

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universidad Autónoma de Barcelona**

Facultad de Biociencias

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Doctorado en Biodiversidad

**Variabilidad genética mitocondrial en  
la enfermedad cardiovascular.  
Estudio caso-control en población de  
Castilla y León (España)**

**Ana Onieva Salgado**

Tesis doctoral

2023

Directora y tutora: Dra. M<sup>a</sup> Pilar Aluja Paris



Trabajo financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (CGL2014-53781-r) y GENDIAG.EXE, y desarrollado en el seno de Grupo de Investigación Consolidado "Grup de Recerca en Antropologia Biològica (GREAB, 2017 SGR 1630)" de la Generalitat de Catalunya



# Variabilidad genética mitocondrial en la enfermedad cardiovascular. Estudio caso-control en población de Castilla y León (España)

Memoria presentada por Ana Onieva Salgado para optar al título de Doctora en Biodiversidad del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Directora de tesis:

- Dra. M<sup>a</sup> Pilar Aluja Paris, Profesora Titular de la Unidad de Antropología Biológica del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología.

Tutora de doctorado:

- Dra. M<sup>a</sup> Pilar Aluja Paris, Profesora Titular de la Unidad de Antropología Biológica del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología.



# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Maria Pilar Aluja por darme la oportunidad de realizar una tesis doctoral e introducirme en el mundo de la investigación.

Al servicio de genómica y bioinformática (SGB) del IBB-Parc de Recerca UAB por facilitarme un espacio en su laboratorio en el que trabajar en mis muestras. A la Dra. Katryn Beyer, del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol por permitirme aprender de ella.

A las encargadas de la limpieza del C5 de la Facultad de Biociencias por aguantar los microinfartos al encontrarme en la Unidad a las 6 y media de la mañana y adaptar su trabajo a mis necesidades en el laboratorio.

A mi familia por apoyarme durante toda esta etapa y animarme a conseguir lo que quería. En especial a Andrea, por ser mi gemela hasta en este proceso, y a mis padres, por su apoyo en los momentos en los que más cuesta arriba se me hacía todo.

A Sandra, por aguantar conmigo todos los altos y bajos durante estos años, confiando en mí, incluso cuando yo no lo hacía. Por darme ánimos cuando más los necesitaba, y hacerme reír incluso cuando no creía que fuera posible. Por celebrar conmigo mis logros, por pequeños que fueran, y por no permitir que me pierda a mí misma en el trabajo. A mis michis Oki, Lilith y BMO, por su compañía y mimos, sin los cuales la redacción de esta tesis hubiera sido una tarea muchísimo más pesada, aunque probablemente más rápida.





# Resumen

La ECV supone un problema socioeconómico a nivel global, dado que es una de las principales causas tanto de muerte como de morbilidad en todo el mundo. Se trata de una enfermedad multifactorial, que conlleva un componente genético.

Debido al papel clave que juega la mitocondria en la producción de energía, se ha postulado que modificaciones en su genoma pueden alterar el sistema OXPHOS y con ello el correcto funcionamiento celular, habiéndose observado como la disfunción mitocondrial tiene no sólo un efecto perjudicial en el tejido cardiaco sino también en el tejido endotelial de los vasos sanguíneos. A pesar de que, en los últimos años, se han empezado a publicar estudios que investigan el papel que juega la genética mitocondrial en la ECV, muchos de ellos se han centrado solamente en el análisis de una o dos características, como pueden ser la variación en la región control o la asociación con haplogrupos, habiéndose realizado, en gran parte, en población asiática.

Los objetivos desarrollados en la presente Tesis Doctoral son los siguientes: 1) Evaluar el papel de factores de riesgo clásicos; 2) Verificar la fiabilidad de la metodología empleada 3) Caracterizar el genoma mitocondrial en relación al riesgo de ECV; 4) Analizar la relación entre el número de copias de mtDNA y el riesgo de ECV.

Para poder dar respuesta a estas premisas se ha propuesto una estrategia caso-control con 4 grupos muestrales distintos: 1) ~~110~~ individuos con antecedentes de ACV; 2) individuos con antecedentes de IM, 3) individuos con historial de ambas patologías y 4) todos los individuos de manera conjunta (ECV global). En todas las agrupaciones se cuenta con el mismo número de individuos control emparejados en función de la edad, sexo y origen geográfico. Se ha analizado la variación nucleotídica en el genoma mitocondrial completo empleando como herramienta la secuenciación masiva, concretamente la tecnología MiSeq de Illumina y se ha investigado el número de copias de mtDNA realizando una cuantificación relativa mediante qPCR.

Los resultados y sus respectivas discusiones se han organizado en capítulos (I-VI). En el capítulo I se ha realizado un análisis del comportamiento de los diferentes factores de riesgo clásicos, ya que pueden estar actuando como factores que generen confusión en análisis posteriores. Tanto la hipertensión como la hipercolesterolemia son significativamente más frecuentes en los individuos con antecedentes de IM, IM e ACV o a nivel de ECV global, siendo dichas variables consideradas en los análisis posteriores para evitar sesgos. En los individuos con ACV no se ha detectado diferencias en la distribución de ninguna de las variables analizadas.

En el capítulo II se ha investigado la calidad de los datos obtenidos en la secuenciación del mtDNA. La calidad ha sido buena, aunque aparecen algunos sesgos producidos por la metodología empleada en la generación de las librerías y la plataforma de secuenciación escogida.

En el capítulo III se ha analizado la asociación entre el haplogrupo mitocondrial y la ECV. Se ha determinado que las asociaciones entre los haplogrupos y las ECV no son iguales para todas ellas, sino que son, en gran medida, específicas de la ECV estudiada. En este trabajo se describe, por primera vez, una asociación beneficiosa entre el haplogrupo V y el riesgo de ACV. Mientras que el haplogrupo H parece estar actuando como un factor de riesgo en la

comorbilidad de IM y ACV. Por el contrario, el haplogrupo U parece comportarse como un factor de protección reduciendo el riesgo de presentar ambas enfermedades. A nivel de ECV global no se detecta ninguna asociación entre el riesgo de ECV y los haplogrupos mitocondriales.

En el capítulo IV se analiza la distribución de las mutaciones a lo largo del genoma mitocondrial y el efecto acumulativo que pueden tener mediante el cálculo de la carga mutacional ajustada. Los resultados muestran que la *ratio* de mutaciones presenta el mismo patrón en casos y controles, aunque en algunas de las regiones mitocondriales existen diferencias en el número de homoplasmias o heteroplasmias en función de la ECV analizada. Respecto a la carga mutacional el resultado más destacable se obtiene al analizar la ECV global, donde se detecta que los individuos que presentan alguna ECV tienen una carga global de variantes patogénicas estadísticamente superior a la de los controles.

El capítulo V analiza las diferentes mutaciones de manera individual y su papel en el riesgo de ECV. Se han hallado algunas mutaciones en homoplasmias relacionadas con el riesgo de ECV, aunque en algunos casos, parecen estar reflejando el papel del haplogrupo más que actuar como factores independientes. Sin embargo, las variantes m.73A>G, m.6776T>C, m.11467A>G, m.11719G>A, m.14766C>T y m.16362T>C no parecen estar asociadas a ningún haplogrupo y actúan modificando el riesgo de las diferentes ECV incluidas en este estudio. También se ha observado que la variante m.4157A>T en heteroplasmia se comporta como un factor de protección frente al riesgo de infarto de miocardio.

Finalmente, en el capítulo VI se investiga el papel que juega el número de copias de mtDNA. Nuestros resultados no indican ninguna asociación entre el mtDNA-CN y el riesgo de ACV o de IM.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis permiten conocer mejor el papel del genoma mitocondrial en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular, demostrando su implicación en esta y se presta como base para estudios adicionales.

# Abstract

Cardiovascular diseases pose a global socioeconomic issue, as it is one of the leading causes of both death and morbidity worldwide. It is multifactorial diseases with a genetic component.

Given the key role that the mitochondria play in energy production, it has been proposed that modifications in its genome may alter the OXPHOS system and subsequently the correct cellular functioning. It has been noted that mitochondrial dysfunction as a detrimental effect not only on cardiac tissue but also on the endothelial tissue of blood vessels. Although studies investigating the role of mitochondrial genetics in CVD have begun to be published in recent years, many of them have focused only on the analysis of one or two characteristics, such as variation in the control region or association with haplogroups, and have been carried out largely in Asian populations.

The main objectives of this thesis are as follows: 1) to evaluate the role of classical risk factors; 2) to verify the reliability of the methodology used; 3) to characterize the mitochondrial genome in relation to CVD risk; 4) to analyze the relationship between the mitochondrial copy number and CVD risk.

In order to accomplish our objectives, a case-control strategy has been proposed with 4 different sample groups: 1) individuals with stroke history; 2) individuals with myocardial infarction history; 3) individuals with a history of both diseases and 4) All individuals together (global CVD). All groupings had the same number of control individuals matched for age, sex and geographical origin. Nucleotide variation in the complete mitochondrial genome has been analyzed using next generation sequencing, specifically Illumina's MiSeq technology, and the number of mtDNA copies was investigated by performing relative quantification using qPCR.

The results and their respective discussions have been organized into chapters (I-VI). In chapter I, an analysis of the behavior of the different classical risk factors was carried out, since they may be acting as confounding factors in downstream analyses. Both hypertension and hypercholesterolemia are significantly more frequent in individuals with history of MI, MI and stroke, or global CVD, and these variables are considered in subsequent analyzes to avoid bias. No differences in the distribution of any of the variables analyzed were detected in individuals with stroke history.

In chapter II the quality of the data obtained from the mtDNA sequencing was investigated. The quality was good, although there were some biases produced by the methodology used to generate the libraries and the sequencing platform that was chosen.

In chapter III the link between the mitochondrial haplogroup and CVD has been studied. It has been determined that the associations between haplogroups and CVDs are, to a certain extent, specific of each cardiovascular disease. This paper describes, for the first time, a beneficial association between haplogroup V and CVD risk. Whereas haplogroup H appears to be acting as a risk factor in MI and stroke comorbidity. On the contrary, haplogroup U seems to behave as a protective factor reducing the risk of presenting both diseases. No association between global CVD risk and mitochondrial haplogroups was detected.

Chapter IV analyzes the distribution of mutation along the mitochondrial genome and the cumulative effect they can have by calculating an adjusted mutational load. The results show that the ratio of mutations presents the same pattern in cases and controls, although in some

of the mitochondrial regions there are differences in the number of homoplasmies or heteroplasmies depending on the CVD analyzed. Regarding the mutational load, the most noteworthy result is obtained in the analysis of global CVD, where we observe that individuals with CVD have a global mutational load of pathogenic variants that is statistically higher than that of controls.

Chapter V investigates the different mutations individually and their role in the risk of CVD. Some homoplasmic mutations have been associated with CVD risk, although in some instances they seem to be reflecting the role of the haplogroup rather than acting as independent factors. However, variants m.73A>G, m.6776T>C, m.11467A>G, m.11719G>A, m.14766C>T y m.16362T>C do not appear to be associated with any haplogroup and act by modifying the risk the different cardiovascular diseases studied in this thesis. Heteroplasmic variant m.4157A>T, seems to be acting as a protective factor against myocardial infarction risk.

Finally, in chapter VI we investigated the role of mtDNA copy number. Our results do not indicate any association between a change in mitochondrial copy number and the risk of stroke or MI.

In summary, the results obtained in this PhD thesis allow us to provide a better understanding of the role of the mitochondrial genome in the pathophysiology of cardiovascular disease, demonstrating its involvement in these diseases and lending itself as a basis for additional studies.



# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| Agradecimientos .....                                       | I         |
| Resumen.....  | III       |
| Abstract .....  | V         |
| Índice.....   | VIII      |
| <b>Introducción.....</b>                                    | <b>1</b>  |
| La mitocondria .....  | 3         |
| Función mitocondrial .....                                  | 5         |
| El genoma mitocondrial .....                                | 7         |
| Variación del mtDNA.....                                    | 18        |
| Enfermedad Cardiovascular .....                             | 22        |
| Factores de riesgo para la ECV .....                        | 22        |
| Epidemiología de la ECV.....                                | 32        |
| Enfermedad cardiovascular en España .....                   | 35        |
| <b>Justificación y objetivos .....</b>                      | <b>38</b> |
| <b>Material y métodos .....</b>                             | <b>43</b> |
| Recolección de muestras y extracción de DNA.....            | 45        |
| Secuenciación del mtDNA .....                               | 46        |
| Cuantificación relativa del número de copias de mtDNA ..... | 48        |
| Análisis de datos.....                                      | 49        |
| <b>Resultados y discusión .....</b>                         | <b>55</b> |
| I. Factores de riesgo clásicos .....                        | 57        |
| Resultados .....  | 59        |
| Accidente cerebrovascular .....                             | 59        |
| Infarto de miocardio.....                                   | 59        |
| Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio .....      | 60        |
| Enfermedad cardiovascular global.....                       | 61        |
| Discusión .....   | 61        |
| II. Control de la calidad de la secuenciación .....         | 62        |
| Resultados .....  | 64        |
| Enfermedad cardiovascular global.....                       | 64        |
| Discusión .....   | 70        |
| III. Distribución de los haplogrupos.....                   | 72        |
| Resultados .....  | 74        |

|  |            |
|--|------------|
| Accidente cerebrovascular .....                        | 74         |
| Infarto de miocardio.....                              | 75         |
| Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio ..... | 76         |
| Enfermedad cardiovascular global.....                  | 77         |
| Discusión .....  | 78         |
| IV. Perfil y carga mutacional.....                     | 80         |
| Resultados .....                                       | 81         |
| Accidente cerebrovascular .....                        | 81         |
| Infarto de miocardio.....                              | 85         |
| Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio ..... | 89         |
| Enfermedad cardiovascular global .....                 | 93         |
| Discusión .....  | 97         |
| Distribución por regiones de las variantes.....        | 97         |
| Carga mutacional ajustada.....                         | 101        |
| V. Variación mitocondrial por posición .....           | 104        |
| Resultados .....                                       | 106        |
| Accidente cerebrovascular .....                        | 106        |
| Infarto de miocardio.....                              | 110        |
| Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio ..... | 111        |
| Enfermedad cardiovascular global.....                  | 115        |
| Discusión .....  | 117        |
| Variantes de la región no codificante .....            | 118        |
| Variantes de los complejos de la OXPHOS .....          | 119        |
| Variantes de los genes de tRNA .....                   | 120        |
| Variantes de los genes de rRNA .....                   | 121        |
| VI. Número de copias de mtDNA .....                    | 122        |
| Resultados .....                                       | 124        |
| Accidente cerebrovascular.....                         | 124        |
| Infarto de miocardio.....                              | 125        |
| Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio ..... | 125        |
| Enfermedad cardiovascular global.....                  | 125        |
| Discusión .....  | 127        |
| <b>Consideraciones finales .....</b>                   | <b>129</b> |
| <b>Conclusiones .....</b>                              | <b>134</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>                               | <b>138</b> |
| <b>Anexo .....</b>                                     | <b>171</b> |



# Introducción





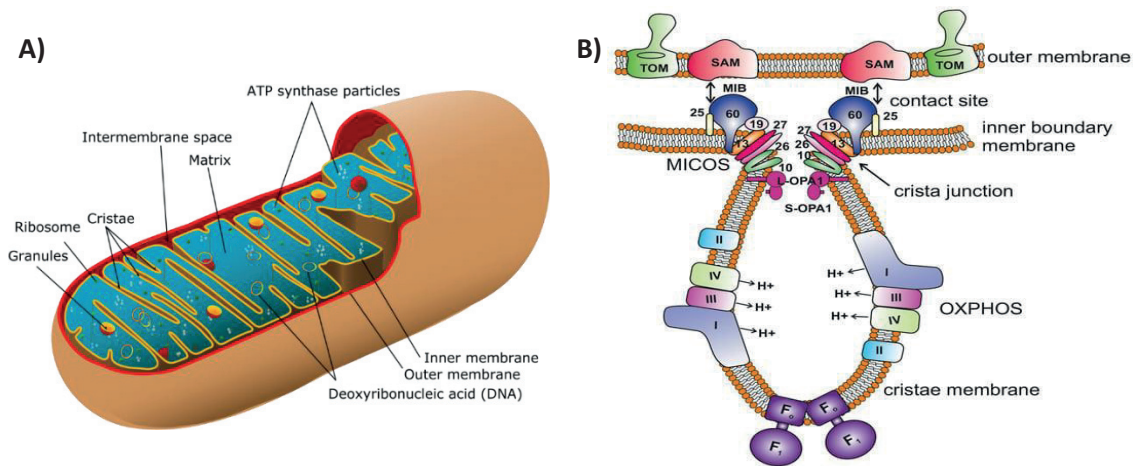
## La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular que se encuentra en el citoplasma de casi todas las células humanas. Su nombre proviene del griego *mito* (hilo) y *chondros* (gránulo) y juega un papel esencial en el metabolismo celular (X. Yang et al., 2020). Las mitocondrias tienen un tamaño que oscila entre los 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro hasta 10  $\mu\text{m}$  de longitud, y el número de mitocondrias por células es variable y está asociado a las necesidades energéticas de cada tipo celular (Moreno-Loshuertos & Fernández-Silva, 2021).

Este orgánulo consta de una estructura formada por 2 membranas (bicapas lipídicas). La membrana externa separa la mitocondria del citosol, y la interna delimita los 2 compartimentos mitocondriales, el espacio intermembranoso y la matriz mitocondrial (Figura 1A). El sello de identidad de esta estructura son las invaginaciones de la membrana interna llamadas crestas. Recientemente se ha descrito un 'sitio de contacto mitocondrial y sistema organizador de crestas' (MICOS) en la membrana mitocondrial interna, crucial para la formación y el mantenimiento de estas crestas (Figura 1B). La membrana que forma estas crestas mitocondriales presenta una estructura y función diferente al resto de la membrana interna, que transcurre paralela a la externa (Anand et al., 2021). Las crestas mitocondriales pueden variar tanto en forma, tamaño y densidad y están constantemente en remodelación para adaptarse a las cambiantes demandas energéticas celulares, puesto que en ellas se encuentran los complejos de la cadena de transporte de electrones. La membrana mitocondrial externa es muy porosa, pero el paso de moléculas pequeñas a través de la membrana interna está altamente regulado e involucra más de 100 transportadores que controlan el intercambio entre la matriz interna mitocondrial y el citosol. Esta compartimentalización es clave para la función mitocondrial.

Esta estructura probablemente es herencia de su origen endosimbionte (Sagan, 1967). La teoría endosimbionte plantea que tanto las mitocondrias como los plastidios de las células eucariotas fueron anteriormente formas de vida procariotas libres ( $\alpha$ -proteobacterias y cianobacterias respectivamente). Estas células procariotas en algún momento fueron fagocitadas por células eucariotas, y, en lugar de ser digeridas, establecieron una relación dependiente con ésta (ganando por parte de una la capacidad de utilizar oxígeno para producir energía y protección contra depredadores por parte de la otra). El debate sobre el tipo preciso de bacteria que formó la primera mitocondria aún continúa, pero la mayoría de los estudios muestran evidencias de que se trataba de una alfa-proteobacteria relacionada con la *Rickettsia* moderna (Douglas, 1998; Gray, 1989; McBride, 2018).

El ciclo vital de este orgánulo citoplasmático implica 3 procesos: dinámica mitocondrial, autofagia selectiva mitocondrial (mitofagia) y biogénesis mitocondrial. Mediante la dinámica mitocondrial, las mitocondrias pueden compartir o diluir componentes y también segregar unidades mitocondriales disfuncionales para ser degradadas por mitofagia (Liesa et al., 2009). Durante la degradación de algunas mitocondrias se activa la biogénesis mitocondrial para mantener la población de mitocondrias y la homeostasis (Palikaras et al., 2015). Además, la biogénesis mitocondrial responde a las demandas energéticas celulares y a factores ambientales como el frío y la hipoxia (Gureev et al., 2019).



**Figura 2.A)** Representación esquemática de una mitocondria. Fuente: <https://teachmephysiology.com/histology/cell-structures/mitochondria/>. **B)** Reguladores clave de la organización de las crestas mitocondriales, incluyendo el MICOS. Fuente: Anand et al., 2021.

**La dinámica mitocondrial (DMt)** hace referencia a la habilidad de dos mitocondrias de fusionarse entre ellas (fusión) o de una mitocondria para dividirse en dos mitocondrias hijas (fisión). La morfología y el tamaño mitocondrial dependen de los eventos de fusión-fisión mitocondriales. Cambios en la DMt regulan *outputs* bioenergéticos, incluyendo el ritmo/velocidad de respiración, el gasto energético, la síntesis de ATP y también la apoptosis junto a la segregación y eliminación de unidades mitocondriales disfuncionales por mitofagia (Sheridan & Martin, 2010; Westermann, 2012).

La fisión mitocondrial es promovida por la proteína DRP1, que se localiza en el citoplasma, pero puede translocarse a la mitocondria mediante su unión a las proteínas receptoras mitocondriales FIS1, MFF, MiD49 y MiD51, las cuales se localizan en la membrana externa de la mitocondria (Losón et al., 2013). La fusión mitocondrial es dependiente de MFN1 y MFN2, localizadas en la membrana mitocondrial externa y de OPA1, localizada en la membrana mitocondrial interna (Liesa et al., 2009). Frecuentemente, un evento de fusión es seguido de un evento de fisión generando una mitocondria hija hiperpolarizada y otra despolarizada. La unidad despolarizada pierde OPA1, MFN1 y MFN2 y consecuentemente su capacidad de fusionarse, volviéndose una diana para la degradación por mitofagia; mientras que la unidad hiperpolarizada permanece en el citoplasma y puede fusionarse de nuevo. De esta manera, las células mantienen una red mitocondrial activa, sana y funcional (Twig et al., 2008).

