.16311T>C or low-frequency (MAF 1-5%) in m.16145G>A and a maximum nucleotide CI of 58% (Table 1). To infer about the impact of m.16145G>A and m.16311T>C on the stability of secondary structures of the mtDNA, a prediction of different structures with the wild type (rCRS) and mutant variant was performed. It seems that m.16311T>C implies a conformational rearrangement, resulting in structure of Figure 1 as the new predicted minimum free energy solution (-0.40 kcal/mol), causing a stability reduction of the region. No structural or thermodynamic differences were found for the m.16145G>A.

The distribution of the heteroplasmic positions between stroke cases and controls are reported in Table 2. Eighty-eight stroke cases (57.1%) and eighty-six controls (55.8%) presented point and/or length heteroplasmy, and no significant differences were obtained between groups. The most prevalent variant detected was a length heteroplasmy located in the poly-C tract of the HVRII (between positions 303–315 of the mtDNA), which was present in a 52% of stroke cases and in 46.7% of controls. Point heteroplasmy were found in six stroke cases and six controls, involving nine different positions of the mtDNA: 146, 150, 152, 185, 204, 16092, 16093, 16129 and 16399.

The analysis of stability performed to predict the impact of these heteroplasmic positions is presented in Table 3. In general, these mutations have a minimum of 16 hits in the phylogeny, were located in hotspots positions, have a high frequency of the minor variant in the population database (min. height peaks 16.67%), and a low conservation index, indicated these heteroplasmy have typical characteristics of non-stable positions (Table 3).

## **Analysis of fixed and heteroplasmic mtDNA mutations with MI**

MtDNA positions studied for MI cases and controls are available in the matrix of Supplementary Table S1 and the frequencies of fixed mutations found are reported in Table 4. The m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C were more frequent in MI controls (12.3%, 49.3% and 3.3%, respectively) than cases (7.6%, 38.9% and 1.4%, respectively). When corrected for the effect of CV risk factors with significant differences between MI cases and control (hypertension and hypercholesterolemia<sup>24</sup>), significant association was observed in these three mutations (m.72T>C: conditional logistic regression:  $p=0.001$ ; OR= 0.041, 95% CI [0.006-0.290], m.73A>G: conditional logistic regression:  $p=0.009$ ; OR= 0.009, 95% CI [0.307-0.843] and m.16356T>C: conditional logistic regression:  $p=0.016$ ; OR= 0.091, 95% CI [0.013-0.639]), emerging as a possible protective genetic factors for MI (Table 3).

In order to predict the impact of these mutations, several measures were calculated to analyze the stability of each position, and results are showed in Table 4. The results obtained revealed that m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C as a non-stable positions since they present a minimum of 9 hits in the phylogeny, a high probability of mutation, a high frequency of the variant in the population database (MAF >5%) for m.73A>G and low-frequency (MAF 1-5%) for m.72T>C and m.16356T>C, and a maximum nucleotide CI of 79% (Table 4). Using the proposed previously method to predict the impact of these three mutations on the stability of secondary structure of the mtDNA, it seems that m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C led to a folded structure with the same minimum free energy as the wild-type structure (rCRS), which means that these mutations do not condition the stability of the region.

Classification of the heteroplasmic positions between MI cases and control is available in Table 2. One hundred twenty-five MI cases (59.2%) and one hundred and

twenty controls (56.8%) presented point and/or length heteroplasmy, being the length heteroplasmy located in the poly-C tract of the HVRII the most prevalent variant both MI cases (54.03%) and controls (48.34%). In this analysis, the point heteroplasmy was significantly more frequent in MI controls (n=11; 5.21%) than cases (n=2; 0.94%) (logistic regression: p=0.046; OR= 0.209, 95% CI [0.045-0.972]) even correcting for the effect of MI risk factors (hypertension and hypercholesterolemia<sup>24</sup>). These heteroplasmic positions involving nine different positions of the mtDNA: 73, 146, 150, 152, 204, 16092, 16093, 16129 and 16399.

The stability analysis to identify the impact of these point heteroplasmy is presented in Table 3. All of them were considered non-stable positions. As previously stated, these positions presented a minimum of 16 hits in the phylogeny, were located in hotspots positions, have a high frequency of the minor variant in the population database (min. height peaks 13.80%) and low CI at nucleotide level (max. 64.4%). No different trends were observed between stability of these positions in MI cases and controls (Table 3).

### **Distribution of mtDNA mutations between haplogroups**

Haplogroup assignment of all individuals analysed in this article was previously performed by Umbria *et al.*<sup>24</sup>. In Figure 2 are shown the distribution of m.16145G>A and m.16311T>C for stroke and m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C for MI between the mtDNA haplogroups. Unlike the rest of mutations, it appears that m.72T>C and m.16356T>C have a high association with the haplogroups HV0 and U, respectively (Fig. 2). These associations ceases to exist when compared the number of individuals identify in this article that belonging the haplogrup HV0 and have m.72T>C with the total of HV0 cases and controls samples detected by Umbria *et al.*<sup>24</sup>, shown that there are individuals belonging this haplogroup that do not have the m.72T>C. In the same line, note that the

total number of individuals identify in this study that have m.16356T>C belongs to haplogroup U. Even though m.16356T>C define different subgroups of U (U2e3, U3a1c, U4 and U5b1), this result was obtained because in this analysis the haplogroup U included the rest of subhaplogroups of U detected. Otherwise, the frequencies obtained would be more divided. Hence, the analysis of the distribution of these mutations clearly demonstrated that they weren't associated with any particular mtDNA haplogroup. Therefore, these mutations could act as independent risk factors for haplogroups.

## **Discussion**

In western countries, where the burden of CVD is growing due to effect of CV risk factors, several studies have already shown the strongly relation of the genetic factors. However, little is known about the role of mtDNA CR mutations in development of stroke and MI<sup>7-9,11,13,14,15,17</sup>.

An association of several mtDNA alterations (fixed and in heteroplasmy) in the two diseases have been detected in the present study. As regards fixed mtDNA mutations, the set of mutations in stroke and MI cases was compared to controls and significant differences were found in the two diseases, reporting the m.16145G>A and m.16311T>C as a potential genetic risk factors for stroke, and m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C as a possible beneficial genetic factors for MI. It has been previously described that the CR mutations can be associated across multiple disease, and that the same variant could had opposite effect (increase or decrease the risk) for two different disease<sup>9</sup>. This finding would support our original hypothesis about the consequences that can affect the mtDNA mutations in the CR depending on the disease.

The CR variants do not act directly on the ETC affecting mitochondria bioenergetics or ROS generation; they may have an important effect on the genotype by

altering mtDNA gene expression<sup>18,19</sup>. The CR contains the main regulatory sequences for replication initiation and transcription<sup>3</sup>. Unfortunately, the potential role of the remaining areas of the CR is still unknown even considering the exceptional economy of organization of the mtDNA.

Transitions 16145G>A and 16311T>C seem to have a pathogenic role in stroke. The analysis of distribution of these mutations clearly showed that they are located in many different haplogroups and consequently these mutations act as haplogroup-independent risk factors. The m.16145G>A is located between MT-TAS sequence (nt. 16157-16172) and MT-TAS2 sequence (nt. 16081-16138). According to the classic strand-asynchronous mechanism, recent studies demonstrated that the 5' end of the D-loop is capable of forming secondary structures<sup>26</sup>, which act as a recognition site to molecules involved in the premature arrest of H strand elongation<sup>27</sup>. The biological importance of this region was confirmed by Brandon *et al.*<sup>28</sup> who also observed multiple tumor specific mutations in the pre-TAS region. These observations suggest that mutations arising near to this conserved motive might be responsible of the alterations in mtDNA replication and transcription. In the same line, m.16311T>C has been found to be significantly associated with certain types of cancer<sup>29-31</sup>. This mutation was previously described by Chen *et al.*<sup>29</sup> in patients with prostate cancer and also has been reported in colorectal cancer<sup>30</sup> and more recently in acute myeloid leukemia<sup>31</sup>. This mutation is located between the control elements Mt5 sequence (nt. 16194-16208) and the Mt31 sequence (nt. 16499-16506). In this case, our results showed that m.16311T>C may implies a reduction in the stability of secondary structure of this region, which would affect in the binding grade to mtDNA transcription factors, ultimately affecting on the intensity of transcription regulation<sup>32</sup>. In both cases, these findings strongly suggest that mtDNA CR dysfunction may cause a decrease on the mtDNA copy number, which could



affect the efficiency of ETC, lowering the ATP:ADP ratio and increasing ROS production<sup>18,19</sup>, contributing in stroke development.

Concerning MI, our results showed that m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C act as a beneficial factor for MI. Although a high percentage of individuals with these mutations belonged to the haplogroups HV0, H or U, which have been shown to may have higher oxidative damage<sup>9,24,33,34</sup>, the distribution of positions 72, 73 and 16356 in our samples was independent of these haplogroups. Since the role of the mitochondrial genome in CVD susceptibility remains uncertain, it is difficult to explain how these mutations can decrease or counteract the progression of MI. Although m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C have been previously related to certain types of cancer<sup>35</sup>, many studies consider that they are recurrent variants common in humans<sup>36</sup>.

Even though the most deleterious mutations are removed by natural selection, a wide range of milder bioenergetic alterations are introduced in certain populations<sup>37</sup>. Some of these variants as m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C could be advantageous and seen as way to facilitate survival in specific environments. In contrary, other mutations as m.16145G>A and m.16311T>C escape of intraovarian selection and could cause significant mitochondrial defects and stroke develop. Much of the progress in linkage disequilibrium mapping of complex diseases has been made using the major assumptions of the CDCV hypothesis, that is, that common alleles cause common diseases. After found positive associations with common alleles (e.g., those found by Umbria *et al.*<sup>24</sup>), it was necessary replicated the results and then look for rarer variants, with potentially greater penetrance. However, all the mutations analysed in the present study had a minor allele variant >5% (common variant) or between 1-5% (low-frequency). Although the common variants often are associated with OR of only between 1.2 and 1.5<sup>38</sup>, our results showed high effect size for pathogenic variants, with OR values

of 2.4-4.4, and similarly, high protective effect size of variants found at higher frequency in controls (ORs <0.5) relative to cases.