**La autofagia mitocondrial selectiva o mitofagia** es un tipo de macroautofagia que lleva a las mitocondrias hasta los lisosomas para su degradación. La mitofagia se inicia con la formación de un fagóforo de doble membrana que se elonga y cierra para generar un autofagosoma maduro de doble membrana que envuelve la mitocondria. Seguidamente, los autofagosomas se fusionan con lisosomas para degradar su contenido (Youle & Narendra, 2011). La mitofagia permite la retirada de mitocondrias disfuncionales, despolarizadas y/o dañadas para el *turnover* mitocondrial, el control de las ROS y para la depuración mitocondrial programada observada en la eritropoyesis (Schweers et al., 2007) y en linfocitos T maduros (Pua et al., 2009). Este proceso también es esencial para la eliminación de las mitocondrias provenientes del espermatozoide en el ovocito fertilizado (Pickles et al., 2018). En este sentido, la célula presenta mitofagia basal, mitofagia inducida y mitofagia programada.

El proceso de mitofagia requiere 2 sistemas: la maquinaria autofágica central, común en todos los tipos de autofagia; y los receptores y adaptadores mitocondriales, un set específico de proteínas mitocondriales y/o citosólicas necesitadas para el ensamblaje de la mitocondria con la maquinaria autofágica central. Esta maquinaria está compuesta de proteínas ATG que se encuentran tanto en levaduras como en mamíferos, indicando que la autofagia es un proceso evolutivamente conservado (Ashrafi & Schwarz, 2013).

La dinámica mitocondrial y las vías de mitofagia parecen no tener funciones redundantes y poder actuar de manera cooperativa, dotando a la célula de múltiples mecanismos para eliminar mitocondrias dañadas en diferentes circunstancias (Elorza & Soffia, 2021). De hecho, se ha observado que la proteína de mitofagia FUNDC1 interactúa con las proteínas de DMt DRP1 o OPA1 para coordinar la fisión-fusión mitocondrial y la mitofagia. En momentos de estrés mitocondrial, la interacción FUNDC1-OPA1 es desestimada, promoviendo la translocación de DRP1 a la mitocondria para la fisión y una nueva asociación FUNDC1-DRP1 para mitofagia. Esto revela la complejidad e importancia que tiene tanto la dinámica mitocondrial como la mitofagia en la fisiología celular.

La **biogénesis mitocondrial (BMT)** se inicia cuando las células requieren de un mayor número de mitocondrias para cumplir con la demanda energética celular o para volver a la situación inicial después de procesos de mitofagia. Actualmente no se comprenden bien los procesos que la controlan, sin embargo, se sabe que la BMT comprende cuatro procesos independientes: replicación del mtDNA, transcripción del mtDNA, traducción de proteínas y biogénesis de la membrana mitocondrial; los cuales no están necesariamente sincronizados, añadiendo más complejidad y capacidad de regulación a la mitocondria. En peces aclimatados al frío, se ha observado que las mitocondrias son capaces de remodelarse de manera diferente en función de las demandas de ATP, oxígeno o de ambas. Bajo demanda de oxígeno, se incrementa la biogénesis de membrana incrementando el volumen/masa mitocondrial pero no la densidad de proteínas OXPHOS. Tener membrana extra mejora la difusión de oxígeno. Bajo demanda de ATP, la mitocondria incrementa la densidad de OXPHOS sin incrementar su volumen. En el caso de demanda de ambos, se incrementa tanto la densidad proteica como la membrana (O'Brien, 2011). Por otro lado, se ha descrito que la replicación del mtDNA es controlada por el daño oxidativo en la región del *D-Loop* que favorece que TFAM se una al mtDNA para la replicación. Este daño oxidativo puede ser causado por hipoxia, relacionando así la falta de oxígeno con la replicación del mtDNA (Pastukh et al., 2016).

## Función mitocondrial

La función principal de la mitocondria es la de proveer la energía suficiente para cubrir las necesidades energéticas del organismo, especialmente la de aquellos órganos con más demanda como son el sistema nervioso, el músculo esquelético y cardíaco, los riñones y el sistema endocrino (Wallace, 2005). Esta energía se produce en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que se lleva a cabo en la cadena de transporte de electrones (ETC) localizada en las crestas mitocondriales (Figuras 1B y 2).

El proceso empieza con la obtención de acetil-CoA a partir de la glicólisis de carbohidratos y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Posteriormente, este acetil-CoA es metabolizado en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos generando  $\text{CO}_2$  y átomos de hidrógeno. Estos átomos de hidrógeno y otros procedentes de otras vías metabólicas, se unen a moléculas de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{FAD}$

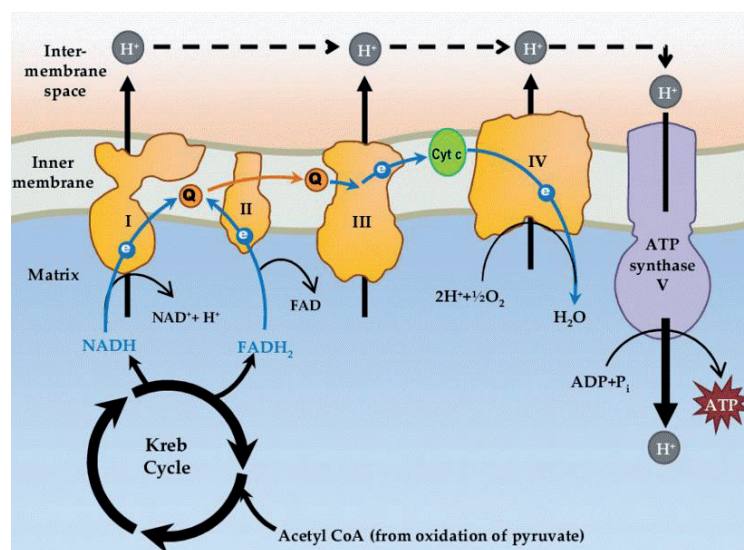
## Introducción

produciendo  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$ , las cuales son esenciales para el funcionamiento de la cadena respiratoria.

Durante la fosforilación oxidativa, la molécula de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  es oxidada por el Complejo I (una  $\text{NADH}$  deshidrogenasa) de la ETC y los electrones resultantes son transportados hasta la coenzima Q10 (CoQ10) a través del mono nucleótido flavina (FMN) y los centros Hierro-Azufre (Fe-S) presentes en el Complejo I. A su vez el Complejo II, una succinato deshidrogenasa, oxida el  $\text{FADH}_2$  y los electrones resultantes son transportados a la misma coenzima Q10 mediante la enzima TCA. En la siguiente fase del proceso los electrones de la coenzima Q10 pasan al Complejo III a través del citocromo b, el citocromo c1 y centros Fe-S. Una vez en el complejo III, los electrones son transferidos al citocromo c y de este pasan al complejo IV, constituido por una citocromo c oxidasa.

Finalmente, los electrones son transferidos a través de los centros de cobre (Cu) y de los citocromos a y a3, donde se combinan con una molécula de  $\text{O}_2$  para generar  $\text{H}_2\text{O}$ . La energía liberada en esta transferencia de electrones se utiliza para introducir protones desde el interior de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranoso a través de los complejos I, III, y IV.

El gradiente electroquímico resultante fuerza a los protones a volver a la matriz mitocondrial a través del canal de protones del complejo V que, al ser una ATP sintasa, aprovecha la energía derivada del movimiento de protones para generar ATP.



**Figura 3.** Representación gráfica de todos los complejos que forman parte de la OXPHOS y cadena de transporte de electrones. Fuente: Yusoff et al., 2015.

Además de generar energía en forma de ATP, la mitocondria regula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos, los cuales, a su vez se encargan de: a) modular vías metabólicas tanto celulares como mitocondriales; b) controlar el estado REDOX de la célula que regula un gran conjunto de reacciones enzimáticas celulares y de factores de transcripción vía; y c) regular la producción mitocondrial de ROS, que es una señal de transducción y la mayor fuente de estrés oxidativo (pudiendo activar la respuesta inmune innata mediante la señalización NF- $\kappa$ B).

En momentos de estrés ( $\text{Ca}^{2+}$  y ROS elevados, sin nucleótidos adenina y potencial de membrana reducido), se puede activar el poro de permeabilidad transitoria (mtPTP) iniciando con ello la apoptosis y necrosis.

En la mitocondria también se desarrollan importantes rutas metabólicas como el ciclo de la urea, el ciclo de los ácidos carboxílicos, la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos y la biosíntesis de las pirimidinas (McBride et al., 2006).

Las mitocondrias son orgánulos con gran capacidad para adaptarse a los microtúbulos de manera que pueden desplazarse a través del citoplasma adquiriendo la morfología y localización más eficiente para responder a las demandas energéticas del tejido en el que se encuentran (Tilokani et al., 2018). En las neuronas, que tienen grandes extensiones citoplasmáticas, el tráfico mitocondrial aumenta las posibilidades de interacción entre mitocondrias y otros orgánulos celulares como el retículo endoplasmático y el citoesqueleto mediante movimientos de fusión/fisión. En cambio, en los cardiomiocitos adultos, las mitocondrias forman una red fija que rodea los miofilamentos contráctiles que controlan las bases de los mecanismos de contracción de las fibras de músculo cardíaco (Dorn, 2019).

## El genoma mitocondrial

El pasado de la mitocondria como organismo autónomo no sólo puede explicar su estructura, sino que también explicaría el hecho de que posea su propio genoma. Un genoma donde los genes se encuentran uno a continuación del otro, sin intrones y donde únicamente un 7% de la molécula se corresponde con regiones no codificantes.

El DNA mitocondrial (mtDNA) se localiza en la matriz de la mitocondria, junto con toda la maquinaria necesaria para replicarlo, transcribirlo y traducirlo. No obstante, las mitocondrias no son autónomas y dependen del genoma nuclear para poder expresar su sistema genético (Sepuri et al., 2017).

El mtDNA es una molécula circular de doble cadena y 16569 pares de bases (bp) en la que se diferencian 2 regiones: la región codificante (CR, coding region) y la región no codificante (NCR, non coding region) (Nicholls & Minczuk, 2014) (Figura 3). Las dos cadenas del mtDNA reciben el nombre de cadena L (ligera o *light*) y cadena pesada H (pesada o *heavy*) atendiendo a su coeficiente de sedimentación. La cadena pesada es rica en G, mientras que el contenido de G de la cadena ligera es significativamente menor, y es rica en C.

### **Región codificante**

En la CR se encuentran 37 genes desprovistos de intrones y distribuidos de forma continua, que codifican: 13 subunidades de los complejos enzimáticos que participan en la OXPHOS, 22 RNAs de transferencia (tRNAs) y 2 RNAs ribosómico (rRNAs) (Anderson et al., 1981). Los trece polipéptidos que forman parte del sistema OXPHOS son:

- Siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (Complejo I): ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6.
- Tres subunidades de la citocromo c-oxidasa (Complejo IV): CO, COII y COIII.
- Una subunidad de la citocromo b oxidoreductasas (Complejo III): CYB.
- Dos subunidades de la ATP sintetasa (Complejo V): ATP6 y ATP8.

En la cadena pesada es donde se codifica la mayor parte de la información (los dos rRNA, catorce tRNAs y doce subunidades), mientras que la cadena ligera contiene únicamente la información genética para un polipéptido (ND6) y ocho tRNAs (P, E, Q, A, N, C, Y, S) y el origen de replicación de la cadena ligera (OL) (D'Souza & Minczuk, 2018). Las 87 subunidades restantes de los complejos I, III, IV y V, junto con el Complejo II (succinato deshidrogenasa) al

completo, y 1500 proteínas que tienen su función en la mitocondria están codificadas por genes nucleares.

**Región no codificante: regiones reguladoras y el D-Loop**

El genoma mitocondrial humano carece de intrones y contiene muy pocas regiones no codificantes. La NCR contiene 1122bp y está localizada entre los genes tRNA<sup>Pro</sup> (posiciones: 15956-16023) y tRNA<sup>Phe</sup> (posiciones: 577-647). Esta NCR, conocida también como región control, contiene casi todos los elementos reguladores del genoma mitocondrial (Jemt et al., 2015; Nicholls & Minczuk, 2014):

- El origen de replicación de la cadena pesada OH
- Los promotores de transcripción para las cadenas ligera y pesada (LSP y HSP1). Hay un tercer promotor (HSP2) que se encuentra fuera de la NCR pero cerca del gen tRNA<sup>Phe</sup>.
- Tres bloques de secuencia conservados (CSBs): relacionados con la regulación de la replicación.
- Una tercera cadena de DNA lineal de aproximadamente 650 nucleótidos conocida como 7SDNA, debido a sus propiedades de sedimentación. La presencia de esta cadena causa una conformación abierta del mtDNA que parece contribuir a la regulación de la transcripción (Gustafsson et al., 2016). Teniendo evidencias de que la replicación y transcripción del mtDNA son procesos mutuamente exclusivos, el 7SDNA podría estar formando parte del mecanismo de regulación que evita la colisión entre la maquinaria de replicación y de transcripción (que se ensamblan en la región control) (Podlesniy et al., 2019).
- La secuencia asociada a la terminación (TAS): donde se acaba la replicación durante la síntesis del 7S DNA formando el D-Loop.

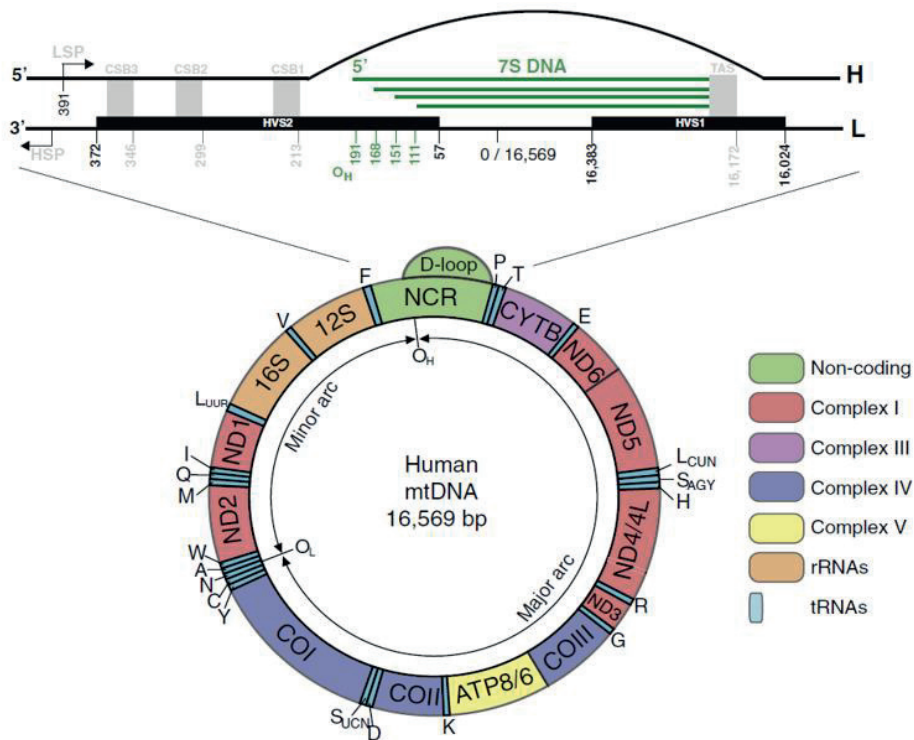


Figura 4. Esquema del genoma mitocondrial humano. Fuente: Nicholls and Minczuk 2014.



La secuencia completa del genoma mitocondrial humano -perteneciente a un individuo de origen europeo- se publicó por primera vez en 1981 (Anderson et al., 1981). Desde ese momento se emplea como secuencia consenso (CRS o *Cambridge Reference Sequence*), con la que se comparan las diferencias encontradas en otras secuencias mitocondriales. Un reanálisis de esta secuencia ha revelado la existencia de 4 errores y de 7 polimorfismos poco comunes en la publicación original, dando lugar a una nueva secuencia consenso revisada (rCRS) (Turnbull et al., 1999).

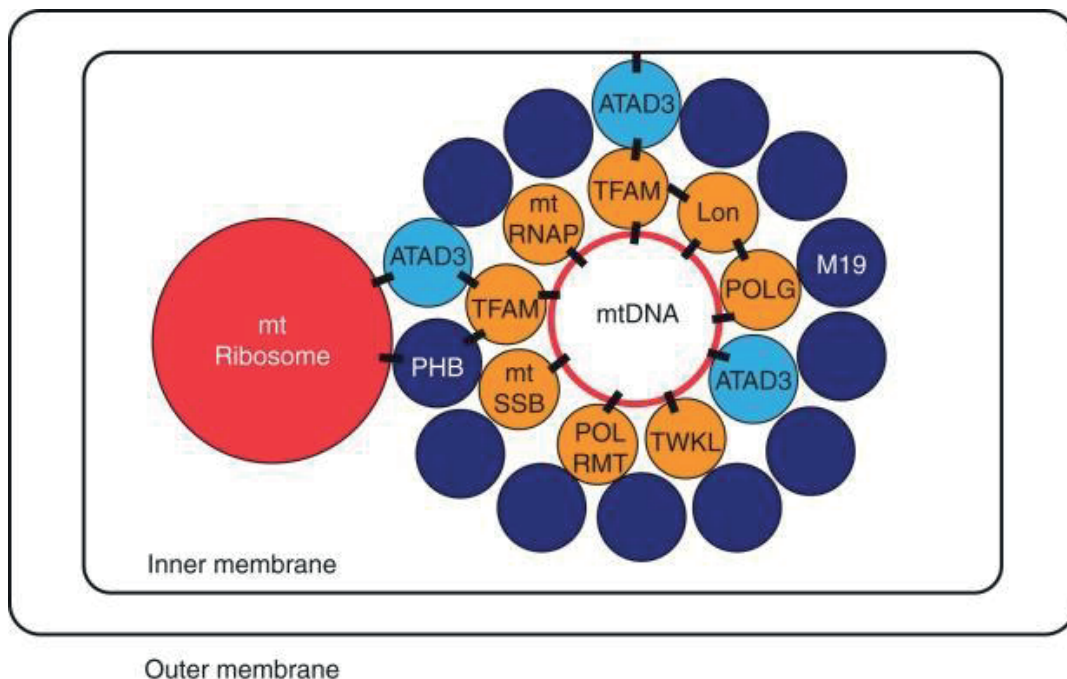
### I. Organización genómica

El genoma mitocondrial (mtDNA) humano es una molécula circular, de doble cadena localizado en la matriz mitocondrial.

#### Estructura del nucleoide

En la mitocondria, el mtDNA se organiza en complejos proteínicos denominados nucleoides. Estos, están implicados en diversos procesos mitocondriales y aunque su estructura lleva más de una década siendo investigada, su composición proteica exacta y organización aún no se conocen completamente (Figura 4).

Los nucleoides mitocondriales miden unos  $\approx 100\text{nm}$  de diámetro y tienen una estructura en capas (Kukat et al., 2011; Lee & Han, 2017). Las proteínas que se encuentran interactuando con el genoma mitocondrial formarían el núcleo o *core* y están involucradas en los procesos de replicación, reparación y transcripción del mtDNA. La capa más externa del nucleoide contiene las proteínas relacionadas con el procesamiento del RNA y la traducción. A parte, los nucleoides deben tener proteínas especiales para unirse a la membrana mitocondrial interna (actualmente, esta actividad se atribuye a la proteína ATAD3).



**Figura 5.** Interacciones en el nucleoide mitocondrial. En naranja los factores que forman parte del core (y se unen al mtDNA); en azul, los factores periféricos (no interactúan con el mtDNA directamente). Fuente: Gilkerson et al., 2013.

Debido a la dificultad tecnológica que supone identificar los componentes del nucleoide y a los resultados contradictorios de diversos grupos de investigación (Hensen et al., 2014), se considera que las siguientes proteínas se encuentran en el *core* del nucleoide y están relacionadas con la replicación del mtDNA:

- La RNA polimerasa POLRMT: funciona como primasa en el inicio de la replicación y como transcriptasas.
- El factor de transcripción TFAM (factor de transcripción mitocondrial A)
- Los factores de transcripción TFB1M/TFB2M
- El factor de elongación de la transcripción mitocondrial TFEM: esencial para el funcionamiento de POLRMT.
- La DNA polimerasa  $\gamma$  (POLG): que además de la actividad DNA polimerasa tiene actividad exonucleasa 3'-5', retrotranscriptasa y 5'-3' desoxirribofosfatasa.
- La helicasa de DNA *Twinkle*
- Las topoisomerasas I: relajan en DNA superenrollada generado por el movimiento de la horquilla de replicación y separan catenanos.
- El mtSSB: ortólogo mitocondrial de la proteína que se une a las regiones de DNA de cadenas sencilla producidas durante la replicación.
- La RNasa H1: elimina los cebadores (*primers*) de RNA sintetizados por POLRMT.
- La DNA ligasa 3: une fragmentos de Okazaki y participa en la reparación de mtDNA.

Mediante estudios de microscopia se ha podido determinar que la mayoría de nucleoides contienen una única molécula de mtDNA. Sin embargo, se ha sugerido que el contenido de DNA en un nucleoide puede variar en diferentes circunstancias, demostrándose por ejemplo que el número de moléculas de mtDNA por nucleoide era más elevado en células germinales que en células somáticas (Van Blerkom, 2011).