Our findings also showed a significant increase of point heteroplasmy in MI controls in comparison to cases. This result is contrary to expectations, because the presence of heteroplasmy has been commonly associated with aging and degenerative disease, due to a decline in mitochondrial function in both these processes<sup>39</sup>. Our registered heteroplasmic positions (16399, 16129, 16093, 16092, 73, 146, 150, 152, and 204) were located in hotspots positions of the hypervariable segments. Recent evidences demonstrate that an important fraction of mutations detected in heteroplasmy are germinal or originated in very early stages of the development<sup>40</sup>. Moreover, it is probable that germinal heteroplasmy has a beneficial or risk effect, and our results revealed that the higher number of point heteroplasmy were overrepresented in MI controls individuals. This fact, is not surprise because some heteroplasmic positions detected, as m.73G>A, has been linked in this study as a possible beneficial genetic factors for MI and also it has been suggested that other heteroplasmic positions, such as 146T>C, 150C>T or 152T>C may increase longevity<sup>41</sup>.

Many studies have shown that heteroplasmic variants without apparent functional consequences are observed in apparently healthy individuals<sup>42,43,44,45</sup>. In the present study, the frequency of MI controls with point heteroplasmy in the CR (5.2%; 95% CI [0.045-0.972]) are slightly higher than those reported by Santos *et al.*<sup>44</sup> (3.81%; 95% CI [0.166–0.737]), but less than described by Ramos *et al.*<sup>45</sup> (7.9%; 95% CI [0.041–0.149]), demonstrating that heteroplasmy occur with appreciable frequency in the general population<sup>42</sup>. This idea is even more reinforced in front of the present data, since the high representation of point heteroplasmies detected were located in non-stable positions and

by the fact that no significant differences were found between the frequencies of point heteroplasmy in stroke cases and controls in the present study.

## **Conclusions**

In conclusion, our finding indicates the possible role of mtDNA CR mutations in the pathogenesis of stroke and MI. Our results may provide better understanding of the cellular mechanism by which mtDNA variants contribute to CVD, and endorse the importance of including this regulatory region of the mtDNA in genetic association studies.

## **Material and methods**

### **Subjects**

In this study, data from 730 subjects (154 individuals with stroke history, 211 individuals with MI history and their corresponding control individuals -matched for age, gender and geographic origin-, were used. Samples come from the Cardiovascular Disease Risk Study of Castile and Leon<sup>46</sup>, whose design and analysis have already been described by Umbria *et al.*<sup>24</sup>. For each individual, we also obtained information about history of hypertension ( $\geq 140/90$  mmHg), history of diabetes, history of hypercholesterolemia ( $>200$  mg/dl), cigarette consumption (smokers, former smokers and non-smokers), presence of overweight or obesity (body mass index  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), presence of high abdominal perimeter in risk range (risk:  $\geq 80$  cm for women and  $\geq 94$  cm for men) and presence of high levels of triglycerides ( $\geq 170$  mg/dl).

### **MtDNA sequence analysis and heteroplasmy authentication**

The mtDNA sequences used in the present study were previously obtained by Umbria *et al.*<sup>24</sup> although, they were strictly used to classify samples into mtDNA haplogroups. In the present study, sequences were reassessed and analysed at the nucleotide level to identify not only fixed mutations but also mutations in heteroplasmy. The alignment in relation to the to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS)<sup>47</sup> and the heteroplasmy detection were performed using the SeqScape 2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, USA) considering a value of 5% in the Mixed Base Identification option. Only sequences with satisfactory peak intensity and without background/noise were considered. In this context, some samples were amplified and sequenced several times (using the same methodology described in Umbria *et al.*<sup>24</sup>) to obtain accurate sequences to heteroplasmy detection. Moreover, additional analyses were performed in order to authenticate heteroplasmies.

The authentication of mtDNA heteroplasmy was performed following a similar strategy to that used by Santos *et al.*<sup>44,48</sup>.

1. PCR amplification and sequencing of the control region of the mtDNA.
2. To authenticate the results for samples presenting heteroplasmy in step 1, a second PCR amplification and sequencing were performed.
3. In addition, to exclude a possible contamination of the samples, an analysis of Short Tandem Repeat (STR) DNA profiling was carried out employing AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) following the manufacturer's protocol.

Thus, point heteroplasmic positions were accepted if they appeared in all the validation steps and no evidence of sample contamination was detected.

Levels of heteroplasmy were determined using the height of peaks in the electropherograms<sup>44</sup>. To calculate the average heteroplasmic levels, the results obtained for at least two sequence reads of each heteroplasmic position were used.

## **Data Analysis**

**Statistical analyses.** To compare differences in the CR profile between cases and controls in both stroke and MI, all fixed and heteroplasmic mtDNA mutations were compiled into a matrix considering the cases and controls analysed for each disease.

All fixed mtDNA mutations detected in cases and controls (present in a minimum of 10 individuals) were tested together by using a conditional logistic regression analysis (forward stepwise model), adjusting the association analysis for the potential confounding effect of CV risk factors detected previously in Umbria *et al.*<sup>24</sup>. Hypercholesterolemia was considered a CV risk factor with a potential confounding effect for stroke, while both hypertension and hypercholesterolemia were considered for MI samples. Therefore, Odds Ratios (ORs) and their 95% Confidence Intervals (CIs) were calculated adjusting for the effect of these risk factors in each disease. To compare the presence or absence of point and length heteroplasmy, a logistic regression analysis was used to correct for the effect of CV risk factors above mentioned<sup>24</sup>.

Finally, the mtDNA mutations were analysed to evaluate if they were in positions defined by haplogroups (previously examined in Umbria *et al.*<sup>24</sup>), or acts as an independent genetic factor.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS ver. 22.0 (SPSS Inc.). All differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Hits in the phylogeny, population database and Conservation Index (CI).** The stability of fixed mtDNA mutations and point heteroplasmic position were analysed as

previously detailed by Ramos *et al.*<sup>45</sup>. The number of hits in the phylogeny for each position was compiled from the updated mtDNA phylogeny – mit. Tree build 17<sup>49</sup> – and from Soares *et al.*<sup>25</sup>. From these data, it has been possible to calculate the probability of mutation as the ratio between the observed and the total number of hits. An mtDNA position was considered a hotspot if the mutation probability was ten times higher than the expected mean value. In order to calculate the frequency of each variant for a particular nucleotide position, a database of 3880 mtDNA complete sequences was used. Sequences were aligned using Clustal W and formatted for further frequency analyses using the SPSS software. The nucleotide conservation index (NCI) was estimated only across reference sequences of different primate species (for the list of species and accession numbers see Supplemental Table S2). Sequences were analyzed using the same method previously mentioned<sup>45</sup>.

**Structure prediction.** Secondary structures were performed to understand the structural impact of different variants found. The secondary structures for each position was generated from sequences (A-M) identified by Pereira *et al.*<sup>26</sup>. All sequences were submitted to the RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) using default parameters for DNA secondary structures calculations. The minimum free energy prediction and base pair probabilities were used to estimate the implication in the molecule.

### **Data availability**

The data that supports the findings of this study are within the paper and its Supplementary Material File.

## References

1. Taverne Y, Bogers A, Duncker D, Merkus D. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev*. **2013**, 862423 (2013).
2. Panth N, Paudel K, Parajuli K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of cardiovascular disease. *Adv Med*. **2016**, 9152732 (2016).
3. Bonawitz N, Clayton D, Shadel G. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell*. **24**, 813-825 (2006).
4. Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **5**, a012641 (2013).
5. Melvin R, Ballard J. Cellular and population level processes influence the rate, accumulation and observed frequency of inherited and somatic mtDNA mutations. *Mutagenesis*. **32**, 323-334 (2017).
6. Wang J, Lin F, Guo L, Xiong XJ, Fan X. Cardiovascular disease, mitochondria, and traditional chinese medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2015**, 143145 (2015).
7. Mueller E, Eder W, Ebner S, Schwaiger E, Santic D, Kreindl T, et al. The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations. *PLoS One*. **6**, e16455 (2011).
8. Liou C, Lin T, Huang F, Chen T, Lee C, Chuang Y, et al. Association of the mitochondrial DNA 16189 T to C variant with lacunar cerebral infarction: evidence from a hospital-based case-control study. *Ann N Y Acad Sci*. **1011**, 317-324 (2004).
9. Hudson G, Gomez A, Wilson I and Chinnery P. Recent mitochondrial DNA mutations increase the risk of developing common late-onset human diseases. *PLoS Genet*. **10**, e1004369 (2014).

10. Sazonova M, Sinyov V, Barinova V, Ryzhkova A, Bobryshev Y, Orekhov A, et al. Association of mitochondrial mutations with the age of patients having atherosclerotic lesions. *Exp Mol Pathol.* **99**, 717-719 (2015).
11. Gawel B, Glogowska J, Mazurek U. The G16319A substitution frequency in a hemorrhagic stroke. *Ann Indian Acad Neurol.* **11**, 154-158 (2008).
12. Levitsky S, Laurikka J, Stewart R, Campos C, Lahey S, McCully J. Mitochondrial DNA deletions in coronary artery bypass grafting patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* **24**, 777-784 (2003).
13. Cardena M, Mansur A, Pereira C, Fridman C. A new duplication in the mitochondrially encoded tRNA proline gene in a patient with dilated cardiomyopathy. *Mitochondrial DNA.* **24**, 46-49 (2013).
14. Mitrofanov K, Zhelankin A, Shiganova G, Sazonova M, Bobryshev Y, Postnov A, et al. Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmic mutations A1555G, C3256T, T3336C, C5178A, G12315A, G13513A, G14459A, G14846A and G15059A in CHD patients with the history of myocardial infarction. *Exp Mol Pathol.* **100**, 87-91 (2016).
15. Sobenin I, Sazonova M, Postnov A, Salonen J, Bobryshev Y, Orekhov A. Association of mitochondrial genetic variation with carotid atherosclerosis. *PLoS One.* **8**, e68070 (2013).
16. Golubenko M, Nazarenko M, Frolov A, Sleptsov A, Markov A, Glushkova M, et al. Analysis of heteroplasmy in the major noncoding region of mitochondrial DNA in the blood and atherosclerotic plaques of carotid arteries. *Genetika.* **52**, 497-502 (2016).
17. Sazonova M, Shkurat T, Demakova N, Zhelankin A, Barinova V, Sobenin I, et al. Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next?. *Curr Pharm Des.* **22**, 390-396 (2016).



18. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ J*. **72**, 31-37 (2008).
19. Huang J, Tan L, Shen R, Zhang L, Zuo H, Wang D. Decreased peripheral mitochondrial DNA copy number is associated with the risk of heart failure and long-term outcomes. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e3323 (2016).
20. Bang O, Lee P, Yoon S, Lee M, Joo I, Huh K. Inflammatory markers, rather than conventional risk factors, are different between carotid and MCA atherosclerosis. *J Neurosurg Psychiatry*. **76**, 1128-1134 (2005).
21. D'Armiento F, Bianchi A, de Nigris F, Capuzzi D, D'Armiento M, Crimi G, et al. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke*. **32**, 2472-2479 (2001).
22. Guo Y, Jiang X, Chen S, Zhang S, Zhao H, Wu Y. Aortic arch and intra-/extracranial cerebral arterial atherosclerosis in patients suffering acute ischemic strokes. *Chin Med J*. **116**, 1840-1844 (2003).
23. Wei J, Li K, Zhao H, He J, Wen J, Zhou C, et al. The relationship between coronary atherosclerotic stenosis and cerebral atherosclerotic stenosis. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. **35**, 889-892 (2007).
24. Umbria M, Ramos A, Caner J, Vega T, Lozano JE, Santos C, et al. Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: A case-control study in Castile and Leon (Spain) population. *Mitochondrion*. pii: S1567-7249(17)30024-7 (2017).
25. Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Röhl A, et al. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am J Hum Genet*. **84**, 740-759 (2009).

26. Pereira F, Soares P, Carneiro J, Pereira L, Richards M, Samuels D, et al. Evidence for variable selective pressures at a large secondary structure of the human mitochondrial DNA control region. *Mol Biol Evol.* **25**, 2759-2770 (2008).
27. Nicholls T, Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol.* **56**, 175-181 (2014).
28. Brandon M, Baldi P, Wallace D. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene.* **25**, 4647-4662 (2006).
29. Chen J, Gokden N, Greene G, Mukunyadzi P, Kadlubar F. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res.* **62**, 6470-6474 (2002).
30. Akouchekian M, Houshmand M, Hemati S, Ansaripour M, Shafa M. High rate of mutation in mitochondrial DNA displacement loop region in human colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* **52**, 526-530 (2009).
31. Silkjaer T, Norgaard J, Aggerholm A, Ebbesen L, Kjeldsen E, Hokland P, et al. Characterization and prognostic significance of mitochondrial DNA variations in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* **90**, 385-396 (2013).
32. Murakami H, Ota A, Simojo H, Okada M, Ajisaka R, Kuno S. Polymorphisms in control region of mtDNA relates to individual differences in endurance capacity or trainability. *Jpn J Physiol.* **52**, 247-256 (2002).
33. Fernández M, Barallobre J, Rego I, Crespo M, Paniagua MJ, Grillé Z, Blanco F, et al. Mitochondrial haplogroups H and J: risk and protective factors for ischemic cardiomyopathy. *PLoS One.* **7**, e44128 (2012).
34. Hagen C, Aidt F, Hedley P, Jensen M, Havndrup O, Kanters J, et al. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS One.* **8**, e71904 (2013).

35. Kirches E, Krause G, Warich-Kirches M, Weis S, Schneider T, Meyer B, et al. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. *Int J Cancer*. **93**, 534-538 (2001).
36. Samuels D, Li C, Li B, Song Z, Torstenson E, Boyd H, et al. Recurrent tissue-specific mtDNA mutations are common in humans. *PLoS Genet*. **9**, e1003929 (2013).
37. Fan W, Waymire K, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun P, et al. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*. **319**, 958-962 (2008).
38. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet*. **40**, 695-701 (2008).
39. Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, Gu Z. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci USA*. **111**, 10654-10659 (2014).
40. Ramos A, Aluja MP, Lima M, Santos C. Somatic vs Germinal Mutations in Mitochondrial DNA: Is There Any Relation with Human Health and Aging? in *Anthropology: Current and Future Developments: Genomics in Biological Anthropology: New Challenges, New Opportunities* (eds. Ramos A, Lima M, Santos C) 50-64 (Bentham Science Publishers, 2016).
41. Rose G, Passarino G, Scornaienchi V, Romeo G, Dato S, Bellizzi D, et al. The mitochondrial DNA control region shows genetically correlated levels of heteroplasmy in leukocytes of centenarians and their offspring. *BMC Genomics*. **8**, 293 (2007).
42. Irwin J, Saunier J, Niederstatter H, Strouss K, Sturk K, Diegoli T, et al. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol*. **68**, 516-527 (2009).

43. He Y, Wu J, Dressman D, Iacobuzio C, Markowitz S, Velculescu V, et al. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature*. **464**, 610–614 (2010).
44. Santos C, Montiel R, Sierra B, Bettencourt C, Fernandez E, Alvarez L, et al. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol Biol Evol*. **22**, 1490-1505 (2005).
45. Ramos A, Santos C, Mateiu L, Gonzalez M, Alvarez L, Azevedo L, et al. Frequency and pattern of heteroplasmy in the complete human mitochondrial genome. *PLoS One*. **8**, e74636 (2013).
46. Vega T, Lozano JE, Alamo R, Lleras S, Escribano A, De la Iglesia Rodríguez P. Design of a population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon (Spain) through primary care teams. *Gac Sanit*. **21**, 84-87 (2007).
47. Andrews R, Kubacka I, Chinnery P, Lightowlers R, Turnbull D, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. **23**, 147 (1999).
48. Santos C, Sierra B, Alvarez L, Ramos A, Fernández E, Nogués R, et al. Frequency and pattern of heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol*. **67**, 191-200 (2008).
49. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. **30**, 386-394 (2009).

### **Acknowledgements**

This work was supported by MINECO (project: CGL2014-53781-r) and by Generalitat de Catalunya (Ref. 2017 SGR 1630).

Postdoctoral fellowship SFRH/BPD/105660/2015 (AR) was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

### **Author Contributions**

MPA and CS contributed to the study design and supervised the work. MU performed experiments and gathered the data. MU, AR, MPA and CS analyzed the data and interpreted the results. MU wrote the main manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

### **Competing Interests**

The authors declare no competing interests.

### **Supplementary information**

**Supplementary Table S1.** Mutation report of mtDNA control region of 154 individuals with a history of stroke and 154 paired controls (Stroke case-control) and 211 individuals with a history of MI and 211 paired controls (MI case-control).

**Supplementary Table S2.** List of accession number and primates used for the conservation index estimations at nucleotide level for D-loop.

### **Figures legends**

**Figure 1.** Wild type vs. mutant structure and energy information. For m.16311T>C, relevant secondary structure and energy information is listed along with a graphical drawing for both the mutant and the wild type.

**Figure 2.** Distribution of fixed mutations between the mtDNA haplogroups.

## Tables

|   | Position 16145G>A                | Position 16311T>C                        |
|---|----------------------------------|--|
| Controls: n=154 (%) / Cases: n=154 (%)      | 3 (1.9) / 8 (5.2)                | 15 (9.7) / 28 (18.2)                     |
| Logistic Regression <sup>a</sup>            |                                  |  |
| p-value                                     | 0.038                            | 0.018                                    |
| OR [95% CI]                                 | 4.407 [1.086-17.883]             | 2.417 [1.165-5.016]                      |
| Stability analysis                          |                                  |  |
| CRS   | G                                | T  |
| Distribution in population database         | G:97.2; A:2.8; GAP:0.02          | T:76.9; C:23.0; Y:0.02; GAP:0.02         |
| No. Hits phylogeny (PhyloTree.org)          | 37                               | 137                                      |
| No. Hits Soares <i>et al.</i> <sup>25</sup> | 22                               | 120                                      |
| Probability of mutation                     | 0,00205935                       | 0,01123280                               |
| Nucleotide Conservation Index (%)           | A:56.3; G:20.8; T:14.6;<br>C:8.3 | T:58.3; C:33.3; G:4.2; A:2.1;<br>GAP:2.1 |

**Table 1.** Complete results of stroke fixed mtDNA mutation analysed. <sup>a</sup> Conditional regression model was performed considering significant covariates for stroke (hypercholesterolemia and mtDNA mutations).