Tanto el estado como la cantidad de mtDNA están muy influenciados por TFAM. Esta proteína identificada inicialmente como un factor de transcripción mitocondrial, también puede unirse de manera inespecífica a lo largo de la molécula de DNA mitocondrial. Esta interacción provoca la torsión del mtDNA formando un bucle, aumentando su compactación y volviéndolo inaccesible para las enzimas encargadas de la replicación. *In vitro* se ha observado que un aumento en la concentración de TFAM aumenta drásticamente el número de moléculas de mtDNA (mtDNA-CN) supercompactadas (Farge et al., 2014). Se puede asumir que en los nucleoides compactados, el mtDNA está inactivo, mientras que, en los menos compactados, éste se está replicando o transcribiendo. Por tanto, TFAM puede ser considerado el principal regulador del estado del mtDNA en los nucleoides, teniendo un fuerte impacto en el número de moléculas disponibles para la replicación, la reparación o la expresión mitocondrial (Falkenberg, 2018).

Normalmente, una célula contiene diversas mitocondrias, y cada una de ellas puede contener decenas o centenares de nucleoides. Por consiguiente, cada célula presenta entre 1000-10000 copias de mtDNA (Farge et al., 2014).

Aún no está claro si el intercambio de mtDNA entre nucleoides es posible dado que sólo se ha descrito en un artículo, en el cual también se observaba recombinación del mtDNA (D'Aurelio et al., 2004). Las células podrían utilizar este mecanismo para seleccionar genomas mitocondriales sin mutaciones deletéreas, ante la presencia de copias tanto mutadas como salvajes. Sin embargo, este mecanismo no se ha confirmado en estudios posteriores (Gilkerson et al., 2008; Kukat et al., 2011).

## II. Replicación, transcripción y traducción

### Replicación del genoma mitocondrial

A diferencia del genoma nuclear, el mtDNA se replica de forma continua, independientemente del ciclo celular (replicación relajada) y tiene una vida promedio de entre 7 y 10 días en función del tipo celular (Stewart & Chinnery, 2021). El mecanismo exacto de replicación que utiliza el mtDNA es un asunto controvertido. Durante décadas se consideró que la replicación seguía un modelo de desplazamiento de cadenas, con un origen de replicación para cada una de las cadenas del genoma mitocondrial. Más recientemente, se ha propuesto un modelo alternativo en el cual solo existiría un único origen de replicación. De este modelo alternativo han surgido dos variantes, el modelo conocido como modelo de replicación acoplada y el modelo RITOLS (por sus siglas en inglés *RNA Incorporated Through Out The Lagging Strand*; en castellano: incorporación de ribonucleótidos a lo largo de la cadena retrasada).

En todos los modelos de replicación del genoma mitocondrial (Figura 5), ésta empieza en el origen de replicación de la cadena pesada (OH) o cerca de este. En muchas moléculas, la replicación se acaba a unas 650bp del OH, en la región conocida como TAS; y en este caso, únicamente se sintetiza el 7S DNA, dando lugar a la formación de una estructura de 3 cadenas en la NCR llamada *Displacement Loop (D-Loop)* (Arnberg et al., 1971). El porcentaje de moléculas de mtDNA con *D-Loop* difiere en los diferentes estudios realizados, y a pesar de describirse hace más de 40 años, sus funciones son aún bastante desconocidas (Nicholls & Minczuk, 2014).

El mecanismo por el cual la replicación acaba en la TAS no está muy bien entendido, y se desconoce su regulación. La única enzima que se sabe que está relacionada con esta regulación es la helicasa *Twinkle*; en condiciones normales se ha visto que POLG se detiene en el 3'-terminal del *D-Loop* y la cantidad de helicasa *Twinkle* asociada al mtDNA en ese momento es baja. En el momento en el que la cantidad de moléculas de mtDNA en la mitocondria es baja y se necesita la replicación de copias completas, la cantidad de *Twinkle* asociada al genoma mitocondrial se incrementa rápidamente, y la de 7S DNA disminuye (Jemt et al., 2015). Por lo tanto, *Twinkle* de alguna manera aun por describir, controla el número de copias de mtDNA.

### **Modelo de desplazamiento de cadenas**

Este modelo fue propuesto por Jarome Vinograd y colaboradores en 1972, tras la observación mediante microscopía electrónica de estructuras con regiones de cadena sencilla extendidas.

En base a este modelo, la replicación del genoma mitocondrial es unidireccional, asimétrica y asincrónica, y requiere dos orígenes de replicación diferentes (uno para cada cadena de DNA).

La replicación se inicia en OriH, y durante la fase inicial, la síntesis de la cadena pesada ocurre sin síntesis simultánea de la cadena ligera. Durante este paso, la helicasa TWINKLE se mueve en la cadena H parental por delante de la POLG. La cadena parental desplazada es envuelta por mtSSB, de manera que queda protegida de la unión inespecífica de POLRMT (Fusté et al., 2010). Una vez la síntesis de la cadena H ha progresado aproximadamente 11 kb, la maquinaria de replicación pasa el OriL. En este punto, la cadena pesada parental se encuentra en forma de cadena sencilla y se pliega para formar una estructura *stem-loop*, el cual sirve como punto de partida de POLRMT para sintetizar un *primer* de 25 nucleótidos. Posteriormente la POLRMT es sustituida por POLG y da inicio a la síntesis de la cadena ligera (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

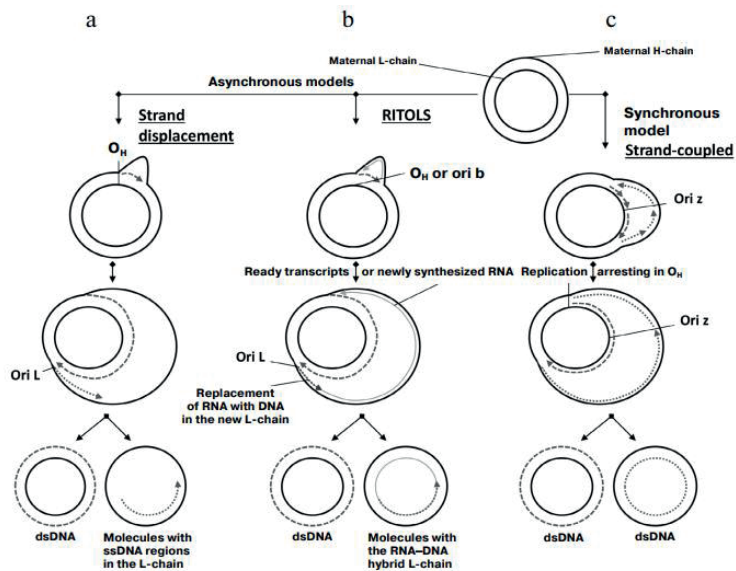
### Modelo de replicación acoplada

El grupo de Holt observó, mediante estudios con electroforesis bidireccional en agarosa, la presencia de estructuras características de una replicación bidireccional sincrónica (Holt et al., 2000), además de la presencia de otros orígenes de replicación (Bowmaker et al., 2003).

Basándose en estos hallazgos, se propuso un modelo de replicación bidireccional a partir de estos orígenes de replicación, con el consiguiente movimiento sincrónico de 2 horquillas de replicación conocido como **modelo acoplado o strand-couple model** (Holt & Jacobs, 2014). Cada horquilla tiene su cadena líder y su cadena retardada (sintetizada como fragmentos de Okazaki). De manera similar a la replicación del genoma bacteriano, la replicación según este modelo ocurre inicialmente en 2 direcciones sincrónicamente y luego en una dirección.

### Modelo RITOLS

Posteriormente, se encontraron moléculas de RNA complementarias al DNA unidas a los productos intermedios de la replicación del mtDNA, además de ribonucleótidos incorporados en la cadena ligera (M. Y. Yang et al., 2002). En estos nuevos descubrimientos se basa el tercer modelo de replicación mitocondrial, **RITOLS** (Yasukawa et al., 2006). Según este modelo, la replicación es un proceso asincrónico en el cual la cadena retardada se sintetiza inicialmente como RNA para posteriormente ser reemplazado por DNA. La replicación empezaría en la NCR, en el OH o en el ori b, que se encuentra en las proximidades. Seguidamente se procedería de manera unidireccional y asincrónica, sintetizándose primero la cadena pesada como DNA mientras que la cadena ligera se sintetiza inicialmente como RNA. La cuestión continúa siendo la posición del genoma en la cual el RNA de la cadena L empieza a reemplazarse con DNA. Parece que en algunos casos se sintetiza la cadena completa de RNA y luego se reemplaza por DNA, en otros el reemplazo empieza en diversos loci, y en la mayoría, empieza desde el OL.



**Figura 6.** Representación esquemática de los 3 modelos de replicación de DNA principales en mamíferos: a) Modelo de desplazamiento de cadenas; b) Modelo RITOLS; c) Modelo acoplado. La línea negra sólida representa la cadena de mtDNA materna, la línea discontinua la cadena pesada recién sintetizada y la línea de puntos es la cadena ligera de nueva síntesis. En gris se encuentra el RNA de la cadena ligera. Fuente: Zinovkina, 2019.

En los últimos años se ha ido acumulando información sobre la replicación mitocondrial, pero aún se han de refinar los mecanismos de replicación descritos. Parece posible que no exista un solo mecanismo de replicación para el genoma mitocondrial, sino que, dependiendo de las condiciones de la mitocondria, este proceso se realice de manera sincrónica o asincrónica y con o sin la implicación del RNA.

**Expresión mitocondrial**

La expresión génica mitocondrial es central en el mantenimiento de la homeostasis celular. El control de la expresión mitocondrial es único y sus componentes tienen un origen dual: mitocondrial (todos los RNAs) y nuclear (todos los factores proteicos). La regulación de la síntesis y degradación de RNAs mitocondriales determina los niveles constantes de proteínas codificadas por el genoma mitocondrial permitiendo un control fino del metabolismo energético de la mitocondria. Defectos en la expresión génica mitocondrial pueden producir una disfunción en la cadena respiratoria resultando en un fenotipo de enfermedad multisistémica, afectando predominantemente al tejido muscular y neuronal.

El genoma mitocondrial completo es transcrito a partir de ambas cadenas como un transcrito policistrónico largo que requiere de varios pasos de procesamiento antes de que los RNAs individuales se vuelvan funcionales. Después del corte endonucleolítico del transcrito primario, los RNAs ribosomales pasan por modificaciones químicas antes de poder funcionar correctamente dentro del mitorribosoma, los tRNAs también pasan por un gran número de modificaciones químicas, además de más polimerización y aminoacilación, y los mRNAs son poliadenilados diferencialmente. Finalmente, mRNAs, tRNAs y los mitorribosomas se juntan en el aparato de traducción donde los factores de traducción dirigen la progresión de esta (Figura 6).

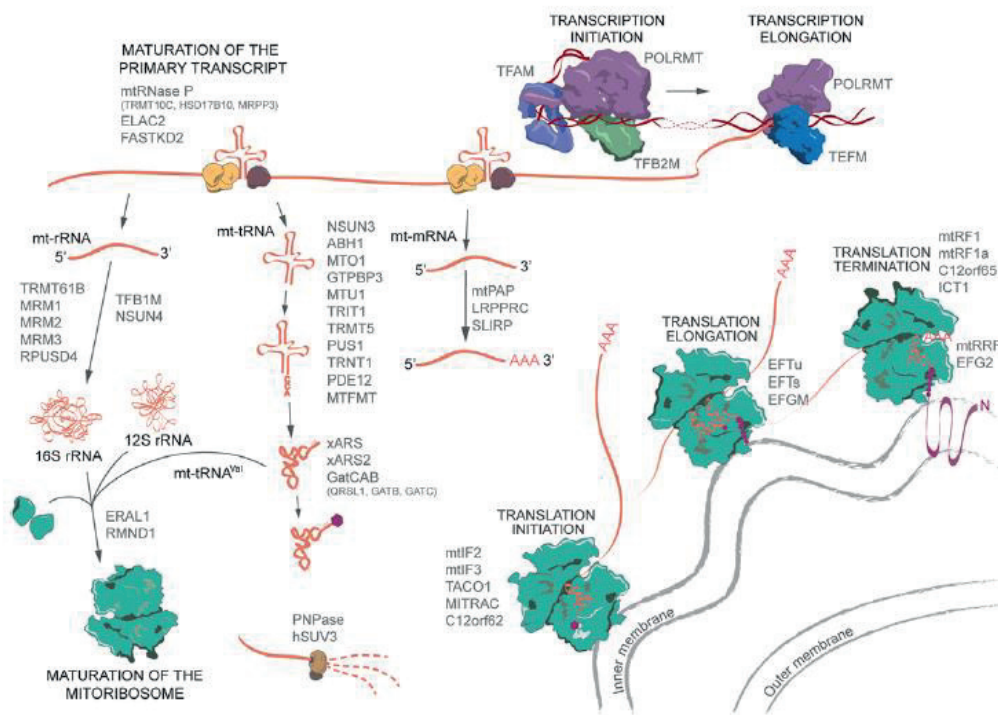


Figura 7. Resumen de la transcripción, procesamiento de RNA y traducción mitocondrial humanas. Fuente: D'Souza and Minczuk 2018.

### Transcripción mitocondrial

La transcripción del genoma mitocondrial se origina en la región no codificante que contiene los promotores tanto de la cadena ligera (LSP) como de la cadena pesada (HSP). El promotor LSP controla la transcripción de 8 tRNAs y el gen *MT-ND6*. En la cadena pesada, históricamente se han propuestos 2 promotores, donde el HSP1 produce un transcrito que contiene los tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Val</sup> y los dos rRNAs (12S y 16S), mientras que el HSP2 genera un transcrito que supone casi todo el genoma mitocondrial (D. D. Chang & Clayton, 1984; Montoya et al., 1982). Sin embargo, modelos animales y experimentos *in vitro* más recientes sugieren que la transcripción de la cadena pesada tiene lugar bajo el control de un solo promotor (Litonin et al., 2010; Terzioglu et al., 2013).

La transcripción en la mitocondria humana está dirigida por una RNA polimerasa dependiente de DNA llamada POLRMT (Ringel et al., 2011). POLRMT necesita proteínas auxiliares para poder llevar a cabo su función y reconocer regiones promotoras; estas proteínas auxiliares son TFAM y TFB2M. TFAM es una proteína de unión que participa en la activación de la transcripción. TFB2M actúa desnaturalizando el DNA durante el inicio de transcripción. En el complejo de inicio de la transcripción (tanto en HSP como en LSP), TFAM se une al DNA y recluta a POLRMT hacia el promotor y TFB2M induce la apertura del promotor modificando la estructura de POLRMT (Posse & Gustafsson, 2017).

Durante el proceso de elongación de la transcripción, es necesaria la participación del factor de elongación de la transcripción (TFEM)(Minczuk et al., 2011). Con frecuencia, la transcripción a partir de LSP termina prematuramente cerca del CSB2 generando una molécula que podría jugar un papel clave en la replicación del genoma mitocondrial (Wanrooij et al., 2010). TFEM estimula la procesividad de POLRMT y previene la inhibición del complejo de elongación en la CSB2 (Posse et al., 2015). Se ha propuesto este mecanismo como un interruptor de control entre la replicación y la transcripción.

El mecanismo de terminación de la transcripción en HSP aún no está claro. Se ha sugerido que el factor de terminación mitocondrial 1 (MTERF1) dobla el mtDNA conectando el sitio promotor de HSP1 y su aparente sitio de terminación tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> induciendo su final (Yakubovskaya et al., 2010). Sin embargo, estudios recientes con ratones modificados genéticamente con un *knockouts* del gen MTERF1 no muestran una alteración de los niveles basales de rRNA (Terzioglu et al., 2013).

La transcripción de ambas cadenas produce transcritos largos policistrónicos. Las secuencias de rRNA y la mayoría de proteínas están separadas por tRNAs, y la escisión nucleotídica de estos tRNAs libera los mRNAs y rRNAs (*tRNA Punctuation Model*)(Ojala et al., 1981). Este modelo, sin embargo, no explica todos los eventos de corte en el transcrito primario dado que no todos los mRNAs están inmediatamente flanqueados por tRNAs (Boehm et al., 2017).

### Traducción

La traducción mitocondrial incluye las etapas de iniciación, elongación, terminación y reciclado de ribosomas, y es más similar a la traducción procariota que no a la realizada por los ribosomas citoplasmáticos eucariotas (Koripella et al., 2019). En cada etapa, la síntesis de proteínas requiere una serie de factores mitocondriales, entre ellos, dos factores de iniciación (MTIF2 y MTIF3), tres factores de elongación (EFTU, EF-TS, and mtEF-G1), un factor de liberación (MTRF1L), y dos factores de reciclado de ribosomas (MRRF and EF-G2mt) (F. Wang

et al., 2021). Todos estos factores están codificados en el genoma nuclear y han de ser importados a las mitocondrias.

La traducción se lleva a cabo en ribosomas especializadas conocidas como mitorribosomas. En mamíferos los mitorribosomas consisten en una subunidad grande (formada por un 16S rRNA y 48 proteínas) y una subunidad pequeña (un 12S rRNA y 30 proteínas)(Aibara et al., 2020).

### III. Propiedades del mtDNA

#### Poliplasmia

Esta característica hace referencia al elevado número de copias de la molécula de genoma mitocondrial que existe en cada mitocondria y, por consiguiente, en cada célula, tejido o individuo. Una mitocondria puede contener entre 2 y 10 copias de mtDNA dando lugar a células con entre 1.000 y 10.000 moléculas de mtDNA (Cui et al., 2013), confirmando que existe una variación en el número de copias dependiendo del tejido (Tilokani et al., 2018). La poliplasmia del mtDNA ha permitido el estudio de características genéticas en situaciones en las que el material genético de partida es muy escaso y/o está muy degradado, lo que sucede con frecuencia en restos antiguos o en investigaciones forenses.

#### Herencia matrilineal

El mtDNA se transmite de forma no mendeliana por línea materna. Esto es debido a que el citoplasma celular del cigoto, que es donde se localizan estos orgánulos, proviene del óvulo. Los espermatozoides contienen un gran número de mitocondrias en la cola, pero estas son destruidas antes o durante el tercer clivaje embrionario, lo que ha llevado a pensar que hay un mecanismo que las reconoce y elimina (Hopkin, 1999; Kaneda et al., 1995; Sutovsky et al., 2000). Esto ha sido evidenciado mediante la detección de las mitocondrias durante el proceso de espermiogénesis, usando un anticuerpo específico que reconoce la ubiquitina; estas mitocondrias posteriormente son degradadas por el proteosoma 26S en el citoplasma del ovocito fecundado (Sutovsky et al., 1999). Una explicación interesante para la destrucción de las mitocondrias espermáticas es que estas pueden estar dañadas por el ROS generado en la espermatogénesis o durante el viaje de los espermatozoides, conteniendo mutaciones que podrían resultar deletéreas para el embrión. Otra explicación podría venir dada por la diferencia en el número de moléculas de mtDNA de cada origen; mientras que un óvulo maduro puede llegar a contener entre  $10^5$  y  $10^8$  copias un espermatozoide contiene únicamente alrededor de 100 (Cardona Maya & Cadavid, 2010).

Recientemente esa teoría se ha puesto en duda al documentarse 17 casos inéditos de herencia mitocondrial paterna (Luo et al., 2018). Estudios posteriores ha discutido estos hallazgos especulando que la aparente herencia biparental del mtDNA podría atribuirse a contaminación a la co-amplificación de NUMTs (Lutz-Bonengel & Parson, 2019; Vissing, 2019). Sin embargo, no hay experimentos directos que lo demuestren, de manera que no se pueden excluir casos de transmisión biparental del mtDNA (Zakirova et al., 2021). Aun así, se trataría de un evento raro y el mecanismo por el cual se llevaría a cabo aun es desconocido.

### **Tasa de mutación**

A pesar del papel importante que desempeña el genoma mitocondrial en la producción de energía celular, se ha observado que su tasa de mutación es hasta 100 veces más elevada que la del genoma nuclear. Esto se ha relacionado con las características del mtDNA y con el entorno que lo rodea, principalmente por ser altamente oxidativo (Richter et al., 1988) y la baja eficacia de los mecanismos de reparación mitocondriales. A estos factores, se les añadiría la elevada susceptibilidad del mtDNA de sufrir los efectos de la deriva genética, mecanismo mediante el cual las mutaciones que experimenta tienen una elevada probabilidad de fijación (Brown & Wallace, 1994). En la actualidad, diversos estudios han cuestionado estos mecanismos y sugieren que la alta tasa de mutación es una propiedad endógena de la replicación del genoma mitocondrial (Melvin & Ballard, 2017).

### **Heteroplasmia**

El concepto de heteroplasmia hace referencia a la presencia de tipos diferentes de mtDNA en la misma mitocondria, célula, tejido o individuo (Stewart & Chinnery, 2015). La presencia de un único tipo de genoma mitocondrial se denomina homoplasmia.

En sus inicios, se creía que la heteroplasmia en humanos estaba relacionada con enfermedades mitocondriales (Chinnery & Turnbull, 1999; Wallace, 1999) y que su porcentaje guardaba una relación directa con la severidad de la enfermedad en el individuo (penetrancia). Gracias a la mejora en los métodos de secuenciación se ha detectado que es mucho más frecuente de lo que se creía en un inicio (Floros et al., 2018) y que no necesariamente está relacionado con condiciones patológicas (Ramos et al., 2013). Además, mediante esta característica se ha podido poner en entredicho el dogma de la ausencia de recombinación en el genoma mitocondrial largamente debatido (Hagelberg, 2003; Schwartz & Vissing, 2002).