|              | Controls   |            |                      |                      | Patients with stroke |             |                      |                      |
|--------------|------------|------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|
|              | n=154 (%)  | n=154 (%)  | p-value <sup>a</sup> | OR [95% CI]          | n=211 (%)            | n=211 (%)   | p-value <sup>a</sup> | OR [95% CI]          |
| Homoplasmy   | 66 (42.86) | 68 (44.16) | 0.896                | 0.971 [0.621-1.517]  | 91 (43.13)           | 86 (40.76)  | 0.851                | 1.042 [0.677-1.606]. |
| Heteroplasmy | 88 (57.14) | 86 (55.84) | 0.896                | 1.030 [0.659-1.610]  | 120 (56.87)          | 125 (59.24) | 0.851                | 0.959 [0.623-1.478]  |
| 1PH          | 1 (0.65)   | 1 (0.65)   | 0.590                | 2.167 [0.130-36.121] | 1 (0.47)             | 2 (0.95)    | 0.428                | 2.693 [0.232-31.217] |
| 1LH          | 71 (46.10) | 70 (45.45) | 0.941                | 0.983 [0.627-1.542]  | 104 (49.29)          | 104 (49.29) | 0.558                | 0.878 [0.569-1.356]  |
| >1PH         | 0 (0.0)    | 0 (0.0)    | -                    | -                    | 0 (0.0)              | 0 (0.0)     | -                    | -                    |
| >1LH         | 15 (9.74)  | 15 (9.74)  | 0.832                | 1.087 [0.502-2.356]  | 15 (7.11)            | 19 (9.00)   | 0.659                | 1.193 [0.545-2.614]  |
| PH+LH        | 5 (3.25)   | 5 (3.25)   | 0.907                | 0.926 [0.257-3.337]  | 10 (4.74)            | 0 (0.0)     | 0.980                | -                    |
| Total PH     | 6 (3.90)   | 6 (3.90)   | 0.914                | 1.067 [0.329-3.462]  | 11 (5.21)            | 2 (0.95)    | 0.022                | 0,046 [0.045-0.972]  |
| Total LH     | 86 (55.84) | 85 (55.19) | 0.960                | 1.012 [0.645-1.588]  | 119 (56.40)          | 123 (58.29) | 0.735                | 0.928 [0.604-1.427]  |

**Table 2.** Classification of the analyzed stroke and myocardial infarction (MI) individuals depending on the type(s) of heteroplasmy they presented. <sup>a</sup> Logistic regression model was performed considering significant covariates for stroke (hypercholesterolemia and mtDNA heteroplasmy) and MI (hypertension, hypercholesterolemia and mtDNA heteroplasmy).

| Position | Sample name  | Het | CRS | Mean proportion height peaks | Distribution in population database             | No. Hits phylogeny (PhyloTree.org) | No. Hits Soares <i>et al.</i> <sup>25</sup> | Probability of mutation | Nucleotide Conservation Index (%)      |
|----------|--------------|-----|-----|------------------------------|---|------------------------------------|---|-------------------------|--|
| 146      | Ca10_Stroke  | T/c | T   | 83.33T 16.67C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109   | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 150      | Ca111_Stroke | T/c | C   | 68T 32C                      | C:88.2; T:11.7; G:0.1; GAP:0.1                  | 74                                 | 63  | 0.00589722              | C:43.8; G:27.1; A:18.8; T:10.4         |
| 152      | Ca69_Stroke  | C/t | T   | 52.94C 47.06T                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157   | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 185      | Ca115_Stroke | G/a | G   | 66.67G 33.33A                | G:94.6; A:3.9; T:1.1; C:0.3; GAP:0.1; R:0.02    | 24                                 | 24  | 0.00224656              | C:52.1; A:29.2; T:12.5; G:6.3          |
| 204      | Ca79_Stroke  | T/c | T   | 54.55T 45.45C                | T:93.4; C:6.5; A:0.1; GAP:0.1; Y:0.02           | 44                                 | 43  | 0.00402509              | G:52.1; T:22.9; C:16.7; A:8.3          |
| 16129    | Ca13_Stroke  | G/a | A   | 73.33G 26.67A                | G:84.6; A:14.9; C:0.4; R:0.02; GAP:0.02         | 93                                 | 86  | 0.00805017              | A:87.5; G:8.3; T:2.1; GAP:2.1          |
| 146      | Co07_Stroke  | T/c | T   | 69.23T 30.77C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109   | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 146      | Co68_Stroke  | C/t | T   | 80C 20T                      | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109   | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 146      | Co35_Stroke  | T/c | T   | 66.67T 33.33C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.2                  | 121                                | 109   | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.2                 |
| 152      | Co16_Stroke  | C/t | T   | 58.82T 41.18C                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157   | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 16092    | Co40_Stroke  | C/t | T   | 82.35C 17.65C                | T:98.7; C:1.2; Y:0.1; GAP:0.02                  | 16                                 | 17  | 0.00159131              | A:41.7; T:33.3; C:20.8; GAP:4.2        |
| 16399    | Co62_Stroke  | G/a | A   | 83.33G 16.67A                | A:97.4; G:2.5; T:0.02; C:0.02; GAP:0.02; R:0.02 | 21                                 | 26  | 0.00243377              | T:39.6; A:31.3; C:16.7; G:6.3; GAP:6.3 |
| 146      | Ca120_MI     | T/c | T   | 63.64T 36.36C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109   | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 152      | Ca100_M      | C/t | T   | 52.94C 47.06T                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157   | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 73       | Co6_MI       | G/a | A   | 76G 24A                      | G:80.8; A:19.1; GAP:0.1; C:0.02                 | 12                                 | 11  | 0.00102967              | A:41.7; C:35.4; G:22.9                 |
| 146      | Co56_MI      | T/c | T   | 66.67T 33.33C                | T:81.4; C:18.4; A:0.1; GAP:0.1                  | 121                                | 109   | 0.01020313              | C:41.7; T:31.3; A:27.1                 |
| 150      | Co17_MI      | T/c | C   | 86.20T 13.80C                | C:88.2; T:11.7; G:0.1; GAP:0.1                  | 74                                 | 63  | 0.00589722              | C:43.8; G:27.1; A:18.8; T:10.4         |
| 150      | Co123_MI     | T/c | C   | 82.76T 17.24C                | C:88.2; T:11.7; G:0.1; GAP:0.1                  | 74                                 | 63  | 0.00589722              | C:43.8; G:27.1; A:18.8; T:10.4         |
| 152      | Co27_MI      | T/c | T   | 58.82T 41.18C                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157   | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 152      | Co184_MI     | T/c | T   | 52.38T 47.62C                | T:70.4; C:29.5; GAP:0.1; G:0.02                 | 196                                | 157   | 0.01469625              | C:47.9; T:35.4; A:16.7                 |
| 204      | Co156_MI     | T/c | T   | 83.33T 16.67C                | T:93.4; C:6.5; A:0.1; GAP:0.1; Y:0.02           | 44                                 | 43  | 0.00402509              | G:52.1; T:22.9; C:16.7; A:8.3          |
| 16092    | Co62_MI      | C/t | T   | 82.35C 17.65C                | T:98.7; C:1.2; Y:0.1; GAP:0.02                  | 16                                 | 17  | 0.00159131              | A:41.7; T:33.3; C:20.8; GAP:4.2        |
| 16093    | Co106_MI     | C/t | T   | 72.22C 27.78T                | T:93.5; C:6.4; Y:0.1; GAP:0.02                  | 55                                 | 79  | 0.00739493              | T:64.6; A:20.8; G:6.3; GAP:4.2; C:4.2  |
| 16129    | Co129_MI     | G/a | A   | 81.81G 18.19A                | G:84.6; A:14.9; C:0.4; R:0.02; GAP:0.02         | 93                                 | 86  | 0.00805017              | A:87.5; G:8.3; T:2.1; GAP:2.1          |
| 16399    | Co94_MI      | G/a | A   | 83.33G 16.67A                | A:97.4; G:2.5; T:0.02; C:0.02; GAP:0.02; R:0.02 | 21                                 | 26  | 0.00243377              | T:39.6; A:31.3; C:16.7; G:6.3; GAP:6.3 |

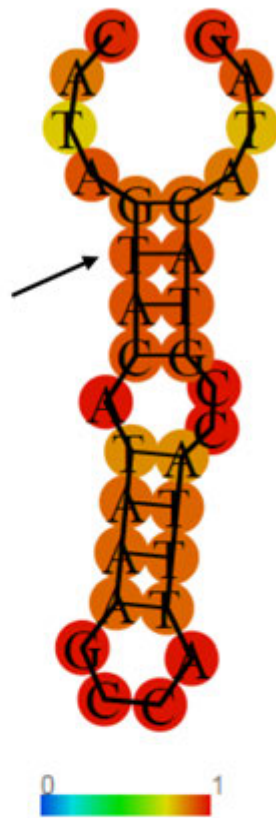
**Table 3.** Complete results of stroke and myocardial infarction heteroplasmy position analyzed (position, sample name, heteroplasmy type, heteroplasmy origin, distribution in population database, number of hits in mtDNA phylogeny [PhyloTree.org] and by Soares *et al.*<sup>25</sup>, probability of mutation and nucleotide Conservation Index)

|   | <b>Position 72T&gt;C</b>                | <b>Position 73A&gt;G</b>           | <b>Position 16356T&gt;C</b>       |
|---|---|------------------------------------|-----------------------------------|
| Controls: n=211 (%) / Cases: n=211 (%)      | 26 (12.3) / 16 (7.6)                    | 104 (49.3) / 82 (38.9)             | 7 (3.32) / 3 (1.42)               |
| Logistic Regression <sup>a</sup>            |   |                                    |                                   |
| p-value                                     | 0.001                                   | 0.009                              | 0.016                             |
| OR [95% CI]                                 | 0.041 [0.006-0.290]                     | 0.509 [0.307-0.843]                | 0.091 [0.013-0.639]               |
| Stability analysis                          |   |                                    |                                   |
| CRS   | T                                       | A                                  | T                                 |
| Distribution in population database         | T:97.4; C:2.4; G:0.1;<br>GAP:0.1        | G:80.8; A:19.1;<br>GAP:0.1; C:0.02 | T:97.5; C:2.5;<br>GAP:0.02        |
| No. Hits phylogeny (PhyloTree.org)          | 9                                       | 12                                 | 15                                |
| No. Hits Soares <i>et al.</i> <sup>25</sup> | 6                                       | 11                                 | 19                                |
| Probability of mutation                     | 0,00056164                              | 0,00102967                         | 0,00177853                        |
| Nucleotide Conservation Index (%)           | T:77.1; GAP:8.3;<br>A:6.3; C:4.2; G:4.2 | A:41.7; C:35.4;<br>G:22.9          | T:79.2; C:12.5;<br>A:6.3; GAP:2.1 |

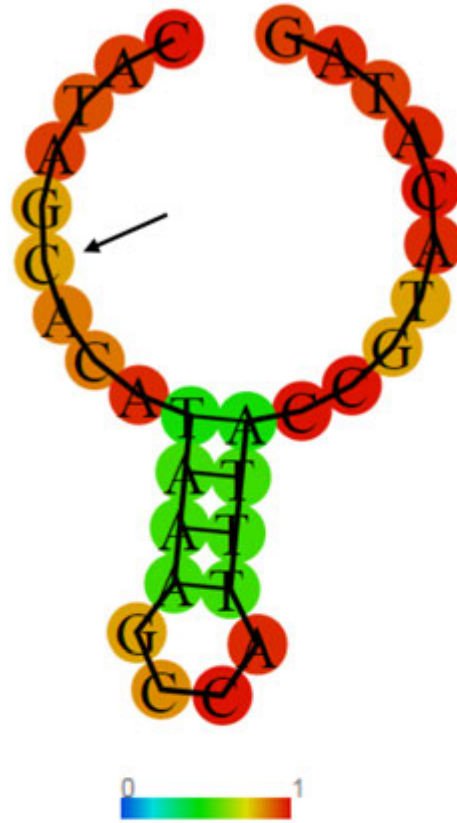
**Table 4.** Complete results of myocardial infarction fixed mtDNA mutation analysed. <sup>a</sup> Conditional regression model was performed considering significant covariates for MI (hypertension, hypercholesterolemia and mtDNA mutations).



Wildtype



Mutation

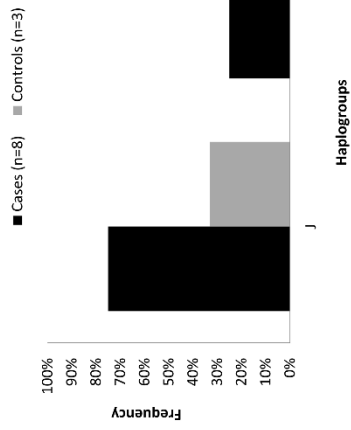


### Information about 16311T>C mutation

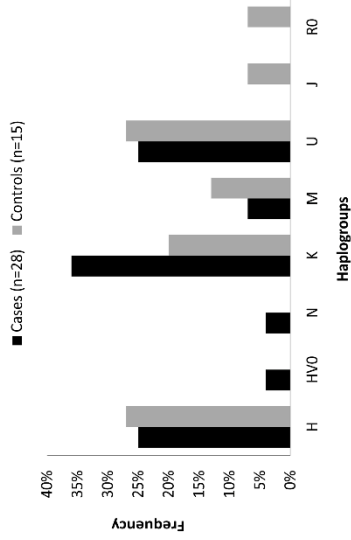
- Wild type sequence: CATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACATAG
- Mutation sequence: CATAGCACATAAAGCCATTTACCGTACATAG
- Wild type free energy: -2.30kcal/mol
- Mutation free energy: -0.40 kcal/mol
- Wild type Dot-Bracketed representation: .... ((((((((.....)))))).....))....
- Mutation Dot-Bracketed representation: ..... (((.....))).....

## Stroke

m. 16145G>A

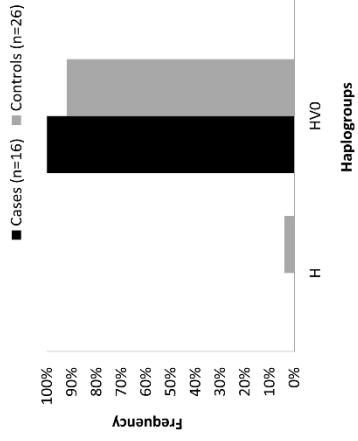


m. 16311T>C

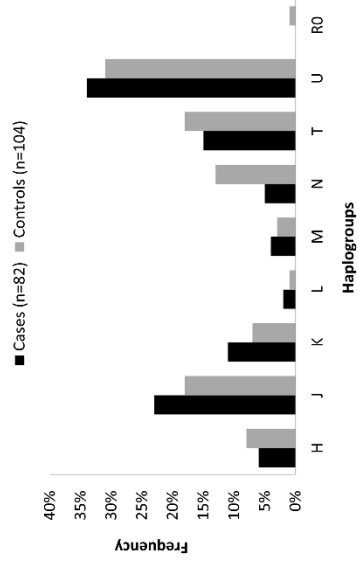


## MI

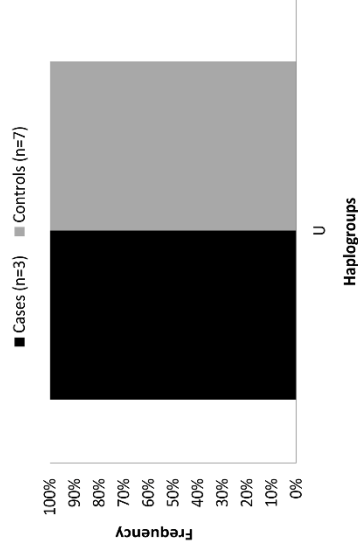
m. 72T>C



m. 73A>G



m. 16356T>C





**New mitochondrial genetic risk score improve discrimination capacity of cardiovascular events**

Miriam Umbria<sup>a</sup>, Israel Ortega<sup>b</sup>, Cristina Santos<sup>a</sup>, Sergio Castillo<sup>b</sup>, Eduardo Salas<sup>b</sup> and Maria Pilar Aluja<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>b</sup> Gendiag.exe, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

**\*Correspondence to:**

Maria Pilar Aluja  
Unitat Antropologia Biològica  
Dep. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia  
Facultat Biociències Edifici C  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Cerdanyola del Vallès  
Barcelona (SPAIN)  
Tel.: +34 93 5811503  
mariapilar.aluja@uab.cat

The authors declare no conflict of interest.

Number of tables to be found in the paper = 3

## ABSTRACT

**Background and aims:** Genetic risk scores (GRSs) summarize cardiovascular risk-associated variation by aggregating information from multiple risk SNPs. Although most reports have attempted to evaluate the use of a GRS based on nuclear SNPs, no studies to date have carried out a GRS for cardiovascular disease (CVDs) using mitochondrial genome (mtDNA). In this study, we assess the capability of nuclear and mitochondrial genetic information for improving the discrimination capacity of CVD over a score based only on clinical information.

**Methods:** A total of 301 cases with clinical history of CVD and 221 controls were included in the analysis. GRS was constructed according to the additive model summing the susceptibility alleles of 11 nuclear SNPs and 5 mitochondrial SNPs previously associated with CVDs and we studied the association of a GRS with the presence of the disease using a multivariate conditional logistic regression model and receiver operating characteristic curve analyses.

**Results:** The area under the curve (AUC) for the score developed only with clinical variables (model 1) was 0.697 (95%CI: 0.655-0.739). When nuclear GRS were combined with the clinical variables (model 2) the new score significantly increased its AUC to 0.722 (95%CI: 0.677-0.768). Addition of the mtDNA variants to model 2 further increased significantly the AUC to 0.774 (95%CI: 0.733-0.817).

**Conclusions:** These results show that the use of mitochondrial genetic information improves the discrimination capacity of CVD beyond the information provided by clinical information and nuclear GRS in this population.

## KEYWORDS

Cardiovascular disease, genetic risk score, mitochondrial variants, single nucleotide polymorphisms, discrimination capacity

## 1. Introduction

Ischemic heart disease and stroke are the world's leading causes of death, accounting for a combined 17.6 million death in 2016 [1]. Cardiovascular epidemiology is characterized by a multifactorial etiology, resulting from a confluence of environmental and genetic factors [2]. In accordance, it is estimated that the heritability of CVD reaches 40-55% [3], suggesting that inherited factors are likely to be making a strong contribution to an individual's future risk of premature CVD. Therefore, recent studies have been focused in understanding the role of genetic determinants in CVDs in order to prevent clinical events.

Over the past 10 years, large-scale sequencing and genotyping studies have identified more than 700 nuclear single nucleotide polymorphisms (SNPs) published in the GWAS Catalog [4] and specific mitochondrial SNPs [5-9] significantly associated with the CVDs. An important amount of such variants has also been associated with classical cardiovascular risk factors (CVRFs) such as hypertension [10], or low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) [11]. However, the identification of genetic variants independently associated with classic CVRFs, are particularly relevant in assessing cardiovascular risk, since they could be used as new biomarkers candidates for CVDs [12]. Overall, the effect of these genetic variants on disease risk tends to be small, but usually additive [13]. To take advantage of the combined knowledge of how these genetic variants affect CVD progress, multilocus genetic risk score (GRS) have been developed as a potentially informative biomarker for improving the risk prediction and/or promoting significant risk re-classification [14,15].

Most reports have attempted to evaluate the use of a nuclear GRS through several established CVD risk algorithm, such as the Framingham risk score [16] or its different region-specific scores as REGICOR [17] for Spain population. For this purpose, cardiovascular risk DNA-chip, Cardio inCode<sup>®</sup> (Ferrer inCode, Barcelona, Spain), was the first test designed to predict cardiovascular risk using a genetic score that incorporates information from 11 nuclear variants associated with CVD [18,19] but not related to classic CVD risk factors. Nevertheless, to date, there are no studies that have carried out a GRS for CVDs using mitochondrial genome (mtDNA). Numerous reports have demonstrated the association between mitochondrial dysfunction with several cardiovascular manifestations [20,21]. Previous results obtained suggest that mtDNA

variants could affect mitochondrial function through changes in the number of copies, inducing profound effects on the expression of mitochondrial-encoded gene transcripts and the coupling efficiency of the OXPHOS (complexes I, III, and IV) [22-24]. These facts leading to changes in bioenergetics or reactive oxygen species (ROS) generation that could be related to the development of CVDs [25-28].