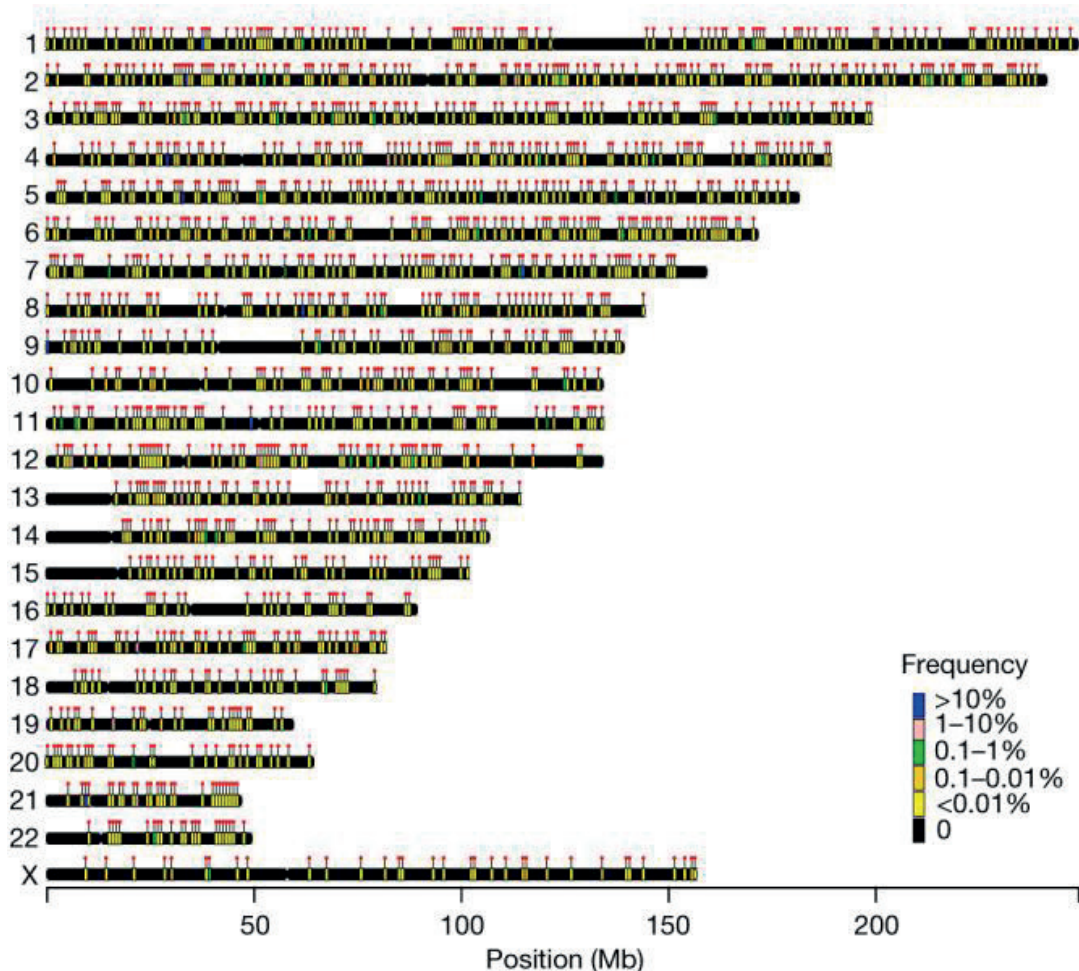
### **Inserciones de fragmentos de mtDNA en el genoma nuclear (NUMTs)**

A pesar de que el origen evolutivo concreto de la mitocondria continúa siendo debatido, la integración de dos organismos de vida independiente probablemente necesitara de una comunicación y coordinación dinámica entre ellos (Lane, 2017; Youle, 2019). Se estima que una parte considerable del genoma bacteriano original se ha perdido o ha sido trasladado al núcleo (Bock, 2017). Las secuencias mitocondriales que se han trasladado al genoma nuclear se conocen como NUMTs (*Nuclear Mitochondrial DNA segment/nuclear sequences of mitochondrial origin*) (Lopez et al., 1994; Timmis et al., 2004). Recientemente se ha demostrado que el proceso de formación de NUMTs aun continua en marcha, ocurriendo *de novo* en línea germinal en 1 de cada  $10^4$  nacimientos (W. Wei et al., 2022). Se han detectado 1.637 NUMTs diferentes hasta la fecha (Figura 7) y se ha observado que estas secuencias pueden representar hasta el 90% del tamaño del genoma mitocondrial (Ramos et al., 2011).

Mientras que la gran mayoría de NUMTs son polimorfismos benignos, hay un pequeño grupo de enfermedades humanas asociadas con ellos. La mayoría de estos casos se deben a la inserción del NUMT en una región codificante del nDNA alterando la función de ésta (Ahmed et al., 2002; Goldin et al., 2004).



Los NUMTs pueden presentar un problema metodológico en las tecnologías de secuenciación masiva, puesto que al basarse en secuencias cortas (*reads*) que se alinean con un genoma de referencia, en muchos casos, es difícil discernir si se trata de un NUMT o del mtDNA (Maude 2019). Una solución es eliminar los NUMTs aislando, amplificando y secuenciando el genoma mitocondrial de manera independiente (Duan et al., 2018; Weerts et al., 2018).



### Código genético mitocondrial

El código genético mitocondrial difiere del código genético universal en las siguientes ocasiones: a) en la mitocondria los codones AGA y AGG son una señal de STOP mientras que en el nuclear codifican el aminoácido Arginina (Arg); b) AUA codifica el aminoácido Metionina (Met) en el código mitocondrial e Isoleucina (Ile) en el universal; c) UGA codifica el aminoácido Triptófano (Trp) en la mitocondria y un codón STOP en el código universal (Aguilar et al., 2017).



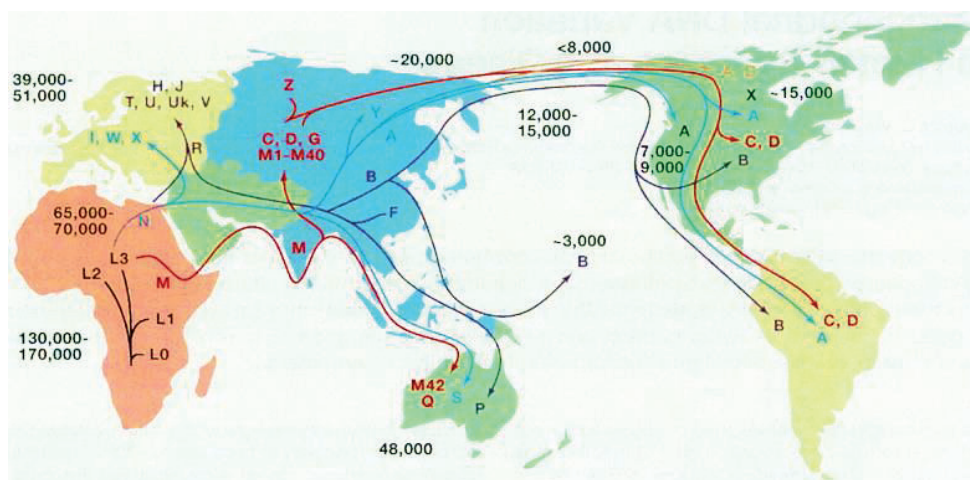
### El árbol filogenético mitocondrial

Gracias al análisis del genoma mitocondrial se ha estimado el origen del humano moderno hace alrededor de 300.000 años, y que la salida de África ocurrió hace aproximadamente 150.000 años, ambas fechas corroboradas por hallazgos arqueológicos (Cabrera, 2021).

El origen del árbol filogenético mitocondrial humano (Figura 9) se encuentra en África y consiste en un conjunto de haplogrupos estrechamente relacionados conocidos como macrohaplogrupo L. Dentro de este macrohaplogrupo se encuentra el haplogrupo L0, común en las poblaciones de Khoisánidos del sud de África, que sería el punto de partida para el resto de linajes mitocondriales (L1, L2, L3, L4, L5 y L6) que conforman el macrohaplogrupo L (<https://www.phylotree.org/tree/index.htm>). En 2022, se descubrió un nuevo Hg dentro del macrohaplogrupo L. Este haplogrupo, denominado L7, no había sido observado previamente debido a su rareza dado que su frecuencia es inferior al 2% en cualquier población (Maier et al., 2022). Del haplogrupo L3 surgieron los haplogrupos N y M hará unos 65.000-70.000 años y han sido individuos portadores de estos linajes los que abandonaron África para colonizar los demás territorios del planeta (Wallace, 2015).

El macrohaplogrupo M migró a la región tropical del sudeste asiático donde se dividió siguiendo 2 líneas de expansión diferentes. Una, hasta llegar a Australia, dando origen a los haplogrupos M42 y Q, y otra hacia el este y centro de Asia, con los haplogrupos C, D, G y M1-M20 (Marrero et al., 2016). A diferencia del macrohaplogrupo M, el N migró desde África directamente en 2 direcciones separadas: una va por el sudeste asiático hasta Australia donde da lugar al haplogrupo S y la otra migra a Asia central originando los haplogrupos A y Y (Fregel et al., 2015). En una segunda migración, el haplogrupo N se expandió hacia el centro de Europa originando los haplogrupos I, X y W; y hacia Oriente Medio donde originó el haplogrupo R, que posteriormente a parte lugar a los linajes que se extenderían por el resto de Europa (H, J, UK, T, U y V) se movió al sudeste asiático dando lugar a los haplogrupos B y F (Van Oven & Kayser, 2009).

La colonización de los territorios americanos se llevó a cabo por individuos portadores de los linajes A, B, C, D y X (Kivisild, 2015). La presencia únicamente de los haplogrupos A, C y D en el nordeste de la región siberiana sugiere que se produjeron 2 procesos migratorios distintos hacia América, el primero por la ruta del norte con los haplogrupos presentes en Siberia y el segundo por la ruta de la costa del Océano pacífico con los haplogrupos B y X.



**Figura 10.** Distribución de los diferentes haplogrupos mitocondriales humanos tras su origen en África. Fuente: Wallace 2015.

### Europa

Actualmente el 90% de la población europea presenta los macrohaplogrupos HV, U y JT (Macaulay et al., 1999; Rishishwar & Jordan, 2017; Torroni et al., 2000).

El macrohaplogrupo HV representa más del 50% de la población, y está compuesto por los haplogrupos H, V y HV. Entre ellos, el haplogrupo H está ampliamente distribuido y tiene la frecuencia más alta llegando al 45% en Europa, 20% en Turquía y el Cáucaso y 10% en los países del golfo (Roostalu et al., 2007). Está conformado por más de 90 subhaplogrupos (Van Oven & Kayser, 2009), y aunque a nivel global presenta una frecuencia bastante uniforme dentro de Europa, los dos principales subHg muestran un patrón diferente. El subhaplogrupo más frecuente es H1, seguido de H3 y ambos presentan picos de frecuencia en la península ibérica y regiones colindantes. Esto sugiere que el refugio Franco-Cantabro fue la fuente de las expansiones que poblaron el norte y centro de Europa tras el Último Máximo Glacial (Achilli et al., 2004). El haplogrupo V se encuentra en el 4% de la población, principalmente europea, aunque también en el norte de África (Coudray et al., 2009).

Los otros 2 macrohaplogrupos, JT y U representan el 40% de la población europea. El haplogrupo U se divide en varios subhaplogrupo que comprende el 20% de la población caucásica, mientras que el subhaplogrupo U5 y Uk abarcan el 9% (Montiel-Sosa et al., 2006). Este clado está ampliamente extendido desde Portugal hasta la India y el norte de África (Achilli et al., 2005). El macrohaplogrupo JT incluye los haplogrupo J y T (Ruiz-Pesini et al., 2004). El J se distribuye de manera más o menos uniforme por toda Europa encontrándose en el 9% de los europeos, y se divide en 2 subhaplogrupos principales, J1c y J2 (Carelli et al., 2006). Aun así, las frecuencias más elevadas del haplogrupo J se han observado en Arabia Saudí (21%). El haplogrupo T representa un 8% de la población, y se divide en 2 ramas principales (T1 y T2) que presentan distribuciones prácticamente opuestas en la mayoría de regiones europeas (SanGiovanni et al., 2009).

### Metodologías de análisis

En general, a pesar de que también se han descrito inserciones y deleciones pequeñas, la mayoría de los polimorfismos del mtDNA son sustituciones puntuales (Cann et al., 1984; Howell & Smejkal, 2000). Idealmente, para una identificación precisa de todos los haplotipos mitocondriales, debería secuenciarse el genoma mitocondrial completo. A efectos prácticos, esto no siempre ha sido posible, y hasta la aparición y estandarización de las técnicas de secuenciación masiva, la variación en el mtDNA se ha analizado básicamente mediante 2 aproximaciones diferentes: a) RFLPS (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción): con el objetivo de hacer más eficiente esta metodología para determinar el haplogrupo, se propuso una estrategia de análisis jerárquica (Santos et al., 2004). b) Secuenciación de regiones cortas mediante la tecnología Sanger: principalmente de las regiones hipervariables, o incluso de toda la región control completa.

Sin embargo, estas metodologías se ven condicionadas por limitaciones como la velocidad, el rendimiento, la resolución y la restricción para llevar a cabo análisis de múltiples muestras de formas paralelas. Por ello, las tecnologías de secuenciación de segunda generación (NGS) han ido reemplazando a los RFLPs y Sanger a medida que ha ido incrementando su eficacia, sensibilidad y fiabilidad, y disminuyendo los costes (Just et al., 2015).

### Secuenciación masiva

Actualmente, existen varias plataformas basadas en secuenciación masiva. Entre las plataformas de NGS tenemos Ion Torrent, Complete Genomics Technology e Illumina (Kanzi et al., 2020).

Las diferentes plataformas utilizan diferentes estrategias para conseguir una secuenciación de alto rendimiento. Estas diferencias acaban influyendo en la calidad y cantidad de secuenciación y en cuando se aplican, pero a rasgos generales todas siguen un proceso con las mismas etapas:

- 1) Preparación de librerías: se realiza mediante la fragmentación del DNA molde, posterior adición de adaptadores y finalmente la amplificación de estos fragmentos mediante *primers* complementarios a los adaptadores.
- 2) Secuenciación: es en esta fase donde se obtiene la secuencia de ácidos nucleicos, y la fase que más se diferencia entre las plataformas de secuenciación masiva.
- 3) Análisis de datos: los datos producidos en la fase 2 han de ser analizados para generar un registro de la variación genética obtenida.

Illumina es probablemente la plataforma más popular entre las NGS. Ésta se basa en la formación de clones y el uso de terminadores reversibles para poder secuenciar a gran escala de forma rápida, precisa y con opciones muy asequibles. La principal característica de la tecnología Illumina es que la secuenciación se realiza por síntesis, empleando dideoxinucleótidos que actúan como terminadores reversibles marcados con fluorescencia.

Durante la última década se han propuesto varias herramientas y softwares informativos para el análisis del genoma mitocondrial. Herramientas como MitoSeek (Guo et al., 2013) y MToolBox (Calabrese et al., 2014) utilizan datos de (WES, *Whole Exome Sequencing*) o genomas completos (WGS *Whole Genome Sequencing*) mientras que Mit-o-Matic (Vellarikkal et al., 2015) y mtDNA-Server (Weissensteiner et al., 2016) usan datos de la secuenciación del genoma mitocondrial, siendo este servidor el que genera una información más precisa y con menos falsos positivos de heteroplasmias.

En contraste con las metodologías de secuenciación de segunda generación, han aparecido las de tercera generación (TGS), que se centran en la secuenciación de moléculas largas de DNA (y RNA). Las principales plataformas de TGS son Pacific Bioscience (PacBio) y Oxford Nanopore (T. Xiao & Zhou, 2020). La secuenciación de PacBio permite generar *reads* de entre 8 y 20 Kb, mientras que con Oxford Nanopore se pueden obtener *reads* de hasta 200kb (Kanzi et al., 2020). Las TGS son especialmente útiles para la detección de variantes estructurales y además permiten identificar nucleótidos modificados, permitiendo la detección directa de marcas epigenéticas en el DNA (Slatko et al., 2018).

# Enfermedad Cardiovascular

Según define la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad cardiovascular (ECV) es un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, que incluyen:

- Cardiopatía coronaria → Enfermedad de los vasos sanguíneos que sustentan el músculo cardíaco. Entre estas se destacan la angina de pecho e infarto de miocardio (IM) y la muerte súbita cardíaca.
- Enfermedades cerebrovasculares → Enfermedad de los vasos sanguíneos que sustentan el cerebro.
- Arteriopatías periféricas → Enfermedad de los vasos sanguíneos que sustentan las extremidades. Entre ellas se destacan el accidente cerebrovascular (ACV) y la isquemia cerebral transitoria, pudiendo tener tanto un origen aterotrombótico como hemorrágico.
- Cardiopatía reumática → Daño en el músculo y las válvulas cardíacas debido a la fiebre reumática causada por estreptococos.
- Cardiopatías congénitas → malformaciones en la estructura del corazón existentes en el momento del nacimiento.
- Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares – coágulos sanguíneos (trombos) en las venas de las piernas, que se pueden desalojarse (émbolos) y moverse al corazón y los pulmones.

Otras enfermedades cardiovasculares incluyen tumores cardíacos y de la vasculares del cerebro, y cardiomiopatías.

Los datos de mortalidad y morbilidad indican que las principales formas de ECV son la cardiopatía isquémica (CI) de origen coronario y el accidente cerebrovascular ([https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))). Estas enfermedades acostumbra a ser eventos agudos causados predominantemente por el bloqueo de vasos sanguíneos, lo que impide que la sangre llegue al corazón o al cerebro. El motivo más común es la presencia de depósitos de grasa en las paredes internas de los vasos sanguíneos que llevan la sangre a estos órganos. Estos depósitos de grasa producen un estrechamiento de los vasos, conocido como estenosis, que en los casos más graves provoca que las necesidades de oxígeno del cerebro y del músculo cardíaco no se cumplan. La falta de oxigenación en estos órganos da lugar a infartos de miocardio (IM) y a los ACV isquémicos. Los ACV también pueden ser causados por sangrado de algún vaso en el cerebro, aunque esto ocurre en menor medida (13%) (Andrabi et al., 2020).

## Factores de riesgo para la ECV

Se considera como factor de riesgo cardiovascular a aquellas variables asociadas a una mayor probabilidad de sufrir una ECV.

La enfermedad cardiovascular está caracterizada por tener una etiología multifactorial, en la cual están involucrados factores tanto genéticos como ambientales. La presencia simultánea de varios factores no sólo tiene un efecto aditivo, sino que se multiplica el riesgo de cada factor por separado. Por esto, lo más correcto es realizar una valoración del riesgo cardiovascular global incluyendo todos los factores de riesgo (Umbria et al., 2019a, *Under Review*).

Actualmente se han identificado más de 300 factores de riesgo relacionados con la ECV (Lacey et al., 2017).

La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo de comportamiento (modificables), como el consumo de tabaco, las dietas no saludables y la obesidad, la inactividad física o el consumo nocivo de alcohol. Para las personas con ECV o con alto riesgo cardiovascular (debido a la presencia de uno o más factores de riesgo, como la hipertensión arterial, la diabetes, la hiperlipidemia o alguna ECV ya confirmada), son fundamentales la detección precoz y el tratamiento temprano, por medio de servicios de orientación o la administración de fármacos, según corresponda. Se estima que el 80% de los IM y ACV prematuros son prevenibles (Habib & Saha, 2010).

Sin embargo, hay otros factores no modificables, como podrían ser la edad, el género o la predisposición genética, que también afectan al riesgo de sufrir ECV.

### **Estilo de vida sedentario**

Este estilo de vida incrementa la resistencia a la insulina, induce a la obesidad, incrementa los niveles de glucosa en sangre, de lípidos plasmáticos y de factores protrombóticos. Varios investigadores han estudiado la relación entre el comportamiento sedentario y la ECV, mostrando evidencias de un incremento en el riesgo asociadas a un estilo de vida sedentario (Warren et al., 2010; Young et al., 2014).

### **Hipertensión arterial**

Esta afección supone una mayor resistencia para el corazón, que aumenta de tamaño (hipertrofia ventricular izquierda) para poder afrontar el sobreesfuerzo necesario. Este incremento de la masa muscular no viene acompañado de un aumento equivalente del riego sanguíneo y puede acabar provocando insuficiencia coronaria y angina de pecho. Además, el músculo cardíaco se vuelve más irritable y se producen más arritmias. También propicia la arterioesclerosis y fenómenos de trombosis. En el peor de los casos, la hipertensión arterial puede reblandecer las paredes de la aorta y provocar su dilatación (aneurisma) o rotura (Nadar & Lip, 2015).

La hipertensión, junto con la diabetes, tienen la asociación más fuerte con la calcificación de la arteria coronaria (de entre los factores de riesgo para ECV clásicos) (Nicoll et al., 2016). Tanto la hipertensión arterial como los polimorfismos ligados al factor de crecimiento endotelial contribuyen al daño vascular (Hong et al., 2019; Tsatsakis et al., 2019).