After investigated the possible association between mtDNA control region mutations in two CVDs, MI and stroke, in a case-control study of a Spanish population [9], we identifying a set of five genetic variants (m.16145G>A; m.16311T>C; m.16356T>C; m.72T>C and m.73A>G), with negative or beneficial effect, that could increase or reduce the susceptibility to developing a CVD. These findings, together with the already proven improvement of risk estimation obtained with the use of nuclear GRS by Cardio inCode®, suggests that inclusion of these mitochondrial biomarkers in the calculation of cardiovascular risk could enhance the discrimination capability of CVDs. The main goal of this study is to determine the magnitude of the association between an individual GRS based on the set of mitochondrial genetic variants, and the presence of CVD. First, we assessed the utility of nuclear GRS to improve the discrimination capacity beyond classic CVRFs in the same Spain cohort used previously by Umbria et al. [9,29]. Secondly, we tested whether the addition of mitochondrial variants in a score that combined clinical variables and nuclear GRS already established and tested in other populations [18-19], improved the discrimination capacity.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Subjects*

The cases and controls analysed in this study were selected from the Cardiovascular Disease Risk Study of Castile and Leon [30], a population-based study performed in Castile and Leon (centre-north region of Spain), where a random sample from general population underwent a health examination in relation with cardiovascular risk factors in 2014.

A total of 301 cases with clinical history of CVD and 221 controls were included in this study. For each individual, a DNA sample was available in the Banco Nacional de ADN and we also obtained information about age (categories  $\leq 44$ , [45-49], [50-54], [55-59], [60-64],  $\geq 65$  years), gender, geographic origin (North, Central and South

regions of Castile and Leon), history of hypertension, history of diabetes, history of hypercholesterolemia, cigarette consumption (smokers, former smokers and non-smokers), presence of overweight or obesity (body mass index  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>), presence of high abdominal perimeter in risk range (risk:  $\geq 80$  cm for women and  $\geq 94$  cm for men) and presence of high levels of triglycerides ( $\geq 170$  mg/dl) [31].

It was considered that a subject suffers from hypertension if the diagnosis of hypertension was already in his/her clinical history, if the subject was taking antihypertensive drugs, or if at the moment of the medical examination to enter the population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon [30] systolic blood pressure was  $\geq 140$  mmHg or the diastolic blood pressure was  $\geq 90$  mmHg. It was considered that a subject suffers from hypercholesterolemia if the diagnosis of hypercholesterolemia was already in his/her clinical history, if the subject was taking cholesterol-lowering drugs, or if at the moment of the medical examination to enter the population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon [30] total cholesterol was  $\geq 250$  mg/dl. It was considered that a subject suffers from diabetes mellitus if the diagnosis of diabetes mellitus was already in his/her clinical history, if the subject was taking glycemia-lowering drugs, or if at the moment of the medical examination to enter the population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon [30] glycemia was  $> 125$  mg/dl.

As cardiovascular events we have considered fatal and non-fatal myocardial infarction as well as ischemic stroke.

## *2.2. Selection of genetic variants, genotyping and multilocus risk score generation*

Mitochondrial variants to assess the association between mitochondrial GRS and the presence of CVDs were selected from data previously analysed by our group [9]. The variants selected were m.16145G>A and m.16311T>C that could act as a potential genetic risk factors for stroke and m.72T>C, m.73A>G and m.16356T>C that could act as a possible beneficial genetic factors for MI.

The selected variants to generate the nuclear GRS were previously described by Luís-Granella et al. [19]. In brief, the 11 selected genetic variants were associated with CVDs ( $p \leq 1 \times 10^{-6}$ ) but no with CVRFs (age, gender, origin, cigarette consumption, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, overweight or obesity, abdominal



perimeter and triglycerides), and they are not related to each other by linkage disequilibrium ( $r^2 > 0.3$ ). The list included: rs10455872 in *LPA*; rs10507391, rs17222842 and rs9315051 in *ALOX5AP*; rs12526453 in *PHACTR1*; rs1333049 near *CDKN2A/2B*; rs17465637 in *MIA3*; rs501120 in *CXCL12*; rs6725887 in *WDR12*; rs9818870 in *MRAS* and rs9982601 near *SLC5A3*, *MRPS6*, *KCNE2*.

To determine the magnitude of the association between an individual GRS using mitochondrial variants and the presence of CVD, the results of mtDNA variation, previously published by our group, for 280 cases and 221 controls<sup>9</sup> were used and the control region of mtDNA of 21 additional cases were analysed following the same methodology described in Umbria et al. [29].

Nuclear variants were genotyped using the Cardio inCode chip (Ferrer inCode, Barcelona, Spain), which is based on TaqMan genotyping assays and the EP1 Fluidigm platform (an efficient endpoint PCR system for high-sample-throughput SNP genotyping).

### 2.3. Estimation of individual risk scores

In order to assess if nuclear and mitochondrial genetic information improve the discrimination capability of a CV event, we first developed an individual risk score based on clinical variables, considering those variables significantly different ( $p < 0.05$ ) between cases and controls (see Table 1). Then, we added the nuclear GRS described in Lluís-Ganella et al. [19] as a new variable to the clinical risk score, generating a new risk score with clinical and nuclear genetic information to explore the utility of this GRS in the study population. After this step, the mitochondrial variables were added to the risk score based on clinical and nuclear genetic information, developing a new risk score with clinical and genetic information (nuclear and mitochondrial variables).

Each new risk score was compared against the previous one, to assess if the addition of new information was relevant, in terms of discrimination capability. All risk scores were implemented using multivariate conditional logistic regression models.

### 2.4. Statistical analysis

Baseline demographic and clinical variables of different groups of individuals were compared through the chi-square test for categorical variables. All differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

Multivariate conditional logistic regression models were used to develop the different risk scores. Discrimination capacity of risk scores was evaluated using the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC). Comparison of AUCs was performed with the DeLong's test for paired data [32].

Statistical analyses were performed using R statistical software, version 3.1.3 (R Development Core Team, 2015).

### **3. Results**

#### *3.1. Sample characteristics*

Table 1 shows a summary of the sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of selected cases and controls. Hypertension and hypercholesterolemia were significantly higher in cases than in controls [(hypertension: 87% vs. 71.9%, respectively;  $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  test) and (hypercholesterolemia: 66.1% vs. 45.2%, respectively;  $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  test)] (Table 1). The cigarette consumption profile, the frequency of individuals with diabetes, overweight or obesity, abdominal perimeter in risk range, and high triglycerides, was similar in cases and controls.

The frequency for each mitochondrial and nuclear variant that were included in our analyses for cases and controls are showed in Table 2. For mitochondrial risk variants, higher frequencies were observed in cases. By contrast, beneficial mtDNA variants were more frequent in controls. The distribution of the risk allele for each of the nuclear variants analysed is similar between cases and controls (Table 2).

#### *3.2. Utility of nuclear GRS in discrimination capacity of CVD*

The risk score developed only with clinical variables included hypertension and hypercholesterolemia as the clinical relevant predictors (Table 3). The AUC for this score was 0.697 (95%CI: 0.655-0.739). When we include the nuclear GRS described in Lluís-Ganella et al. [19] as a new predictor jointly with the clinical variables the new score increases its AUC to 0.722 (95%CI: 0.677-0.768), showing a statistically

significant improvement in the discrimination capacity, AUCs 0.722 vs 0.697 ( $p=0.0323$ ) (Table 3).

### *3.3. Improvement in discrimination capacity by adding mitochondrial GRS*

The AUC obtained for a GRS constructed in this population with mitochondrial variants reported in Umbria et al. [9] was 0.630 (95%CI: 0.582-0.678). We created a third score that included the new mitochondrial GRS jointly with clinical variables (hypertension and hypercholesterolemia) and the nuclear GRS (Table 3). In this case, the AUC increases to 0.774 (95%CI: 0.733-0.817), showing a statistically significant improvement in the discrimination capacity of the risk score without the mtDNA information (0.774 vs 0.722,  $p=0.0007$ ) (Table 3). These results indicate that the addition of mitochondrial variants significantly improves the discrimination capacity of CVD beyond CVRFs and beyond the joint CVRFs and the nuclear GRS for this population.

## **4. Discussion**

In this work, we assess the capability of genetic information for improving the discrimination capacity of CVD over a score based only on clinical information.

First, our results show that the nuclear GRS described in Lluís-Ganella et al. [19] and used to analyse the improvement in discrimination of coronary heart disease, have also shown its utility in CVD (specifically for MI and stroke) in the population analysed in the present study. Moreover, when mtDNA variables are also considered in the combined score (based on clinical variables and nDNA), we obtain a significant improvement in the discrimination capacity over the clinical variables and over the clinical variables together with the nuclear GRS. In this regard, as previously indicated, recent evidence associated the cardiovascular disease (CVD) with specific mitochondrial DNA (mtDNA) defects, mainly driven by the central role of mitochondria in cellular metabolism [20-24]. The ability of mtDNA mutation to influence in the development of CVDs is directly related to its prevalence and the severity of its impact on mitochondrial function.

In this study, we have used a case-control design, but considering that the nuclear genetic variants have shown not only discriminative capacity but also predictive

capacity, it is also credible that the mitochondrial variants will also have predictive capability. The genetic variants included are invariable over time. These variants indicate a predisposition that will be recognised phenotypically sooner or later or never in a CV event according to environmental and lifestyle variables. For this reason, the AUC of mitochondrial GRS is relatively low as it is that of the nuclear GRS alone. In the study, we have introduced clinical variables such as hypertension and hyperlipidaemia as manifestation of environmental and lifestyle variables, which are associated with a greater risk of suffering an event, in order to demonstrate that clinical variables when added to the genetic variants, would improve the discrimination capability.

To date, there are many studies using multiple variants previously associated with different CVDs hoping to improve the discrimination capacity and the predictive risk [33-35]. To our knowledge, the present study is the first to demonstrate that the employment of a GRS based on mitochondrial variants significantly improve discrimination capacity of CVD beyond the information provided by classic CVRFs and nuclear GRS.

At this time, all studies in which we can reference our results have always used nuclear variants for analysis. Mega et al. [36], investigated an association of a GRS based on 27 genetic variants with incident or recurrent CHD. This GRS divided the population into low, intermediate and high-risk groups, permitting that people with the highest burden of genetic risk derived the large clinical benefit from statin therapy. From here, several studies also showed an improved in discrimination and reclassification of risk beyond established clinical criteria [37-41]. In a recent study conducted by Khera et al. [42], using a GRS to quantified generic risk for CAD in three prospective cohorts, the authors determined that relative risk of cardiac events among patients at high GRS was 91% higher than in patients at low GRS. Furthermore, they showed that a favourable lifestyle (no current smoking, no obesity, regular physical activity, and a healthy diet) was associated with a nearly 50% lower risk of CAD than was an unfavourable lifestyle among patients at high GRS, indicating that genetic and classic CVRFs are mostly independently associated with susceptibility to CVDs. The results of Inouye et al. [43], which took into account 1.7 million nuclear genetic variants, also demonstrated that the predictive capacity of the genetic risk score is

independent of conventional risk factors. In this sense, similar results have been obtained with the nuclear genetic variants we have used in our study [44]. Such results would be in line with our finding that use a nuclear GRS improved discrimination capacity of CVD, and for the time being, these findings could be extrapolated to the results obtained with mitochondrial GRS analysis. Therefore, our finding would promote new studies to include mitochondrial variants together with nuclear variants into a GRS.

The possible clinical utility of our results relies on their reproduction in a cohort setting. Kullo et al. [45] found that disclosure of 10-year genetic risk estimates for coronary artery disease (CAD) resulted in LDL-C levels that were ~10 mg/dl lower among participants with high genetic risk compared to participants undergoing risk assessment restricted to conventional risk factors. However, other studies concluded that providing a GRS to the participants not function as a motivator to improve adherence to risk-reducing strategies [46,47]. Even so, this finding could improve cost effectiveness of genetic testing for CVD because this mitochondrial GRS involves only the genotyping of five SNPs.

Despite our promising results, some limitations of our study should be acknowledge. In this work, the relevant clinical variables were hypertension and hypercholesterolemia. One could think on the REGICOR score (which is the Framingham score calibrated to the Spanish population) as a best option to consider for this purpose [48], but in our population, we do not have the clinical variables included in REGICOR but collected 10 years before the CVD as this is a case-control study and cases have been already treated and some variables included in the Framingham score (like total cholesterol) are highly influenced by the effect of treatment [49,50].

#### **4.1. Conclusions**

In conclusion, this study has shown that the use of genetic information improve the discrimination capacity of CV events. The combination of nuclear and mitochondrial GRS increases the AUC results, enlarging the discrimination power of analysis. However, the clinical implication of the addition of genetic factors for discrimination and reclassification of risk remain unknown, especially when it comes to mitochondrial genetic variants. In near future, this will be of clinical utility, but further

studies are needed to validate the results and confirm the cost benefit to their implementing and the acceptability of such genetic test to the society.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Financial Support**

This work was supported by Gendiag.exe, MINECO (project: CGL2014-53781-r) and Generalitat de Catalunya (Ref. 2017 SGR 1630).

### **Author contribution**

CS, SC, ES and MPA contributed to the study design and supervised the work. MU and IO gathered the data and performed bioinformatics analyses. MU, IO, CS, ES and MPA analyzed the data and interpreted the results. MU and IO wrote the main manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

### **References**

- [1] World Health Organization. The top 10 causes of death, <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, 2018 (accessed 10 November 2018).
- [2] Flowers E, Froelicher ES and Aouizerat BE. Gene-Environment Interactions in Cardiovascular Disease, *Eur J Cardiovasc Nurs* 11 (2012) 472–478.
- [3] Elosua R, Lluís C, Lucas G, Estudio del componente genético de la cardiopatía isquémica: de los estudios de ligamiento al genotipado integral del genoma, *Rev Esp Cardiol Supl* 9 (2009) B24-B38.
- [4] MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, et al., The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog), *Nucleic Acids Res* 45 (2017) D896-D901.
- [5] Mueller EE, Eder W, Ebner S, Schwaiger E, Santic D, et al., 2011. The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations, *PloS one*. 6, e16455.
- [6] Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mousa A, Gonzalez AM, Larruga JM, et al., The mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs. *Genet Test Mol Biomarkers* 14 (2010) 43-47.

- [7] Gawel B, Głogowska-Ligus J, and Mazurek U, The G16319A substitution frequency in a hemorrhagic stroke, *Ann Indian Acad Neurol* 11 (2008) 154-158.
- [8] Sazonova MA, Shkurat TP, Demakova NA, Zhelankin AV, Barinova VA, et al., Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next?, *Curr Pharm Des*, 22 (2016) 390-396.
- [9] Umbria M, Ramos A, Aluja MP, Santos C, The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction, *Scientific Reports*, Under Review (January 2019), Available in: <https://doi.org/10.1101/382374>.
- [10] International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies. Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk, *Nat* 478 (2011) 103-109.
- [11] Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, et al., Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events, *N Engl J Med* 358 (2008) 1240-1249.
- [12] Upadhyay RK, 2015. Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and disorders, *J Lipids* 2015:971453.
- [13] Franchini M, Peyvandi F, Mannucci PM, The genetic basis of coronary artery disease: from candidate genes to whole genome analysis, *Trends Cardiovasc Med* 18 (2008) 157-162.
- [14] Janssens AC, Aulchenko YS, Elefante S, Borsboom GJ, Steyerberg EW, et al., Predictive testing for complex diseases using multiple genes: fact or fiction. *Genet Med* 8 (2006) 395–400.
- [15] Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, Havulinna AS, Silander K, et al., A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses, *Lancet* 376 (2010) 1393–1400.
- [16] Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, et al., Prediction of coronary heart disease using risk factor categories, *Circulation* 97 (1998) 1837-1847.
- [17] Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, et al., An adaptation of the Framingham coronary heart disease risk function to European Mediterranean areas. *J Epidemiol Community Health* 57 (2003) 634-638.

- [18] Lluís-Ganella C, Lucas G, Subirana I, Sentí M, Jimenez-Conde J, et al., Additive effect of multiple genetic variants on the risk of coronary artery disease, *Rev Esp Cardiol* 63 (2010) 925-933.
- [19] Lluís-Ganella C, Subirana I, Lucas G, Tomás M, Muñoz M, et al., Assessment of the value of a genetic risk score in improving the estimation of coronary risk. *Atherosclerosis*, 222 (2012) 456-463.
- [20] Panth N, Paudel KR, and Parajuli K, 2016. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease, *Adv Med* 2016:9152732.
- [21] Taverne YJ, Bogers AJ, Duncker DJ, and Merkus D, 2013. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev* 15:862423.
- [22] Ashar FN, Zhang Y, Longchamps RJ, Lane J, Moes A, et al., Association of Mitochondrial DNA Copy Number With Cardiovascular Disease, *JAMA Cardiol* 2 (2017) 1247–1255.
- [23] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, et al., Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88 (2001) 529-535.
- [24] Tsutsui H, Kinugawa S, and Matsushima S, Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure, *Circ J* 72 (2008) A31-37.
- [25] Kalogeris T, Bao Y, and Korthuis RJ, Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning, *Redox Biol* 2 (2014) 702-714.
- [26] Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, et al., Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases, *Biochim Biophys Acta* 1842 (2014) 208-219.
- [27] Marcuello A, Martinez-Redondo D, Dahmani Y, Casajus JA, Ruiz-Pesini E, et al., Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption, *Mitochondrion* 9 (2009) 27-30.
- [28] Martinez-Redondo D, Marcuello A, Casajus JA, Ara I, Dahmani Y, et al., Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO<sub>2</sub>max consumer is it a paradox?, *Mitochondrion* 10 (2010) 102-107.



- [29] Umbria M, Ramos A, Caner J, Vega T, Lozano JE, et al., Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: A case-control study in Castile and Leon (Spain) population, *Mitochondrion* 44 (2019) 1-6.
- [30] Vega A, Lozano JE, Álamo R, Lleras S, Escribano A, et al., Design of a population-based study of cardiovascular risk in Castile and Leon (Spain) through primary care teams, *Gac Sanit* 21 (2007) 84-87.
- [31] WHO Consultation on Obesity; World Health Organization, Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation, Geneva, 2000, <http://www.who.int/iris/handle/10665/42330>.
- [32] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, *Biometrics* 44 (1988) 837-845.
- [33] Christiansen MK, Nyegaard M, Larsen SB, Grove EL, Würtz M, et al., A genetic risk score predicts cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease, *Int J Cardiol* 241 (2017) 411-416.
- [34] Goldstein BA, Knowles JW, Salfati E, Ioannidis JP, and Assimes TL, 2014. Simple, standardized incorporation of genetic risk into non-genetic risk prediction tools for complex traits: coronary heart disease as an example, *Front Genet* 5:254.
- [35+] Pereira A, Mendonca MI, Sousa AC, Borges S, Freitas S, et al., 2017. Genetic risk score and cardiovascular mortality in a southern european population with coronary artery disease, *Int J Clin Pract* 71:e12956.
- [36] Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield M, et al., Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials, *Lancet* 385 (2015) 2264–2271.
- [37] Abraham G, Havulinna AS, Bhalala OG, Byars SG, De Livera AM, et al., Genomic prediction of coronary heart disease, *Eur Heart J* 37 (2016) 3267–3278.
- [38] Beaney K, Drenos F, and Humphries SE, How close are we to implementing a genetic risk score for coronary heart disease?, *Expert Rev Mol Diagn* 17 (2017) 905-915.
- [39] Muse ED, Wineinger NE, Spencer EG, Peters M, Henderson R, et al., 2018. Validation of a genetic risk score for atrial fibrillation: A prospective multicenter cohort study, *PLoS Med* 15:e1002525.