Se ha observado que la variación a largo plazo de la presión arterial es un factor predictivo de ECV (Stevens et al., 2016; Tibazarwa & Damasceno, 2014). Se consideran valores de presión arterial alta a partir de una presión arterial sistólica (PAS) de 140mmHg y presión arterial diastólica (PAD) de 90mmHg (Jordan et al., 2018). Aunque también se han observado incrementos en la mortalidad por ECV a partir de PAS >115mmHg y PAD >75mmHg (Yano et al., 2018). Como la PAS se eleva con la edad, se consideró durante mucho tiempo que era normal que sea elevada en personas de edades avanzadas. Actualmente se conoce que los valores deberían mantenerse dentro del rango de normalidad a todas las edades para disminuir el riesgo de complicaciones cardiovasculares. Las mujeres habitualmente presentan valores de PAS inferiores a los de los hombres, sin embargo, esta aumenta con la edad de forma más pronunciada en mujeres.

### Tabaquismo

Es considerado, junto a la hipertensión, uno de los factores claves en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Hong et al., 2019) teniendo la patología coronaria una incidencia hasta 3 veces mayor en fumadores que en el resto de la población. El humo del tabaco contiene partículas con efectos pro-oxidantes que producen radicales libres que junto al estrés oxidativo juegan un papel crucial en la fisiopatología de la ECV. El tabaquismo también juega un papel vital en la aterogénesis, espasmos coronarios, desordenes de los mecanismos de coagulación, incremento de la oxidación del colesterol LDL (*low density lipoprotein*), agregación plaquetaria, crecimiento de fibrinógeno, enfermedades de la función endotelial y perfiles lipídicos alterados (colesterol HDL reducido) (Sharifi-Rad et al., 2020).

La posibilidad de padecer una ECV es proporcional a la cantidad de cigarrillos fumados al día y al número de años en los que se mantiene este hábito nocivo. Sin embargo, el tabaquismo pasivo también representa un factor de riesgo.

### Estrés

Tanto el trastorno de estrés postraumático como el estrés se han relacionado con el riesgo de sufrir una ECV (Coughlin, 2011; Wright et al., 2019). Hay 3 mecanismos fisiopatológicos de la ECV crónicas correlacionados con el estrés: a) perturbación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, incrementando los niveles de cortisol debido al estrés; b) inflamación de la pared arterial (endotelio), lo que causa aterosclerosis; c) incremento del tono del sistema nervioso vegetativo simpático.

### Obesidad

Este factor se ha vuelto una preocupación general y según la OMS, en 2016 el 39% de la población mundial adulta presentaba sobrepeso y un 13% era obesa en 2016. La obesidad no es sólo un desajuste entre las calorías consumidas y la energía utilizada sino una condición compleja con sus propios factores de riesgo, tanto genéticos como comportamentales (Vasileva et al., 2018).

El riesgo de la obesidad depende en gran medida de la localización de la grasa, siendo aquella que se acumula en el abdomen la que afecta en mayor medida al corazón. En este caso, el perímetro abdominal es una medida antropométrica que permite evaluar esta acumulación de grasa. En la mujer un perímetro abdominal normal es de 88cm y en el hombre 102cm. Otra medida antropométrica muy utilizada es el índice de masa corporal (IMC) que determina que un individuo presenta sobrepeso con valores de IMC entre 25-39kg/m<sup>2</sup> y obesidad con valores >30kg/m<sup>2</sup>. Ambas medidas han estado relacionadas con un incremento significativo en la mortalidad y morbilidad cardiovascular (Adegbija et al., 2015; Khan et al., 2018).

### Diabetes

La diabetes tipo II es, junto a la obesidad, otro de los desafíos para la sanidad pública, afectando a un 8,5% de la población mundial adulta en 2014 y causando de forma directa 1,5 millones de defunciones en 2019 (Global Burden of Disease, 2019). La diabetes tipo dos es la enfermedad resultante del uso inefectivo de la insulina, debido a una secreción inadecuada de las células  $\beta$ -pancreáticas.

Un incremento en los niveles de glucosa en sangre produce la glicosilación de las proteínas de las paredes arteriales y nervios, causando la alteración de su estructura aumentando



directamente el riesgo de ECV (Juárez-Rojas et al., 2018). Esta alteración disminuye su resistencia a la acción de los radicales de oxígeno libres incrementando la inflamación a nivel endotelial junto con el posicionamiento de partículas de colesterol VLDL y LDL facilitando la formación de ateromas (Sharifi-Rad et al., 2020).

Se ha estimado que el riesgo de desarrollar una ECV aumenta entre 2 y 4 veces en individuos con diabetes respecto a la población no diabética de edad y género similar (Tun et al., 2017). A nivel diagnóstico, la diabetes se establece por la presencia de los síntomas clásicos de la hiperglucemia (poliúrica, polifagia, polidipsia, pérdida de peso inexplicable, debilidad o molestias digestivas) y niveles de glucemia superiores o iguales a 200mg/dl o  $\geq 126$ mg/dl en ayuno. Para evaluar cómo han estado los niveles de glucosa en sangre se analiza la hemoglobina glicosilada (Hb1Ac) y se establece el diagnóstico de diabetes para valores  $\geq 6,5\%$ .

### **Dislipidemia**

Esta alteración consiste en la presencia de una cantidad anormal de lípidos (triglicéridos, colesterol y fosfolípidos) en sangre. Concretamente se refiere a un aumento en los niveles de colesterol total, LDL (lipoproteína de baja densidad) y triglicéridos junto con una disminución en los niveles de HDL (lipoproteína de alta densidad).

En esta enfermedad, los receptores hepáticos de LDL no actúan correctamente causando que el LDL circule más por el cuerpo prolongando su contacto con el endotelio vascular e incrementando su grado de oxidación; por lo tanto, incrementando el efecto aterogénico de LDL (Kopin & Lowenstein, 2017; Zárate et al., 2016). La aterosclerosis derivada de la dislipidemia está caracterizada por depósitos de placas de ateroma en las paredes de arterias grandes y medianas, engrosando la pared arterial y causando una pérdida de elasticidad.

### **Edad**

El riesgo cardiovascular incrementa con la edad, mostrando un incremento muy considerable a partir de los 50 años. La prevención, aunque idealmente debe ponerse en marcha con anterioridad, también se puede aplicar en la vejez ya que la mayor parte de los factores de riesgo modificables continúan siéndolo por encima de los 80 años, y la lucha contra ellos sigue siendo eficaz.

La edad no sólo modifica el riesgo de ECV, sino que los distintos factores de riesgo tienen una relevancia distinta en función de ésta. En individuos jóvenes, los factores de riesgo principales son el género y el tabaquismo, mientras que en individuos de edad avanzada son la hipertensión, hipercolesterolemia y la diabetes (Lind et al., 2018).

### **Género**

El riesgo cardiovascular es superior en hombres. Las mujeres normalmente desarrollan cardiopatías isquémicas unos 10 años más tarde que los hombres, aunque a partir de los 65 el pronóstico de ellas es significativamente peor. Esta diferencia se ha atribuido al hecho de que las hormonas femeninas ejercen un efecto protector que desaparece tras la menopausia.

Asimismo, cabe mencionar que el género también afecta a otros factores de riesgo y a los hábitos de vida por ejemplo al consumo de tabaco (anteriormente predominantemente masculino) y la aparición de anticonceptivos orales para mujeres. Los anticonceptivos orales son fármacos que interrumpen la fertilidad femenina normal y evitan la ovulación por medio de diferentes cantidades de hormonas (estrógenos y progestágenos). La utilización de estos

fármacos puede influir en la coagulación, aumentando el riesgo de trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar, derrame cerebral e infarto de miocardio, aunque estos riesgos van disminuyendo con la mejora de los anticonceptivos.

### Origen étnico

La enfermedad cardiovascular es un problema a nivel mundial, pero se han observado grandes diferencias entre grupos étnicos. Varios estudios han reconocido que las diferencias en el origen étnico afectan a la prevalencia y salud cardiovascular (Kaul et al., 2011; Meeks et al., 2016; Owolabi et al., 2017; Shaikh et al., 2019). Se ha observado que los individuos norteamericanos de origen africano tienen tendencia a presentar valores de presión arterial más elevados y tasa de mortalidad por ACV más altas (Owolabi et al., 2017; Sharrief et al., 2016). Otras investigaciones han descrito un menor riesgo de infarto de miocardio y mayor riesgo de ictus en países asiáticos (Ueshima et al., 2008). También se han observado diferencias en la lesión vascular más común en individuos que han sufrido un ACV en función de la etnia. En población de origen caucásico, la lesión más frecuente es la estenosis aterosclerótica extracraneal de la carótida, mientras que en población de origen asiático, africano o hispano es la intracraneal (Y. Wang et al., 2014). A nivel del metabolismo de lípidos, se han descrito niveles más bajos de HDL y más altos de triglicéridos en poblaciones del sud de Asia, mientras que en poblaciones de origen africano se ha percibido la situación contraria. Estas diferencias ya se detectan en la niñez y parecen independientes de la presencia de obesidad, sugiriendo un papel importante de factores epigenéticos. También se han detectado diferencias étnicas importantes en la lipoproteína A con valores en poblaciones de origen africano que doblan los observados en poblaciones de origen europeo (Gazzola et al., 2017).

Estas disimilitudes pueden ser parcialmente explicadas por diferencias en la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales junto con factores genéticos (Perini et al., 2018; Shaikh et al., 2019).

### Factores genéticos

Los primeros estudios relacionados con los factores genéticos que afectan a la enfermedad cardiovascular permitieron identificar genes de herencia mendeliana asociados a las mismas, como algunas formas de infarto de miocardio prematuras, cardiomiopatía hipertrófica y dilatada, fallo cardíaco y aneurisma aórtico. Sin embargo, la gran mayoría de las ECV son poligénicas y multifactoriales, viéndose afectadas tanto por factores ambientales como genéticos. Se ha estimado que la heredabilidad de las ECV es del 40-60% (X. Dai, 2016; Elosua et al., 2009), lo que sugiere que los factores de riesgo hereditarios contribuyen de manera importante a la susceptibilidad futura de sufrir un acontecimiento cardiovascular.

Entre las principales líneas de investigación del área de la genética cardiovascular destacan los estudios de asociación entre variantes de DNA nuclear y mitocondrial y diversos tipos de ECV o fenotipos característicos de cada patología. La hipótesis “common disease – common variant” propone que variantes comunes, definidas como variantes con una prevalencia igual o superior al 5% en la población, juegan un papel en la causa y fisiopatología de enfermedades comunes (El-Fishawy, 2013); y es en esta premisa en la que se basan los estudios del Genome Wide Association Study (GWAS).

Se cree que una proporción considerable de la etiología de la cardiopatía isquémica (CI) de origen coronario y del ACV es atribuible a una variación genética común (frecuencia alélica >5%) (J. Yang et al. 2010; Zeyl 2007; Zuk et al. 2014). Los GWAS han estimado que el riesgo genético representa probablemente entre un 40-55% de la susceptibilidad de sufrir una CI (Elosua, Lluís, and Lucas 2009; Zdravkovic et al. 2002) y entre un 16-40% para un ACV en función del subtipo (Bevan et al. 2012).

Estos estudios identificaron muchos SNPs nucleares, y en menor cantidad mitocondriales, desconocidos hasta ese momento con asociaciones estadísticamente significativas. Destacó una publicación simultánea de 3 estudios GWAS que identificó la primera variante genética nuclear asociada con el riesgo de CI (~30%) en el cromosoma 9p21 (Burton et al., 2007; Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007). Esta asociación fue confirmada en múltiples grupos étnicos (Humphries et al., 2010; Samani et al., 2007). Posteriormente, varios grupos replicaron este descubrimiento hasta extender la asociación a otros fenotipos vasculares, incluyendo la aterosclerosis coronaria (S. Ye et al., 2008), la arteriopatía periférica (Helgadottir et al., 2008) y el ACV (Smith et al., 2009).

### SNPs Nucleares

En general, la combinación de los datos publicados por estudios GWAS ha dado lugar al descubrimiento de más de 200 variantes genéticas nucleares asociadas significativamente ( $p \leq 5,0 \times 10^{-8}$ ) con la CI de origen coronario (Do et al., 2015; Howson et al., 2017; Khera & Kathiresan, 2017; Nelson et al., 2017) y 60 que se asocian con el IM (MacArthur et al., 2017). Se estima que estas variantes explican entre un 30 y 40% de la heredabilidad de las CAD (Nelson et al., 2017).

Los loci asociados con el riesgo de CAD e IM se encuentran publicados en listados exhaustivos de estos loci, en los que se incluye información sobre los alelos de riesgo, frecuencias alélicas y genes candidatos (Erdmann et al., 2018; Kessler & Schunkert, 2022).

En relación al ACV el mayor avance lo ha realizado el proyecto GIGASTROKE, el mayor metaanálisis GWAS multiétnico en relación al ACV (con 110182 pacientes y 1,5 millones de controles) realizado con la colaboración del *International Stroke Genetics Consortium* (ISGC) (Mishra et al., 2022). Los resultados de este estudio representan la descripción más exhaustiva de las variantes genéticas asociadas al riesgo de ACV en población europea, del este y sur de Asia, de afroamericanos e hispanicos hasta la fecha. Se identificaron 89 loci relacionados con la susceptibilidad al ACV y sus subtipos, 61 de los cuales no se habían descrito previamente. Estos resultados sugieren que hay una susceptibilidad al ACV sustancial que es compartida entre las poblaciones y en general, los resultados publicados generan una mejor comprensión de la patogénesis del ACV y sus subtipos, dianas terapéuticas potenciales y herramientas de predicción del riesgo genético (Gallego-Fabrega et al., 2022).

Todos los resultados de los estudios GWAS relacionados con la CI, el ACV y sus factores de riesgo están incluidos en un catálogo (*GWAS catalog*) para facilitar el acceso de los investigadores y clínicos (MacArthur et al., 2017). Actualmente, hay más de 1.607 SNPs (34 SNPs para *myocardial infarction* y 33 para *ischemic stroke*) asociados a ECV ( $p \leq 5,0 \times 10^{-8}$ ) publicados en este catálogo.

Los mecanismos fisiológicos exactos que hay detrás de la mayoría de los polimorfismos genéticos obtenidos en el cribaje de los GWAS son aún desconocidos. En muchos casos, la búsqueda de variantes funcionales se ha visto dificultada porque la mayoría de los SNPs

asociados a ECV se localizan en regiones no codificantes y se desconocen sus genes diana (Kessler & Schunkert, 2021; MacArthur et al., 2017). No obstante, la mayoría de las variantes intergénicas son cercanas a las regiones promotoras de los genes, indicando que podrían regular su expresión. Entre los genes más representativos con los cuales se ha podido clarificar la importancia funcional de los SNPs encontrados: genes relacionados con el metabolismo de lípidos, la coagulación y diferentes aspectos de la función endotelial como los que comprometen la estabilidad de la placa de ateroma (Ghosh et al., 2015).

Debido al alto coste, los estudios de secuenciación del genoma completo aún no han contribuido de manera significativa al conocimiento de los factores de riesgo genéticos de la ECV (Kessler & Schunkert, 2021).

### Epigenética

La definición del término epigenética ha ido variando desde su descubrimiento, actualmente se define como la información genética que no está directamente incluida en la secuencia nucleotídica (Vrablik et al., 2021). Esta información o factores epigenéticos es reversible y puede cambiar durante la vida de un individuo, con frecuencia influenciado por el estilo de vida (dieta, actividad física, consumo de tabaco, etc). Algunos factores, como la metilación del DNA son heredables, y principalmente tienen efectos reguladores.

La metilación del mtDNA y los microRNAs son los principales factores epigenéticos que podrían estar asociados a la ECV (Prasher et al., 2020). El papel que pueden jugar otros factores como la modificación de histonas han sido poco estudiados.

#### - **MiRNAs**

Los microRNAs son moléculas endógenas de RNA de cadena sencilla, cortas (22 bp de longitud aproximadamente) y no codificantes. Estas moléculas actúan como reguladores de la transcripción y también están involucrados en procesos post-transcripcionales. La desregulación de su expresión juega un papel clave en la patogénesis de muchas enfermedades, entre ellas la ECV -IM, accidente cerebrovascular, hipertrofia cardíaca y arritmias entre otras- (D. S. Jiang et al. 2022; Q. Jiang et al. 2022; Laffont and Rayner 2017; Z. Wang et al. 2008).

Los miRNAs se expresan tanto en cardiomiocitos como en fibroblastos, células endoteliales y células vasculares de la musculatura lisa, y controlan prácticamente todos los aspectos de la biología cardíaca -remodelación y fibrosis cardíaca, apoptosis, inflamación, proliferación, angiogénesis y metabolismo- (Ásgeirsdóttir et al., 2012; de Gonzalo-Calvo et al., 2017; Suárez et al., 2010).

Estos miRNAs no sólo están relacionados con la biología cardíaca, sino que están involucrados en la aterosclerosis, desde la disfunción endotelial, hasta adhesión celular, desarrollo de la placa y ruptura de la misma (Economou et al., 2015; Vartak et al., 2022).

En el estudio de Lagerbauer y Engelhardt proponen que pudiera haber hasta 150 microRNAs que jueguen un papel crítico en el sistema vascular. De estos microRNAs, entre 30 y 35 han sido analizados en profundidad y validados mediante modelos experimentales *in vivo* observándose que, al ser manipulados, tienen efectos fisiopatológicos tanto en el miocardio como en los vasos sanguíneos (Lagerbauer & Engelhardt, 2022).

- **Metilación del DNA**

La metilación del DNA es el factor epigenético que se ha estudiado con mayor profundidad y parece ser el más importante en relación con la ECV (Prasher et al., 2020). La metilación se produce en el 70% de las citosinas de las islas CpG de todo el genoma, y cambios en esta metilación pueden producir un incremento tanto de la maquinaria de transcripción como del silenciamiento de genes.

El estudio realizado en 2019 por Agha y colaboradores observó que los niveles de metilación de más de 50 islas CpG se encontraban significativamente asociados con las ECV incidentes o el IM. Estas islas CpG influyen principalmente genes relacionados en la homeostasis del calcio, el remodelamiento cardíaco y la migración transendotelial de leucocitos.

**Haplogrupos mitocondriales y ECV**

Se considera que las mutaciones del mtDNA que definen los diferentes haplogrupos no son patológicas por sí mismas, sino que confieren unas características metabólicas a cada uno de ellos que les permite modular de manera diferente las funciones biológicas más importantes (Krzywanski et al., 2016).

La relevancia clínica de los haplogrupos mitocondriales ha estado demostrada repetidamente a través de estudios de casos y controles en una amplia variedad de enfermedades degenerativas como la ECV. Los principales hallazgos de estos estudios están recogidos en la Tabla 1. También se ha demostrado la asociación de Hg mitocondriales con algunos factores de riesgo cardiovascular clásico como la hipertensión, la obesidad o la diabetes (Ebner et al., 2015; González et al., 2012; Nardelli et al., 2013; Poulton et al., 2002; Rea et al., 2013; Zhu et al., 2009).

Sin embargo, igual que ocurre en otras enfermedades, también hay estudios en los que no se observan diferencias significativas en la distribución de los haplogrupos y el riesgo a desarrollar una ECV (ni con factores de riesgo como la diabetes) (Abrantes et al., 2016; Chinnery et al., 2010; Chinnery et al., 2007; Govindaraj et al., 2014; Liu et al., 2019; Mitchell et al., 2017; Mohlke et al., 2005; F. Xiao et al., 2020).

*Tabla 1. Estudios de asociación entre diversas enfermedades cardiovasculares y los haplogrupos mitocondriales*

| Estudio                         | Enfermedad cardiovascular           | Hg     | Rol                 | Población |
|---------------------------------|-------------------------------------|--------|---------------------|-----------|
| Castro et al., 2006             | Cardiomiopatía hipertrófica         | T      | Riesgo              | Caucásica |
| Chinnery et al., 2010           | Ataque isquémico transitorio y ACV  | K      | Protector           | Caucásica |
| Fernández-Caggiano et al., 2012 | CI                                  | H<br>J | Riesgo<br>Protector | Caucásica |
| Fernández-Caggiano et al., 2013 | Cardiomiopatía dilatada             | H      | Riesgo              | Caucásica |
| Hagen et al., 2013              | Cardiomiopatía hipertrófica         | H<br>J | Riesgo<br>Protector | Caucásica |
| Hudson et al., 2014             | ACV                                 | U      | Riesgo              | Caucásica |
| Kofler et al., 2009             | CHD                                 | T      | Riesgo              | Caucásica |
| Kytövuori et al., 2020          | Muerte súbita cardíaca no isquémica | H1     | Riesgo              | Caucásica |
| Martikainen & Majamaa,          | ACV                                 | U      | Riesgo              | Caucásica |

|                             |                                     |         |                            |           |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------|----------------------------|-----------|
| 2010                        |                                     |         |                            |           |
| Palacín et al., 2011        | IM precoz                           | H       | Riesgo                     | Caucásica |
| Roselló-Díez et al., 2021   | Fibrilación atrial                  | H<br>U  | Protector<br>De riesgo     | Caucásica |
| Serrano-Teruel et al., 2019 | Estenosis aortica severa            | UK      | Protector                  | Caucásica |
| Umbria et al., 2019b        | IM                                  | H       | Riesgo                     | Caucásica |
|                             | Hipertension                        | J       | Protector                  |           |
| Cai et al., 2015            | Severidad del ACV                   | N9      | Protector                  | Asiática  |
| Nishigaki et al., 2007a     | IM                                  | N9b     | Protector<br>en<br>hombres | Asiática  |
| Nishigaki et al., 2007b     | Infarto cerebral<br>aterotrombótico | A       | Riesgo en<br>mujeres       | Asiática  |
| Sawabe et al., 2011         | CHD                                 | A<br>M7 | Riesgo<br>Riesgo           | Asiática  |
|                             | IM                                  | D4      | Riesgo                     |           |
| Tsai et al., 2020           | ACV isquémico                       | F       | Riesgo                     | Asiática  |
| D. Yang et al., 2014        | ACV                                 | D4b     | Protector                  | Asiática  |

### SNPs mitocondriales

El mecanismo exacto que conecta las mutaciones en el genoma mitocondrial con el riesgo de ECV todavía no se conoce en su totalidad. Sin embargo, múltiples estudios sugieren que estas mutaciones alteran la homeostasis mitocondrial provocando un aumento en la producción de ROS, desregulando el metabolismo del calcio y reduciendo la síntesis de energía.

Disfunciones en la OXPHOS conllevan alteraciones en el metabolismo energético y cambios en el intercambio de sodio y calcio. Esto produce una sobrecarga de calcio en el citoplasma causando la disfunción diastólica de cardiomiocitos y células musculares lisas promoviendo el incremento de la presión sanguínea (Dabravolski et al., 2022).

Los estudios más recientes que han observado una vinculación entre ciertas ECV y mutaciones específicas del mtDNA (ya sean con efectos positivos o negativos) incluyen sustituciones (Abu-Amero et al., 2010; Gawęł et al., 2008; Hudson et al., 2014; Liou et al., 2004; Mueller et al., 2011; Sazonova et al., 2015; J. Wang et al., 2015), deleciones (Levitsky et al., 2003), duplicaciones (Cardena et al., 2013) y la detección de heteroplasmias puntuales y de longitud (Golubenko et al., 2016; Mitrofanov et al., 2016; Sazonova et al., 2016; Sobenin et al., 2013), tanto en la región codificante del mtDNA como en la no-codificante. En particular, las mutaciones localizadas en la región control del mtDNA parecen tener especial relevancia, puesto que pueden influir en la regulación de la expresión génica del mtDNA.

Dos de estos estudios han asociado la variante mitocondrial m.16189 T>C con la arteriopatía coronaria en poblaciones del centro de Europa (Mueller et al., 2011) y de Arabia Saudí (Abu-Amero et al., 2010). De hecho, esta misma mutación se ha asociado con el IM (Abu-Amero et al., 2010) y el ACV (Liou et al., 2004) en población de Arabia Saudí y Taiwán respectivamente. Curiosamente, el ACV de tipo hemorrágico también parece estar fuertemente asociado con la variante m.16319 G>A (Gawęł et al., 2008). Por otro lado, Cardena et al. (2013) descubrieron una duplicación de 15pb entre los nucleótidos 16018 y 16032 que podría alterar la estabilidad o estructura secundaria del mt-tRNA<sup>Pro</sup> en pacientes con cardiomiopatía. Además, la m.16566 G>A y la heteroplasmia m.16093 T/C también se han asociado con esta enfermedad (Sazonova et al., 2016).

Se han descrito varias mutaciones del genoma mitocondrial asociadas a las enfermedades de las arterias coronarias (CAD). En población iraní Heidari et al. 2017, describieron una asociación con las mutaciones m.5568A>G, m.5711T>A, m.5725T>G, m.12308A>G. Posteriormente, también observaron una asociación con las variantes m.8231C>A, m.8376T>A y m.15928G>A (Heidari et al., 2020). En población china se ha asociado a las mutaciones m.16089T>C, m.16145G>A, m.14178T>C, m.215A>G (Z. Wang et al., 2021) y también con m.5628T>C, m.681T>C y m.5592A>G (Jia et al., 2020). En población italiana (Vecoli et al., 2018) y caucásica (Vecoli et al., 2019) se ha observado una asociación entre la CAD y la delección en la posición m.4977.

Otras variantes asociadas con las CAD son las variantes m.15927G>A, m.5592T>C, m.3243A>G (Qin et al., 2014) y m.16189T>C (Botto et al., 2005).

También se han descrito muchas variantes mitocondriales relacionadas con el riesgo a padecer de hipertensión (recogidas en la *review* de Dabravolski et al., 2022). La mayoría de estas se han descrito en población del norte de China. Esto es debido a que la incidencia de la hipertensión en esta región es muy superior a la media (W. Chen et al., 2016) y, por lo tanto, este grupo étnico (chinos, chinos Han y mongoles chinos) ha sido el foco de muchos de estos estudios.

Las mutaciones m.16145G>A y m.16311 se han asociado con un incremento de riesgo de ACV en población española (Umbria et al., 2020) y las variantes m.195T>C, m.311C>T y m.12338T>C se han descrito como un factor protector para esta misma enfermedad en población china (Luan et al., 2021). Rosa et al., (2008) describieron el estado alélico del haplogrupo H1 para las mutaciones m.3010G>A, m.7028C>T and m.11719G>A como factores protectores para el ACV isquémico.

En relación al IM, en 2020 Umbria y colaboradores describieron las variantes m.72 T>C, m.73A>G y m.16356T>C como factores genéticos protectores.

Dado que los genes de tRNAs normalmente tienen secuencias altamente conservadas, se presupone que mutaciones en estos genes producirán una reducción en la estabilidad de los tRNAs producidos, potencialmente alterando su estructura secundaria (Watson et al., 2001). Se ha observado experimentalmente, que mutaciones en estos genes alteran en los niveles de tRNAs mitocondriales produciendo una reducción en la tasa de síntesis de proteínas mitocondriales alterando la función de algunos complejos de la OXPHOS y en consecuencia de la producción de ROS (Zhang et al., 2019).

### **Número de copias de mtDNA (mtDNA-CN)**

El genoma mitocondrial es más vulnerable a sufrir daños por las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que el genoma nuclear. El daño producido en el mtDNA altera el número de copias (CN) de esta molécula pudiendo resultar en una disfunción mitocondrial. La disfunción mitocondrial está considerada parte importante de la patogénesis de la ECV (D. F. Dai et al., 2012). El mtDNA-CN podría reflejar el nivel de daño en el genoma mitocondrial y actuar como un indicador de la función mitocondrial (Ashar et al., 2017). Por lo tanto, varios investigadores ya han hipotetizado que el CN de mtDNA podría servir como un marcador tanto de riesgo como de pronóstico para la ECV, aunque aún no se ha llegado a un consenso.

En 2018 el grupo de Yue y colaboradores, realizó un meta-análisis para evaluar esta cuestión. Sus resultados sugieren que el nivel de mtDNA-CN podría ser un parámetro que permita distinguir entre pacientes de ECV e individuos sin estas patologías. También encontraron una

correlación negativa entre el CN y el riesgo cardiovascular, detectando una asociación entre la disminución en el número de copias de mtDNA en células sanguíneas periféricas y un incremento del riesgo de muerte cardíaca súbita (*sudden cardiac death*).

### Epidemiología de la ECV

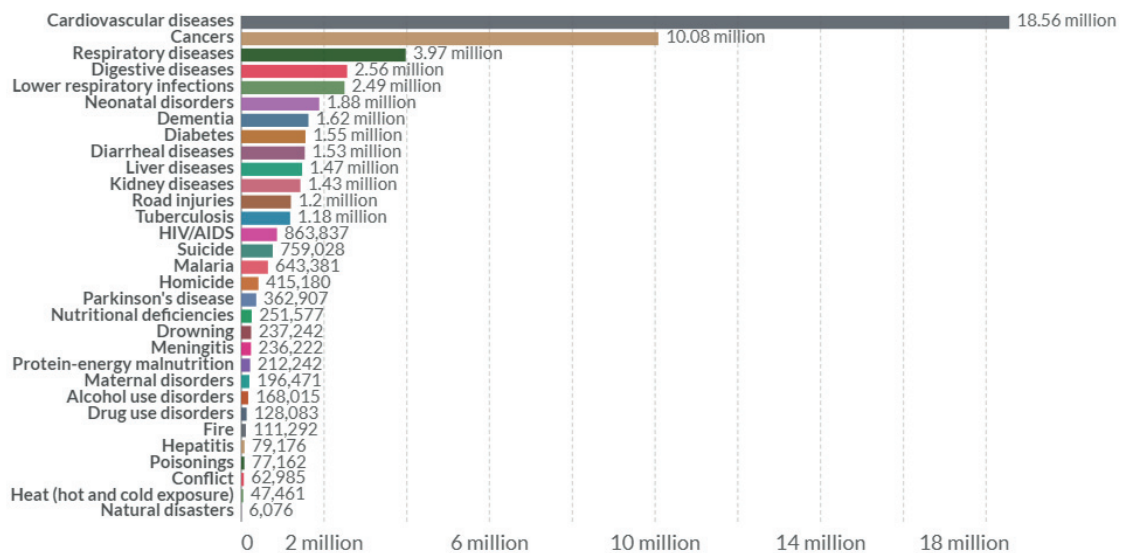
La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa.

Si miramos los datos más recientes incluidos en el estudio *Global Burden of Disease* podemos observar que en los datos más actuales (2019) este número aún es mayor, llegando a los 18,56 millones de personas (32,84%) cuya muerte fue a causa de una ECV. (Gráfico 1: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>). De estas muertes, 85% fueron debidas a infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares, y un tercio de estas muertes ocurren de manera prematura en personas menores de 70 años.

### Number of deaths by cause, World, 2019



Change country



Source: IHME, Global Burden of Disease

OurWorldInData.org/causes-of-death • CC BY

**Gráfico 1.** Número de muertes a nivel mundial en función de la causa durante el año 2019. Fuente: IHME, *Global Burden of Disease*.

Sin embargo, las muertes causadas por ECV no se reparten por igual, sino que afectan predominantemente en países de ingresos medios y bajos (<75%) y a personas de edad avanzada (>50 años).

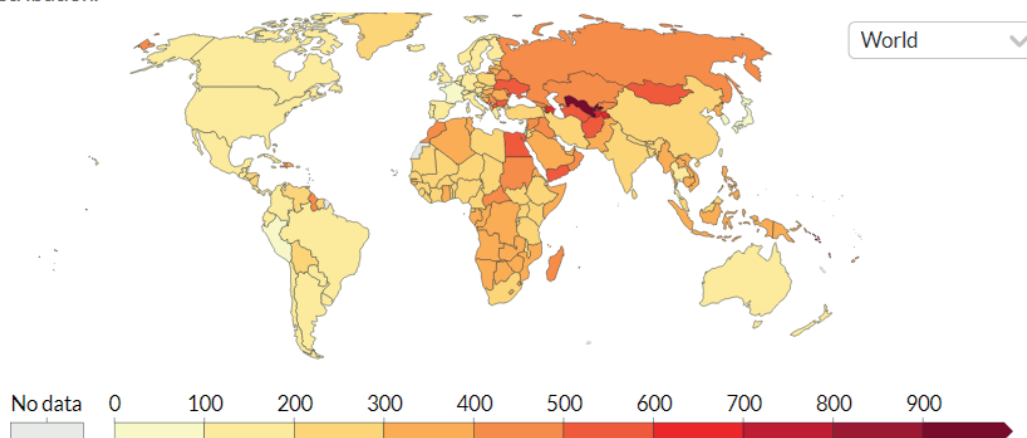
En el Gráfico 2, estandarizado en función de la edad, podemos observar que en general las tasas de mortalidad por ECV son más elevadas en Europa oriental, Asia y África respecto a las que se observan en América del Norte y la Europa Occidental y Septentrional. La tasa más alta se encuentra en Uzbekistán, siendo de 945,97 muerte por cada 100.000 individuos; y la más baja en Japón (77,01 muertes por cada 100.000 individuos).



## Age-standardized death rate from cardiovascular diseases, 2019

Our World in Data

Death rates are measured as the number of deaths per 100,000 individuals. This rate is age-standardized, which means that it is corrected for age differences by normalising to a constant, reference population distribution.



Source: IHME, Global Burden of Disease

OurWorldInData.org/causes-of-death • CC BY

**Gráfico 2.** Tasa de muertes debidas a ECV en 2019. La tasa esta estandarizada por la edad. Fuente: IHME, Global Burden of Disease.

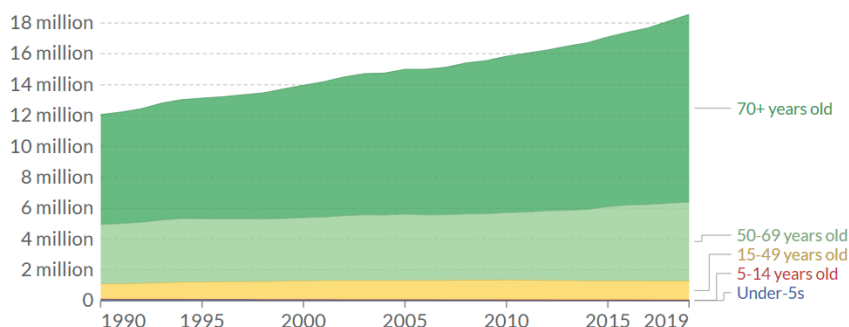
En cuanto al número de muertes causadas por ECV, en el Gráfico 3, observamos un ligero incremento con el tiempo en la franja de edad de entre 50 y 69 años y un incremento mayor en la franja de personas por encima de los 70 años de edad. En la franja de 15 a 49 se ha mantenido más o menos constante y en las franjas de 5 a 14 años y de menos de 5 ha disminuido ligeramente. Este incremento también se observa en la tendencia global. En 1990 las muertes por ECV suponían el 25,88% del total de muertes a nivel global, mientras que en 2005 ya eran un 28,8% y actualmente suponen el 32,94%.

## Deaths from cardiovascular diseases, by age, World, 1990 to 2019

Our World in Data

Annual number of deaths from cardiovascular diseases.

Change country Relative



Source: IHME, Global Burden of Disease (GBD)

CC BY

**Gráfico 3.** Evolución del número de muertes causadas por las ECV, estratificadas por grupos de edad, desde 1990 a 2019. Fuente: IHME, Global Burden of Disease.

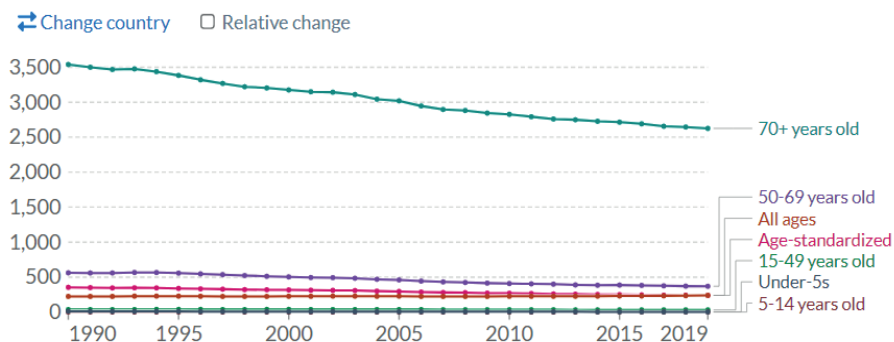
A pesar de ver un incremento en el número de muertes por ECV, la tasa de mortalidad ha ido disminuyendo con el tiempo. Tal y como podemos observar en los siguientes gráficos (4A y 4B), se ha producido disminución generalizada de la tasa de defunción por ECV en todas las franjas de edad, siendo las más marcadas las franjas de menores de 5 años (-65,52%) y niños

de entre 5 y 14 (-43,23%). La franja en la que observamos una menor disminución es la correspondiente a personas entre 15 y 49 años (-13,75%). Sin embargo, podemos observar que la tasa de mortalidad en todas las edades (sin estandarizar) se ha incrementado ligeramente (+6,35).

**A) Cardiovascular disease death rates by age, World, 1990 to 2019**



Death rates from cardiovascular disease measured per 100,000 individuals across various age categories. Also shown is the total death rate across all ages (not age-standardized) and the age-standardized death rate. Age-standardization assumes a constant population age & structure to allow for comparisons between countries and with time without the effects of a changing age distribution within a population (e.g. aging).



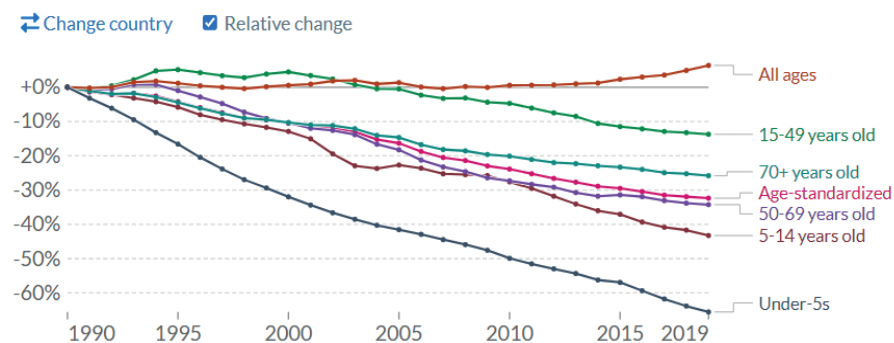
Source: IHME, Global Burden of Disease (GBD)

CC BY

**B) Change in cardiovascular disease death rates by age, World, 1990 to 2019**



Death rates from cardiovascular disease measured per 100,000 individuals across various age categories. Also shown is the total death rate across all ages (not age-standardized) and the age-standardized death rate. Age-standardization assumes a constant population age & structure to allow for comparisons between countries and with time without the effects of a changing age distribution within a population (e.g. aging).



Source: IHME, Global Burden of Disease (GBD)

CC BY

**Gráfico 4.** A) Evolución de la tasa de mortalidad debida a las ECV en función de la edad. B) Cambio en las tasas de mortalidad por ECV estratificado por edades (incluyendo una categoría global, de todas las edades). Fuente: IHME, Global Burden of Disease (GBD).

En el año 2022 la *World Stroke Association* publicó nuevos datos sobre el ACV referentes al 2019. Ese año ocurrieron aproximadamente 12,2 millones de ACV nuevos (7,6 millones siendo ACVs isquémicos). Una de cada 4 personas sufrirá un ACV durante su vida, y estos ocurren 1 cada 3 segundos. El 62% de estos ACVs ocurren en personas menores de 70 años y son más frecuentes en mujeres (53%).

En 2019 murieron 6,5 millones de personas a causa de un ACV (3,3 millones a causa de un ACV isquémico). Solo el 34% de estas defunciones ocurrieron en personas con menos de 70 años, y el 51% de los difuntos eran hombres. Únicamente el ACV ya supone un coste estimado a nivel mundial de 451 billones de dólares.

### Enfermedad cardiovascular en España

Sobre la enfermedad cardiovascular en España se realizó un estudio muy completo expuesto en la tesis de la Dra. Umbria (Umbria et al., 2019c). El estudio abarca la población española entre los años 1999 y 2010, y tuvieron en consideración las enfermedades más relevantes: las enfermedades hipertensivas, infarto de miocardio, otras enfermedades isquémicas del corazón, fallo cardíaco, enfermedades cerebrovasculares y aterosclerosis.

#### **Mortalidad y morbilidad hospitalaria**

Durante el período comprendido entre los años 2000 y 2015 hubo aproximadamente 381.790 muertes por año en España, siendo la ECV la principal causa (un 32% del total de muertes) con una media de 121.758 individuos por año. A pesar de ser la primera causa de muerte a nivel global, la mortalidad por ECV ha sido la segunda causa de muerte en hombres (31,9% del total de muertes en hombres) tras la mortalidad por tumores desde 1999; en cambio, en mujeres la ECV continúa siendo la principal causa de muerte en 2010 (32,3%).

Dentro de la ECV, las enfermedades isquémicas fueron las que causaron un mayor número de muertes en el período estudiado. El infarto de miocardio es, dentro de las enfermedades isquémicas, la que presenta una mayor frecuencia (30% de la mortalidad total por ECV, 37% en hombres y 23% en mujeres) seguida de las enfermedades cerebrovasculares (26% de la mortalidad total por ECV, 24% en hombre y 28% en mujeres).

En 2015 la ECV fue la primera causa de admisión hospitalaria en hombres (15,3% del total) y la segunda en mujeres (10,7%) superada únicamente por las admisiones por complicaciones en el embarazo, nacimiento y el puerperio (19,2%). Entre las ECVs, las causas más frecuentes de hospitalización fueron: el fallo cardíaco (18% de las hospitalizaciones por ECV), las enfermedades isquémicas (18%) y las enfermedades cerebrovasculares (17%).

El hecho de que estas enfermedades continúen siendo la principal causa de muerte y hospitalización en España, a pesar de las mejoras a nivel de prevención diagnóstica y tratamiento (Mensah et al., 2017) probablemente sea debido principalmente al envejecimiento de la población y a la creciente prevalencia de los factores de riesgo asociados (Cinza Sanjurjo et al., 2017; Rodríguez-Alvarez et al., 2020; Ruiz-García et al., 2018).

#### **Distribución por género y edad**

La tasa de mortalidad entre los años 1999 y 2010 se mantuvo estable y baja para los grupos de edad <20, [20-34] y [35-49]. Esta tasa aumenta exponencialmente a partir de los 50 años y mantiene valores incluso más elevados a partir de los 75; este crecimiento se observó tanto en hombre como mujeres y en todas las enfermedades estudiadas. Umbria y colaboradores describieron una tasa de mortalidad por ECV significativamente superior en hombres respecto a mujeres (Umbria et al., 2014).

Al analizar las diferentes ECV por separado también se apreciaron diferencias significativas en función del género. Se observó una tasa de mortalidad significativamente superior en mujeres (en todos los grupos de edad) en las enfermedades hipertensivas y en el fallo cardíaco, mientras que la tasa de mortalidad fue significativamente superior en hombres para el infarto de miocardio y el grupo de otras enfermedades isquémicas. Esto se puede deber a que las mujeres tienen un menor riesgo de enfermedades coronarias que los hombres, y por lo tanto es más probable que lleguen a edades más avanzadas en las cuales la mortalidad por fallo

cardíaco es más frecuente (George et al., 2015). Estas diferencias a nivel de género no se observaron para las enfermedades cerebrovasculares ni la aterosclerosis.