- [40] Natarajan P, Young R, Stitzel NO, Padmanabhan S, Baber U, et al., Polygenic risk score identifies subgroup with higher burden of atherosclerosis and greater relative benefit from statin therapy in the primary prevention setting, *Circulation* 135 (2017) 2091–2101.
- [41] Tada H, Melander O, Louie JZ, Catanese JJ, Rowland CM, et al., Risk prediction by genetic risk scores for coronary heart disease is independent of self-reported family history, *Eur Heart J* 37 (2016) 561–567.
- [42] Khera AV, Emdin CA, Drake I, Natarajan P, Bick AG, et al., Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease, *N Engl J Med* 375 (2016) 2349-2358.
- [43] Inouye M, Abraham G, Nelson CP, Wood AM, Sweeting MJ, et al., Genomic Risk Prediction of Coronary Artery Disease in 480,000 Adults, Implications for Primary Prevention 72 (2018) 1883-1893.
- [44] Iribarren C, Lu M, Jorgenson E, Martinez M, Lluís-Ganella C, et al., Clinical Utility of Multimarker Genetic Risk Scores for Prediction of Incident Coronary Heart Disease: A Cohort Study Among Over 51 Thousand Individuals of European Ancestry, *Circ Cardiovasc Genet* 9 (2016) 531-540.
- [45] Kullo IJ, Jouni H, Austin EE, Brown SA, Kruisselbrink TM, et al., Incorporating a genetic risk score into coronary heart disease risk estimates: effect on low-density lipoprotein cholesterol levels (the MI-GENES clinical trial), *Circulation* 133: (2016) 1181–1188.
- [46] Knowles JW, Zarafshar S, Pavlovic A, Goldstein BA, Tsai S, et al., 2017. Impact of a Genetic Risk Score for Coronary Artery Disease on Reducing Cardiovascular Risk: A Pilot Randomized Controlled Study, *Front Cardiovasc Med* 4:53.
- [47] Hollands GJ, French DP, Griffin SJ, Prevost AT, Sutton S, et al., 2016. The impact of communicating genetic risks of disease on risk-reducing health behaviour: systematic review with meta-analysis, *BMJ* 352:i1102.
- [48] Marrugat J, Subirana I, Comín E, Cabezas C, Vila J, et al., Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA Study, *J Epidemiol Community Health* 61 (2007) 40-47.

[49] D'Agostino RB, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P, Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation, JAMA 286 (2001) 180-187.

[50] Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, Sullivan L, Ordovas J, et al., Estimación del riesgo coronario en España mediante la ecuación de Framingham calibrada, Rev Esp Cardiol 56 (2003) 253-61.

**Table 1. Sociodemographic, biochemical and clinical characteristics of cases and controls**

|   | <b>Controls</b>      | <b>Cases CVD</b>      | <b>p-value<sup>a</sup></b> |
|---|----------------------|-----------------------|----------------------------|
|   | <b>n=221 (%)</b>     | <b>n=301 (%)</b>      |                            |
| Age (years)                                   |                      |                       |                            |
| ≤44   | 4 (1.8)              | 6 (2)                 |                            |
| 45-49   | 14 (6.3)             | 13 (4.3)              |                            |
| 50-54   | 5 (2.3)              | 12 (4)                | 0.618                      |
| 55-59   | 19 (8.6)             | 18 (6)                |                            |
| 60-64   | 24 (10.9)            | 34 (11.3)             |                            |
| ≥65   | 155 (70.1)           | 218 (72.4)            |                            |
| Male/Female                                   | 129 (58.4)/92 (41.6) | 189 (62.8)/112 (37.2) | 0.307                      |
| Geographic origin                             |                      |                       |                            |
| North   | 64 (29)              | 79 (26.2)             |                            |
| Central                                       | 92 (41.6)            | 124 (41.2)            | 0.687                      |
| South   | 65 (29.4)            | 98 (32.6)             |                            |
| Cigarette consumption                         |                      |                       |                            |
| Non-smoking                                   | 126 (57)             | 151 (50.2)            |                            |
| Former smoker                                 | 64 (29)              | 111 (36.9)            | 0.164                      |
| Smoker  | 31 (14)              | 39 (13)               |                            |
| Hypertension                                  | 159 (71.9)           | 262 (87)              | <0.001                     |
| Diabetes                                      | 41 (18.6)            | 68 (22.6)             | 0.262                      |
| Hypercholesterolemia                          | 100 (45.2)           | 199 (66.1)            | <0.001                     |
| Overweight or obesity (≥25kg/m <sup>2</sup> ) | 170 (76.9)           | 221 (73.4)            | 0.362                      |
| High abdominal perimeter (>80 or >94 cm)      | 173 (78.3)           | 218 (72.4)            | 0.127                      |
| Triglycerides (≥170mg/dl)                     | 31 (14)              | 37 (12.3)             | 0.561                      |

<sup>a</sup> p-value of a chi-squared test for qualitative data

**Table 2. Distribution of mitochondrial and nuclear SNP frequencies among cases and controls.**

| SNP ID                           | Frequencies No. (%) |                  |
|----------------------------------|---------------------|------------------|
|                                  | Controls<br>(n=221) | Cases<br>(n=301) |
| <b>Mitochondrial DNA</b>         |                     |                  |
| m.16145G>A                       | 8 (3.6)             | 13 (4.3)         |
| m.16311T>C                       | 29 (13.1)           | 46 (15.3)        |
| m.72T>C                          | 28 (12.7)           | 18 (6)           |
| m.73A>G                          | 98 (44.3)           | 127 (42.2)       |
| m.16356T>C                       | 8 (3.6)             | 4 (1.3)          |
| <b>Nuclear DNA (risk allele)</b> |                     |                  |
| rs10455872 (G)                   | 26 (11.8)           | 56 (18.6)        |
| rs10507391 (T)                   | 191 (86.4)          | 250 (83.1)       |
| rs17222842 (A)                   | 30 (13.6)           | 40 (13.3)        |
| rs9315051 (G)                    | 40 (18.1)           | 62 (20.6)        |
| rs12526453 (C)                   | 188 (85.1)          | 264 (87.7)       |
| rs1333049 (C)                    | 168 (76)            | 241 (80.1)       |
| rs17465637 (C)                   | 199 (90)            | 280 (93)         |
| rs501120 (T)                     | 216 (97.7)          | 296 (98.3)       |
| rs6725887 (T)                    | 57 (25.8)           | 91 (30.2)        |
| rs9818870 (T)                    | 36 (16.3)           | 49 (16.3)        |
| rs9982601 (T)                    | 57 (25.8)           | 72 (23.9)        |

Table 3. Adjusted models for calculation of different risk scores and comparison of AUCs

| Score 1              |                 | Score 2              |                 | Score 3              |                 |
|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| Variable             | <i>p</i> -value | Variable             | <i>p</i> -value | Variable             | <i>p</i> -value |
| Hypertension         | 0.0001          | Hypertension         | 0.0001          | Hypertension         | <0.0001         |
| Hypercholesterolemia | 0.0032          | Hypercholesterolemia | 0.0018          | Hypercholesterolemia | 0.0022          |
|                      |                 | Nuclear DNA – GRS    | 0.0271          | Nuclear DNA – GRS    | 0.0705          |
|                      |                 |                      |                 | m.16145G>A           | 0.1042          |
|                      |                 |                      |                 | m.16311T>C           | 0.4592          |
|                      |                 |                      |                 | m.72T>C              | 0.0060          |
|                      |                 |                      |                 | m.73A>G              | 0.3420          |
|                      |                 |                      |                 | m.16356T>C           | 0.0271          |
| <b>AUC1</b>          | <b>0.697</b>    | <b>AUC2</b>          | <b>0.722</b>    | <b>AUC3</b>          | <b>0.774</b>    |

*p*-value  
**AUC1 vs AUC2** 0.0323  
**AUC2 vs AUC3** 0.0007



09



Annex 3







MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, ENERGÍA  
Y TURISMO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

|   |   |  |
|---|---|--|
| Submission number                             | 300277184   |  |
| Application number                            | EP18382393.9  |  |
| File No. to be used for priority declarations | EP18382393  |  |
| Date of receipt                               | 05 June 2018  |  |
| Your reference                                | T-2017-042EP  |  |
| Applicant                                     | UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA   |  |
| Country                                       | ES  |  |
| Title   | Method for evaluating risk of cardiovascular disease  |  |
| Documents submitted                           | package-data.xml<br>application-body.xml<br>OLF-ARCHIVE.zip\T-2017-042 EP.zip<br>SPECEPO-1.pdf\T-2017-042EP Description.pdf (28 p.)<br>SPECEPO-3.pdf\T-2017-042EP Abstract.pdf (1 p.)<br>f1002-1.pdf (2 p.) | ep-request.xml<br>ep-request.pdf (5 p.)<br>SPECTRANONEP.pdf\Traducción Titulo&Abstract T-2017-042.pdf (1 p.)<br>SPECEPO-2.pdf\T-2017-042EP Claims.pdf (2 p.)<br>SEQLTXT.txt\T2017042_SEQ LIST_ST25.txt |
| Submitted by                                  | CN=Xavier Vallvé Sanchez 24825  |  |
| Method of submission                          | Online  |  |
| Date and time receipt generated               | 05 June 2018, 15:06:17 (CEST)   |  |