### Tendencia temporal

En el análisis de la evolución temporal de la tasa de mortalidad (estandarizada por edad) en individuos de 50 años o más durante el periodo 1999 - 2010 se observó una disminución significativa para ambos géneros (una disminución del 32% en hombres y del 31% en mujeres). Por lo tanto, el riesgo de morir por una ECV en España está disminuyendo, probablemente gracias a la mejora en el estilo de vida y los tratamientos, incrementando las tasas de supervivencia (Segovia, 2013).

Exceptuando las enfermedades isquémicas y las enfermedades hipertensivas, todas las enfermedades analizadas por Umbria y colaboradores presentaron una disminución significativa de la tasa de mortalidad. La tasa de mortalidad de las enfermedades isquémicas se mantuvo más o menos constante y la de las enfermedades hipertensivas incrementó significativamente. Este incremento es consistente con los datos analizados en varios países europeos (Tao et al, 2015) y Estados Unidos (Kung & Xu, 2015), y puede ser debido al incremento en la prevalencia de la obesidad y diabetes (Mensah et al. 2017).

El descenso en la mortalidad cardiovascular total es debido principalmente a un descenso anual del 5% en la mortalidad por IM y del 3,7% en enfermedades cerebrovasculares.

Durante el periodo analizado se observó una disminución de las tasas de morbilidad por enfermedades isquémicas y cerebrovasculares y se mantuvieron constantes para el resto de las enfermedades.

Sin embargo, igual que ha sucedido en otros países, en los últimos años (2014-2018) la disminución en las tasas de mortalidad por ECV se ha ido reduciendo o estabilizando (Cayuela et al., 2021).

### Diferencias entre comunidades autónomas

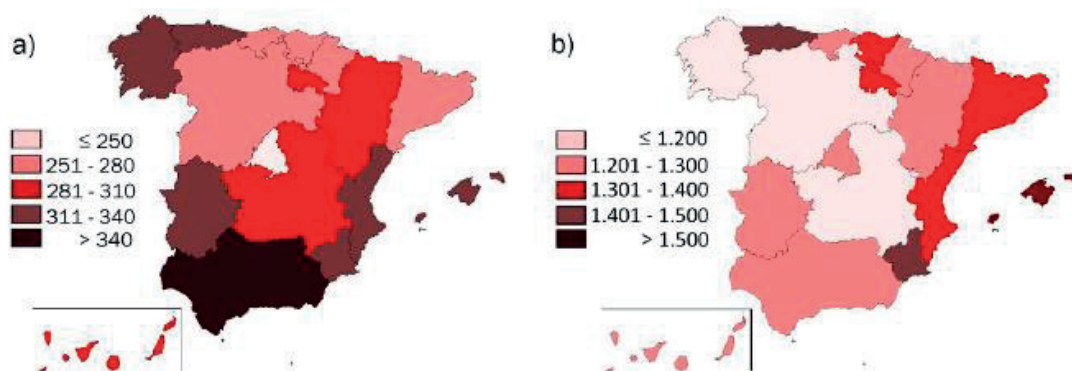


Figura 11. A) Tasa de mortalidad y B) Tasa de morbilidad hospitalaria debidas a ECV en individuos de más de 50 años, en las diferentes comunidades autónomas del estado español. Fuente: Umbria et al. 2014.

Teniendo en cuenta únicamente el grupo de individuos con edades iguales o superiores a los 50 años, las tasas promedio de mortalidad y morbilidad (estandarizadas por edad) en el periodo de tiempo entre los años 2000 y 2015 mostraron diferencias significativas entre las comunidades autónomas (Figura 10). Estas diferencias se observaron para todas las enfermedades analizadas.

La distribución de la mortalidad por ECV parece seguir un gradiente descendiente de Sud a Norte (Boix Martínez et al., 2003), exceptuando Galicia y Asturias, que presentan unas tasas mucho más elevadas al inicio del periodo, lo que se ve reflejado en el promedio. Algunos autores apuntan entre los factores con mayor influencia los cambios en las condiciones de vida y hábitos socioculturales, como pueden ser la dieta y las desigualdades socioeconómicas (Graciani et al.2003). Específicamente, los últimos datos del Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA) muestran un gradiente inverso educacional en algunos de los principales factores de riesgo (Pérez-Hernández et al., 2017).

# Justificación y objetivos





Con el continuo progreso en el tratamiento de las enfermedades y la prolongación de la esperanza de vida, las enfermedades crónicas no transmisibles han pasado a ser el centro de atención. Entre estas, se encuentra la enfermedad cardiovascular.

En el estudio elaborado por Umbria (2019c) se ha evidenciado que la ECV es la causa principal de muertes y altas hospitalarias en el país, constatándose una disminución en la tasa de mortalidad que no se observa en la tasa de morbilidad. De acuerdo con esta misma fuente, en el Estado Español, la ECV es la que presenta una tasa de mortalidad más elevada (2,57), siendo especialmente pronunciada en Castilla y León (3,32).

A partir de estos datos, se puede constatar que la ECV supone un problema socioeconómico global ya que no sólo es la principal causa de muerte a nivel del Estado Español, sino también a nivel mundial, reduciendo considerablemente la calidad de vida de los individuos afectados, con frecuencia con consecuencias incapacitantes. Las principales formas de ECV son la cardiopatía isquémica de origen coronario (concretamente el infarto de miocardio) y el accidente cerebrovascular.

Numerosos estudios (Lacey et al., 2017; Khan et al., 2018; Tsatsakis et al.; 2019; Wright et al., 2019; Sharifi-Rad et al., 2020) han destacado importantes factores de riesgo cardiovascular, y la mayor parte de ellos comparten como característica común que el estrés oxidativo está en la base del desarrollo de la ECV en algunos individuos, mientras que, en otros con perfiles de riesgo idénticos, no. Esto nos lleva a considerar que se debe profundizar más en el estudio de la ECV y que la mitocondria puede hallarse implicada.

El correcto funcionamiento mitocondrial es una pieza clave del metabolismo celular, principalmente de la producción de energía. Dicho funcionamiento es especialmente relevante en tejidos con altas necesidades energéticas como el sistema nervioso, cardiovascular, etc; por lo tanto, su análisis en relación con el riesgo de ECV es de interés. Se ha observado que mitocondrias anormales afectan a los procesos fisiopatológicos de la ECV en distintos aspectos:

- a) los cardiomiocitos dependen de la fosforilación oxidativa para producir ATP, una disminución en la eficiencia de la producción de energía por parte de la mitocondria puede dañar directamente la capacidad contráctil de los cardiomiocitos.
- b) el flujo de  $Ca^{2+}$  es el núcleo de la actividad cardíaca en general; la incapacidad de la red mitocondrial para regular la homeostasis del calcio podría alterar la función cardíaca.
- c) aunque la homeostasis inflamatoria fisiológica tiene cierto efecto protector (tanto en la función cardíaca como en la circulación vascular), la acumulación de mitocondrias dañadas en el citoplasma de cardiomiocitos o células endoteliales puede causar inflamación patogénica.
- d) la disfunción mitocondrial severa y acumulación de mitocondrias dañadas pueden iniciar una serie de muertes celulares que eventualmente producen daño patológico.
- e) alteraciones en el transporte de electrones de la OXPHOS puede incrementar la formación de ROS promoviendo el daño endotelial y procesos ateroscleróticos.

Teniendo en cuenta la relevancia de la disfunción mitocondrial en la salud cardiovascular, es razonable suponer que la variación en el genoma mitocondrial podría afectar al correcto funcionamiento mitocondrial y por lo tanto al riesgo de ECV.

En esta línea de pensamiento se han realizado diversos tipos de estudios. Los primeros, investigaban esta relación basándose en el análisis de pocos SNPs, principalmente aquellos que permitían la determinación del haplogrupo mitocondrial. Posteriormente, con la aparición



de la secuenciación Sanger, se amplió el análisis a toda la región control (NCR) de la molécula de DNA mitocondrial. En los últimos años, con la aparición y el posterior abaratamiento de las técnicas de secuenciación de segunda generación o secuenciación masiva, ha sido posible analizar la variación del mtDNA completo. Este tipo de trabajos permiten no únicamente caracterizar el genoma mitocondrial individual, sino también relacionar haplogrupos (e incluso profundizar el análisis mediante la clasificación en subhaplogrupos) o variantes de la región control con el riesgo de ECV, además de evaluar el papel de las mutaciones en los genes mitocondriales, las cuales podrían afectar directamente a la función mitocondrial, ya sea mediante la alteración de la OXPHOS o de la transcripción y traducción del mtDNA.

Estas investigaciones han hecho posible determinar la existencia de asociación entre ciertos haplogrupos y el riesgo de ECV, pudiendo actuar tanto como factores de riesgo como de protección. Sin embargo, los resultados son bastante dispares, dependiendo tanto de la población como de la enfermedad cardiovascular concreta analizada. Es importante mencionar que una gran parte de los estudios realizados se han llevado a cabo en población asiática (Nishigaki et al., 2007a, Nishigaki et al., 2007b; Liu et al., 2019; F. Xiao et al., 2020), siendo minoritarios aquellos realizados en población caucásica (Hudson et al., 2014, Umbria et al., 2019b; Roselló-Díez et al., 2021).

Las mutaciones puntuales en la secuencia de DNA mitocondrial no son la única manera en la que se puede ver alterado el correcto funcionamiento de la mitocondria. En concreto el número de copias de mtDNA, puede reflejar en gran medida la función mitocondrial y por ello, recientemente, se está valorado su utilización como biomarcador de la misma.

Reducciones *in vitro* del mtDNA-CN han sido asociadas a una inhibición de la transcripción mitocondrial y a una reducción de los niveles de las proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa, específicamente ND1, CYB y CO1 (Jeng et al., 2008). La reducción en la capacidad respiratoria, inducida por los niveles de mtDNA-CN reducidos, puede comportar consecuencias patogénicas. El mtDNA-CN también ha sido relacionado con la alteración de la producción de ROS, observándose un incremento de la producción al reducirse el mtDNA-CN.

A pesar de la abundancia de trabajos que hacen referencia al papel que juega el mtDNA en relación con la ECV, aún es poca la información que existe sobre el efecto de variantes mitocondriales. Y aún son menos los estudios que investigan el genoma mitocondrial completo e incorporan información sobre el número de copias del genoma mitocondrial.

Teniendo en cuenta las anteriores premisas, la presente Tesis Doctoral parte de la siguiente hipótesis: “el genoma mitocondrial juega un papel determinante en el desarrollo de la ECV”.

Así pues, la presente Tesis Doctoral se propone como **objetivo general** “analizar la variabilidad genética que determina normalidad o patología de enfermedad cardiovascular”, examinando en concreto el accidente cerebrovascular (ACV) y el infarto de miocardio (IM), en una población española peninsular, más concretamente en la población de Castilla y León.

Los objetivos concretos en el presente estudio son los siguientes:

1. Evaluar el papel de los factores de riesgo clásicos relacionados con la ECV.
2. Verificar la fiabilidad de la metodología utilizada en el procesamiento de las muestras.
3. Caracterizar el genoma mitocondrial en relación a las ECV estudiadas (ACV, IM, ambas patologías y ECV global).
  - 3.1. Determinar la distribución de los haplogrupos mitocondriales en las distintas clases muestrales, con la finalidad de identificar el papel que puede estar jugando el haplogrupo en la susceptibilidad de sufrir una ECV.
  - 3.2. Generar un haplotipo preciso para cada muestra y analizar posibles diferencias entre casos y controles en la distribución de las mutaciones (homoplasmias y heteroplasmias) a lo largo del genoma mitocondrial.
  - 3.3. Evaluar el posible efecto acumulativo de variantes raras en el riesgo de ECV.
  - 3.4. Investigar el papel de las mutaciones mitocondriales individuales (ya sea en homoplasmia o en heteroplasmia) en relación con el riesgo de ECV.
4. Examinar la relación entre el número de copias de DNA mitocondrial y la susceptibilidad a sufrir una ECV.

# Material y métodos





### Recolección de muestras y extracción de DNA

En este estudio se han utilizado 344 muestras de individuos con historial de enfermedad cardiovascular y sus respectivos controles, apareados en función de factores de riesgo no modificables (edad, género y origen geográfico). El análisis exhaustivo de los casos ha permitido apreciar las distintas situaciones recogidas en la Tabla 2:

*Tabla 2. Número de individuos en las distintas situaciones en función de la/s ECV que han presentado.*

| Patología                        | Individuos |
|----------------------------------|------------|
| Accidente cerebrovascular (ACV)  | 110        |
| Infarto de Miocardio (IM)        | 167        |
| Ambas patologías (ACV e IM)      | 67         |
| Enfermedad cardiovascular global | 344        |

Esta situación aconseja analizar los datos respetando estas agrupaciones a la vez que realizar un análisis global de la enfermedad cardiovascular. Las agrupaciones aquí propuestas se tendrán en cuenta a lo largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Las muestras utilizadas provienen del estudio longitudinal caso-control *Cardiovascular Disease Risk Study of Castile and León* (Vega Alonso et al., 2007), iniciado en 2004 (con seguimientos en 2009 y 2014). En dicho estudio se seleccionaron, aleatoriamente, individuos mayores de 15 años de Castilla y León y se examinaron en relación a factores de riesgo cardiovascular. El muestreo se llevó a cabo siguiendo los principios de la declaración de Helsinki, tras obtener el consentimiento informado de todos los participantes. Las muestras de sangre fueron almacenadas y anonimizadas, en el Banco Nacional de DNA de Salamanca ([www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)), extrayéndose el DNA mediante un proceso automatizado con un robot *Autopure LS* (GentraSystem, Minneapolis, MN) y almacenado a -20°C.

Para cada individuo se cuenta con información de las siguientes variables:

- Edad: observándose 6 categorías [- ≤44, 45-49, 50-54, 55-59, 60-64 y ≥65 -].
- Género: hombre (1) o mujer (2).
- Origen geográfico: considerando distintas zonas [región Norte (1) – León, Palencia y Burgos –, Centro (2) – Zamora, Valladolid y Soria – y Sud (3) – Salamanca, Ávila y Segovia–].
- Historial de hipertensión: estimando un individuo como hipertenso (1) si presentaba valores superiores a ≥140/90 mmHg.
- Historial de hipercolesterolemia: valorando como hipercolesterolemia (1) valores de colesterol >200mg/dl.
- Historial de diabetes: contemplando dos estados [diabético (1) o no diabético (2)].
- Consumo de cigarrillos: divididos en 3 categorías [no fumadores (1), exfumadores (2) y fumadores (3)].
- Sobrepeso u obesidad: se consideran individuos con esta característica (1) aquellos que presentan un índice de masa corporal (BMI) ≥25 kg/m<sup>2</sup>.
- Perímetro abdominal: el rango de riesgo (1) se inicia en 80 cm para mujeres, y 94 cm para hombres.
- Presencia de triglicéridos en sangre: examinando niveles altos (1) valores ≥70 mg/dl.

Para las variables d, e, h, i y j los individuos con valores dentro del rango considerado normal se marcaron con el número 2.

### Secuenciación del mtDNA

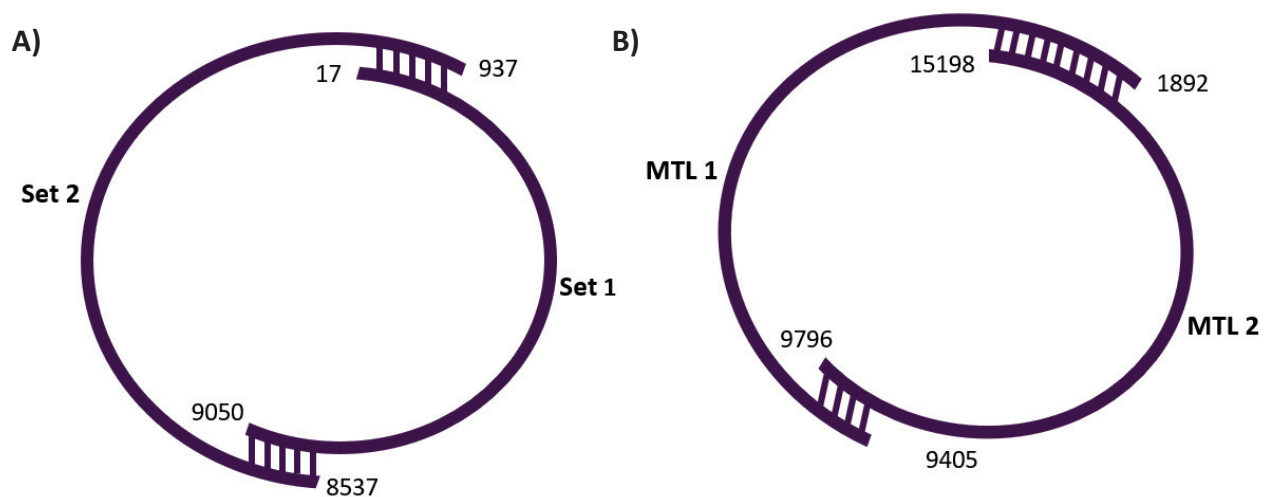
En cada una de las 688 muestras analizadas se ha procedido al análisis de la totalidad del genoma mitocondrial mediante la técnica de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación [Next Generation Sequencing (NGS)]. En este procedimiento se incluyen las siguientes etapas:

#### Amplificación

El mtDNA se amplificó en 2 fragmentos solapantes (920bp en un extremo y 513bp en el otro) de aproximadamente 9kb cada uno (Figura 11A, Tabla 3), utilizando 2 parejas de *primers* (Mikkelsen et al., 2009). Para cada reacción de PCR se utilizó  $\mu\text{l}$  (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) de cada *primer* (*Forward and Reverse*), 1  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{M}$ ) de mix de dNTPs, 5  $\mu\text{l}$  (10X) de *buffer*, 2  $\mu\text{l}$  (50 mM) de  $\text{MgSO}_4$ , 0,2  $\mu\text{l}$  (2 U/ $\mu\text{l}$ ) de *Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase* (ThermoFisherScientific) y 1  $\mu\text{l}$  (aproximadamente 50 ng) de DNA, en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ .

El proceso de amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de PCR (30s a 94°C, 30s a una temperatura de *annealing* de 59/60°C en función de la pareja de *primers* y 10min a 68°C) y un paso final de extensión de 7 min a 72°C. Los resultados de la amplificación se observaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

En algunas muestras no se consiguió una reacción de PCR exitosa, de manera que se procedió a amplificar el genoma mitocondrial utilizando la metodología descrita por Stawski et al. 2013. Se trata de una amplificación nuevamente mediante 2 fragmentos solapantes (9 y 11kb). Los cebadores necesarios para generar estos 2 nuevos fragmentos (Figura 11B, Tabla 3) están localizados en posiciones diferentes del genoma mitocondrial (respecto a los de Mikkelsen et al., 2009).



**Figura 112.** Representación gráfica de los productos de la amplificación del genoma mitocondrial en la mayoría de las muestras. A) Fragmentos obtenidos mediante la utilización de los cebadores descritos por Mikkelsen et al., 2009. B) Fragmentos obtenidos mediante la amplificación con los primers descritos por Stawski et al., 2013.

Aun así, algunas muestras no amplificaron, posiblemente debido al gran tamaño de los fragmentos a generar. En estos casos, se procedió a la amplificación del mtDNA en 9 segmentos más cortos, de un tamaño comprendido entre 1,7 y 5,5 kb aproximadamente (Tabla 3). En estas PCRs se utilizaron los *primers* y condiciones descritas por Ramos et al., (2009) y González, M. (2019).

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la amplificación del genoma mitocondrial en fragmentos solapantes. Se incluyen las 3 estrategias de amplificación empleadas.

| Fragmento de mtDNA | Primer sentido directo (5'-3')                    | Primer sentido reverso (5'-3')                   | Referencia            |
|--------------------|---|--|-----------------------|
| Set 1              | <u>Posición 17</u><br>CCCTATTAACCACTCACGGGAGC     | <u>Posición 9050</u><br>CCAATTAGGTGCATGAGTAGGTGG | Mikkelsen et al. 2009 |
| Set 2              | <u>Posición 8537</u><br>ATCTGTTGCTTCATTGCCCC      | <u>Posición 937</u><br>ACGCCGGCTTCTATTGACTTGGG   | Mikkelsen et al. 2009 |
| MTL1               | <u>Posición 9405</u><br>AAAGCACATACCAAGGCCAC      | <u>Posición 1892</u><br>TTGGCTCTCCTTGCAAAGTT     | Stawski et al. 2013   |
| MTL2               | <u>Posición 15198</u><br>TATCCGCCATCCCATACATT     | <u>Posición 9796</u><br>AATGTTGAGCCGTAGATGCC     | Stawski et al. 2013   |
| Fragmento 2        | <u>Posición 16488</u><br>CTGTATCCGACATCTGGTTCCT   | <u>Posición 1677</u><br>GTTTAGCTCAGAGCGGTCAAGT   | Ramos et al. 2009     |
| Fragmento 3A       | <u>Posición 1404</u><br>ACTTAAGGGTCGAAGGTGGATT    | <u>Posición 2801</u><br>TAATGCAGGTTTGGTAGTTTA    | González 2019         |
| Fragmento 3B       | <u>Posición 2646</u><br>GGTTCAGCTGTCTCTTACTTT     | <u>Posición 4421</u><br>CTTATTTAGCTGACCTTACTT    | González 2019         |
| Fragmento 4A       | <u>Posición 3734</u><br>AAGTCACCCTAGCCATCATTCTA   | <u>Posición 5017</u><br>GAGGAGTATGCTAAGATTTTG    | Ramos et al. 2009     |
| Fragmento 4B       | <u>Posición 4914</u><br>CATATACCAAATCTCTCCCTCAC   | <u>Posición 6739</u><br>GATATCATAGCTCAGACCATACC  | Ramos et al. 2009     |
| Fragmento 5A       | <u>Posición 6511</u><br>CTGCTGGCATCACTATACTACTA   | <u>Posición 8167</u><br>CTCCACAGATTTTCAGAGCATTGA | Ramos et al. 2009     |
| Fragmento 5B       | <u>Posición 7713</u><br>TCCTAACACTCACAACAAAAC     | <u>Posición 9647</u><br>AGCTCAGGTGATTGATACTCC    | Ramos et al. 2009     |
| Set 2A             | <u>Posición 8537</u><br>ATCTGTTGCTTCATTGCCCC      | <u>Posición 12226</u><br>CAGTTCTTGTGAGCTTTCTCGG  | González 2019         |
| Set 2B             | <u>Posición 11977</u><br>CTCCCTCTACATATTTACCACAAC | <u>Posición 937</u><br>ACGCCGGCTTCTATTGACTTGGG   | González 2019         |

### Purificación

La purificación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo utilizando el kit *DNA Clean&Concentrator™-5* (ZymoResearch) o el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up* (Cultek), siguiendo, en ambos casos, las pautas indicadas por el fabricante.

### Cuantificación

Esta se realizó en el Servicio de Genómica i Bioinformática (SGB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) utilizando el Kit *QubitdsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies) y el fluorómetro Qubit®2.0.

### Elaboración de las librerías

Una vez cuantificados los productos de PCR, se mezclaron equimolarmente los distintos fragmentos de mtDNA de cada muestra, de acuerdo con los requerimientos necesarios para la realización de la librería (0,4ng/μl). El cálculo de la molaridad se realizó utilizando la calculadora *Biomath Calculator* de Promega (<https://www.promega.es/resources/tools/biomath/>) teniendo en cuenta el fragmento de los tamaños a mezclar (en bps) y la cantidad de DNA que de la que se disponía de cada fragmento (en μg).

Las librerías se generaron utilizando el kit *NexteraXT DNA Sample Preparation* (Illumina) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, descritas brevemente a continuación.

El primer paso es la tagmentación del DNA y la unión de adaptadores. Para esto, la tecnología Nextera utiliza transposoma, que son complejos formados por una transposasa (Tn5) y un transposón, que fragmentan el DNA molde dando lugar a roturas de doble cadena.

A continuación, se incorporaron unos índices o etiquetas (usando una indexación dual para generar una combinación diferente para cada muestra) mediante una PCR limitada en el número de ciclos. Las librerías amplificadas se purificaron utilizando los *AMPure XP Beads* (Beckman-Coulter) para eliminar aquellos fragmentos de DNA demasiado cortos. Posteriormente, las librerías se normalizaron y juntaron para los pasos finales de desnaturalización y dilución.

### Secuenciación

Esta librería se secuenció por ambos extremos (*paired-end*) 2x250bp ciclos por lectura utilizando la plataforma de secuenciación MiSeq de Illumina en el SGB del Servicio de Genómica y Bioinformática de la Universidad Autónoma de Barcelona.

### Tratamiento de los datos

Los archivos FASTQ generados durante la secuenciación se almacenaron temporalmente en BaseSpace ([www.basespace.illumina.com](http://www.basespace.illumina.com)). A partir de estos archivos se realizan los análisis de calidad y de datos.

### Cuantificación relativa del número de copias de mtDNA

La cantidad relativa de mtDNA mitocondrial, definida como la *ratio* entre el número de copias de un fragmento de gen mitocondrial (en nuestro caso, la Humanina, HN1; péptido localizado en el gen mitocondrial RNR2) y de un fragmento de gen nuclear de copia única (la Presenilina 2, PSEN2; localizado en el cromosoma 1), se determina mediante una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Dicha técnica es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite controlar como se acumula el producto de DNA resultante de cada ciclo de PCR mediante la utilización de una polimerasa termoestable y un fluorocromo.



## Material y métodos

Le eficiencia de la reacción de PCR es un elemento importante para interpretar correctamente los resultados de la qPCR. Este parámetro depende del ensayo, del rendimiento de la mezcla maestra (mix) y de la calidad de la muestra, y se calcula en función de una curva estándar.

Para definir la curva estándar de referencia en cada qPCR, durante el proceso de puesta punto de la técnica, se generaron 2 series de diluciones 4X y 5X (1:4:16:64 y 1:5:25:125) con el objetivo de determinar cuál de ellas proporciona unos mejores resultados. Finalmente se decidió emplear la serie 1:5:25:125 (Figura 12) puesto que las curvas obtenidas a partir de ella presentaban un mayor solapamiento en la eficiencia (entre la qPCR mitocondrial y la qPCR nuclear), manteniendo los valores de R y R<sup>2</sup> de curva estándar por encima del 0,99. El valor de R<sup>2</sup> es un término estadístico que indica lo bueno que es un valor para predecir otro, por lo tanto, un valor de R<sup>2</sup> > 0,99 proporciona buena confianza en la correlación de los dos valores.



**Figura 113.** Serie de diluciones seleccionada para realizar la curva estándar en cada PCR cuantitativa a tiempo real.

Los *primers* utilizados para amplificar fragmentos de ambos genes (HN1 y PSEN2) son los siguientes: a) para el genoma mitocondrial: HN1\_U1: 5' AGT ACC TAA CAA ACC CAC AGG 3' y HN1\_L1: 5' - TTGGATCAATTGAGTATAGTAGT - 3'; b) para el gen nuclear PS2ex11U: 5' CTG TGC ACG CCT CTT CAG T 3' y PS2ex11L: 5' CTG TGA GCC TTG GTC TCA A 3'.

Para cada muestra se efectúan ambas qPCRs con los siguientes componentes: 12,5µl de Mix, 0,25µl (concentración 1 µM) de cada *primer*, 50ng de DNA y 11µl de H<sub>2</sub>O. El programa utilizado en el termociclador para el gen mitocondrial incluye: un primer paso de desnaturalización de 15' a 95°C; seguido de 40 ciclos de 15'' a 95°C, 18'' a 57°C y 25'' a 72°C, y un *melting* de 50 a 99°C para acabar con una extensión de 1' a 40°C; en el caso del gen nuclear se procede a desnaturalizar el nDNA en las mismas condiciones que el mtDNA; seguido de 33 ciclos de 15'' a 95°C, 18'' a 62°C y 25'' a 72°C, y el mismo *melting*.

Todas las muestras se analizaron por duplicado, utilizando el Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) y el termociclador RotorGene6000 (Qiagen).

## Análisis de datos

### Análisis de la calidad de la secuenciación mitocondrial

Previo al análisis de las secuencias de genoma mitocondrial, se procedió a realizar un control de la calidad de los datos generados en la secuenciación. Estos datos se recogen en archivos en formato FASTQ, una extensión del formato FASTA que permite almacenar la calidad de cada nucleótido (Cock et al., 2010). Debido a la metodología de secuenciación empleada (*paired-end*), se obtuvieron 2 archivos para cada una de las muestras analizadas. Estos archivos (número de muestra-R1 y número de muestra-R2) hacen referencia a los 2 ciclos de lecturas. El archivo R1 recoge los *reads* generados en el primer ciclo de lecturas tanto en sentido directo como reverso de la cadena de mtDNA, mientras que el archivo R2 recoge los *reads* generados en el segundo ciclo, en ambos sentidos, de la cadena complementaria del mtDNA.

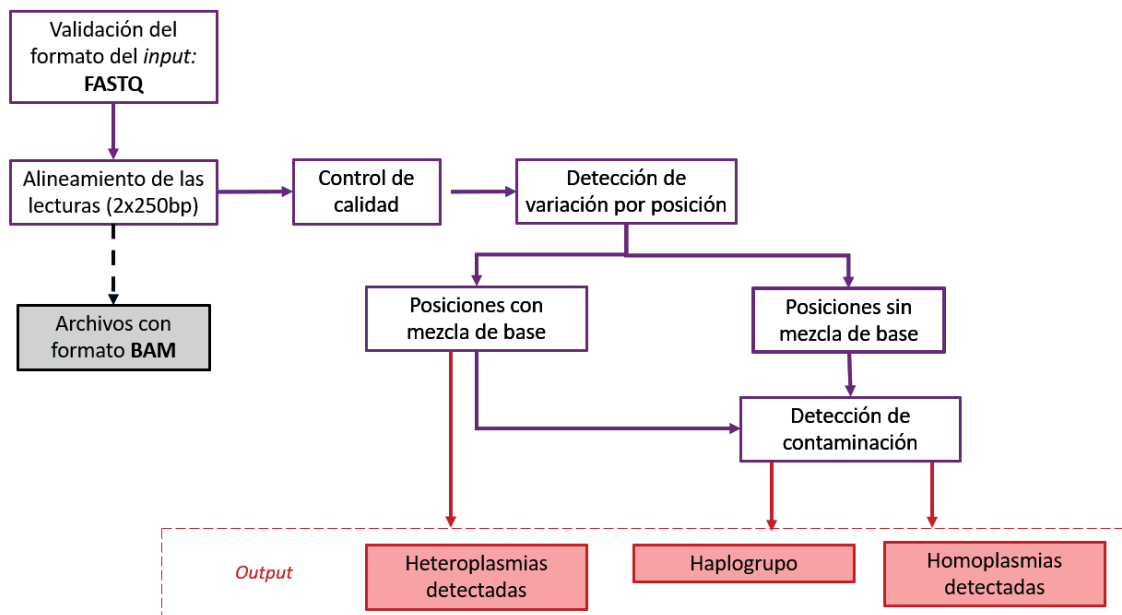
La calidad de estos archivos se examinó utilizando el programa FASTQC (Andrews, 2010). Para cada una de las muestras se valoraron una serie de parámetros:

- 1) Calidad de la secuencia por base.
- 2) Calidad por cuadrante de la *flowcell* o celda de flujo.
- 3) Valores promedio de calidad por secuencia.
- 4) Proporción de bases por posición.
- 5) Contenido de GC.
- 6) Contenido de bases indeterminadas.
- 7) Distribución de la longitud de las secuencias.
- 8) Niveles de duplicados.
- 9) Secuencias sobrerrepresentadas.
- 10) Contenido de adaptadores
- 11) Contenido de *K-mers*.

### Determinación de la variabilidad mitocondrial y del haplogrupo

Una vez realizado el control de calidad, los datos se analizaron utilizando el *pipeline* implementado por el programa mtDNA-Server (Weissensteiner et al., 2016). Este proceso cuenta con diferentes fases: 1) Alineamiento de las lecturas mediante la herramienta BWA-mem (*Burrow-Wheeler Alignment – maximal exact match*). 2) Control de calidad de los ficheros Bam obtenidos del alineamiento. 3) Análisis de los archivos Bam para detectar variantes. 4) Detección de heteroplasmas. 5) Detección de haplogrupo de acuerdo con lo descrito en el *Phylotree* (Van Oven & Kayser, 2009) utilizando el programa Haplogrep.

La implementación del software mtDNA-Server (Figura 13) genera como resultado varios archivos de texto en los que se recoge la información para cada muestra sobre las homoplasmas y heteroplasmas detectadas y el haplogrupo al cual pertenece el individuo.



**Figura 114.** Esquema del proceso bioinformático realizado por el mtDNA-server. Imagen modificada de Weissensteiner et al., 2016. El input son 2 archivos Fastq de enlaces apareados (un Fastq R1 y un R2 por muestra).

Todos los datos obtenidos se volcaron en diversas bases de datos utilizando una aplicación ad-hoc de R basada en Shiny creada por Marta Coronado (Servei de Genòmica i Bioinformàtica de la UAB) para este fin. El script está disponible en el repositorio de Github: <https://github.com/marta-coronado/mtDNA-analysis>.

### Cálculo de la carga mutacional ajustada

Para el cálculo de la carga mutacional se seleccionaron las variantes en homoplasmas que se encontraban en genes de las distintas subunidades de la OXPHOS y que provocaban un cambio aminoacídico. La carga mutacional permite evaluar el efecto acumulativo de variantes raras moderadamente deletéreas y compararlo entre casos y controles (Elson et al., 2006)

La valoración de la patogenicidad de cada mutación se realizó utilizando los valores de MutPred2 (Pejaver et al., 2020). Los algoritmos de MutPred otorgan un valor de patogenicidad entre 0 y 1, siendo 0 una sustitución benigna. Los valores de patogenicidad superiores a 0,5 se pueden considerar hipótesis accionables (*actionable hypotheses*), indicando que la variante probablemente tenga un efecto deletéreo sobre la función de las proteínas (Pienaar et al., 2017). Valores por encima de 0,75 se pueden considerar hipótesis seguras (*confident hypotheses*).

En el cálculo de la carga mutacional se sumaron los valores MutPred superiores a 0,5 generados para cada una de las variantes no sinónimas de cada individuo. Excluyendo las variantes con un valor inferior a 0,5 puesto que tienden a ser variantes más comunes en la población de manera que se reduciría el efecto de estratificación poblacional remarcando el impacto de las variantes raras (Venter et al., 2017). Posteriormente, la carga mutacional se ajustó dividiéndola entre el número de variantes no-sinónimas presentes en cada individuo.

También se evaluó el papel de las variantes halladas en los genes de tRNA. El nivel de patogenicidad de estas variantes se calculó mediante el *Mitochondrial tRNA Informatics Predictor (MitoTIP) Scoring system* (Sonney et al., 2017). Este sistema de puntuaciones tiene en cuenta el historial previo de la variante, la conservación nucleotídica y la posición de esta variante en la estructura secundaria del tRNA para otorgar un valor de patogenicidad a cada variante y ubicarla en un percentil (Tabla 4).

**Tabla 4.** Descripción de las distintas categorías en las que se clasifican los valores de patogenicidad predichos por MitoTIP y su interpretación.

| Valor         | Percentil  | Interpretación           |
|---------------|------------|--------------------------|
| > 16,25       | >75 - 100% | Probablemente patogénica |
| 12,66 - 16,25 | >50 - 75%  | Posiblemente patogénica  |
| 8,44 - 12,66  | >25 - 50%  | Posiblemente benigna     |
| < 8,44        | 0 - 25%    | Probablemente benigna    |

### Análisis estadísticos

Factores de riesgo clásicos: Se utilizó la prueba de McNemar (variables dicotómicas) y el test de la media marginal [*marginal mean test* (variables con más de 2 categorías)] para comparar la frecuencia de las variables sociodemográficas, bioquímicas y clínicas (edad, género, origen geográfico, historial de hipertensión, historial de diabetes, historial de hipercolesterolemia, consumo de cigarrillos, sobrepeso u obesidad, perímetro abdominal en rango y la presencia de

niveles altos de triglicéridos) entre casos y controles para determinar posibles variables confusoras (factores de riesgo de ACV o IM).

Distribución de los haplogrupos: Las frecuencias de los haplogrupos, obtenidas en el *output* del pipeline implementado en el *mtDNA-server* (Figura 13), se compararon utilizando la prueba de McNemar. También se calculó el *Odds Ratio* y el intervalo de confianza (CI 95%).

Perfil mitocondrial y carga mutacional: Para comparar el perfil mitocondrial entre casos y controles, se compilaron las variantes fijadas (homoplasmia) y en heteroplasmia en diferentes bases de datos. En relación con las heteroplasmas, únicamente se tuvieron en cuenta heteroplasmas puntuales fiables (fuera de secuencias repetitivas, que pueden ser problemáticas en la NGS) con una frecuencia del alelo menor igual o superior al 3% y con una profundidad (*Depth*) de 1000X o superior. Una vez obtenidas las frecuencias de homoplasmia y heteroplasmia puntual se calculó la Región de Credibilidad Bayesiana al 0,95 (95% CR) utilizando el software SAMPLING (V. Macaulay, comunicación personal).

El número de homoplasmas se comparó entre casos y controles mediante la prueba de Wilcoxon considerando la molécula completa de mtDNA, discriminando entre el segmento codificante y no codificante; estratificando la región codificante en los distintos grupos de genes que configuran los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE) y RNAs (tRNA y rRNA). En estos análisis no se incluyeron los nucleótidos no codificantes que se encuentran en la región codificante del mtDNA. Para comparar las heteroplasmas puntuales se siguió el mismo procedimiento.

Para cada región del genoma mitocondrial también se calculó la *ratio* de mutación, dividiendo el número de mutaciones en base a la longitud de la región en pares de bases (Tabla suplementaria 1). La longitud de cada región se estimó utilizando los datos de inicio y final que se encuentran en la página web del MITOMAP: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/GenomeLocj>.

Para precisar si las diferencias en el número de variantes fijadas están relacionadas con un efecto patogénico, se compararon las cargas mutacionales ajustadas entre casos y controles utilizando el test de Wilcoxon. Esta comparación se realizó tanto para la región codificante completa como en el análisis complejo a complejo.

Variación mitocondrial por posición: Finalmente, cada variante mitocondrial haplotípica individual (en homoplasmia o heteroplasmia) con una frecuencia superior al 5% en la muestra, se analizó individualmente mediante una prueba de McNemar para determinar su hipotética asociación a alguna de las ECVs. El análisis de la asociación de todas las variantes con un resultado significativo en el test de McNemar con el riesgo de ECV se realizó utilizando un modelo de regresión logística condicional (regresión de Cox) teniendo en cuenta el potencial efecto confusor de los factores de riesgo cardiovascular (variables anteriormente clasificadas como confusoras).

Número de copias de mtDNA: El mtDNA-CN se comparó entre casos y controles utilizando un Test T para muestras emparejadas.

Todos los análisis se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics 23 (IMB Corp., 2015). Las diferencias se consideraron significativas a partir de P-valores iguales o inferiores a 0,05. Los datos empleados para realizar los análisis previamente mencionados se recogen digitalmente en el CD adjunto.

### Hits en la filogenia, base de datos de la población e índice de conservación nucleotídica (ICN)

Se compiló el número de hits en la filogenia o el número de ocurrencias mutacionales para cualquiera de las variantes asociadas a alguna de las ECVs de la filogenia mitocondrial actualizada – *mtDNA tree Build 16* (Van Oven & Kayser, 2009) y de Soares et al., 2009. Para calcular la frecuencia de cada variante en la población, se utilizó una base de datos poblacional online (<https://www.mitomap.org/MITOMAP> 2022) con 54.594 secuencias de DNA mitocondrial humano de longitud superior a 15,4kb (Lott et al., 2013).

El índice de conservación nucleotídica se estimó para cada variante asociada al riesgo de ECV a partir de secuencias de referencia de diferentes especies de primates (Tabla suplementaria 3). En el caso de las variantes localizadas en la región codificante, este índice se calculó a partir de 12 especies de primates incluidas en la herramienta MitoMaster (Brandon et al., 2009). Para las variantes localizadas en la región no codificante se utilizaron un total de 48 secuencias que fueron alineadas utilizando Clustal W (Thompson et al., 1994).

Se consideraron posiciones estables aquellas con menos de 6 hits en la filogenia del DNA mitocondrial y un índice de conservación nucleotídica <20% o >80%.

### Predicción de la estructura secundaria de las variantes asociadas al riesgo de ECV

Para determinar el impacto estructural de las variantes asociadas a alguna de las 2 enfermedades cardiovasculares estudiadas, se generó la estructura secundaria del RNA utilizando el *web server RNAfold* con los parámetros establecidos por defecto (Gruber et al., 2008, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Para generar dicha estructura secundaria del RNA se empleó la secuencia completa del gen o de la región hipervariable donde se encontraba la variante. A partir de las probabilidades de bases emparejadas (*base-pair probabilities*), la predicción de energía libre mínima y la entropía posicional de las estructuras predichas se elaboró una estimación de las implicaciones de la variante mitocondrial en la molécula de RNA.

### Cálculo del número de copias relativo de mtDNA

En la determinación del mtDNA-CN se utilizó el software Rotor-Gene para observar los resultados de las qPCR. Se analizó si los valores de R y R<sup>2</sup> de la curva generada por la qPCR (teniendo en cuenta las concentraciones de las diluciones seriadas) eran superiores a 0,99 y que los valores de eficiencia de esta curva estuvieran solapados entre la qPCR de amplificación del gen nuclear y la del gen mitocondrial.

Cumplidas estas 2 premisas se determinaron 3 puntos de eficiencia solapantes para cada pareja de qPCRs y se anotó el valor de *Cyclethreshold* (Ct) de cada una de las muestras en ambas PCR cuantitativas (mitocondrial y nuclear). El Ct es el número de ciclo en el cual la fluorescencia detectada en esa muestra cruza el umbral; a mayor cantidad de DNA molde, menor será el valor de Ct. Estos análisis se realizaron por duplicado para cada muestra y se calculó la desviación estándar entre los valores de Ct de los duplicados para cada uno de los 3 puntos de eficiencia. Las muestras con desviaciones estándar >0,5 se descartaron.

## Material y métodos

Para obtener un único valor de Ct por muestra se realizó un promedio de los valores de los duplicados, y posteriormente un promedio de los 3 puntos de eficiencia. El número de copias relativo de mtDNA se calculó empleando la metodología delta Ct ( $\Delta Ct$ ); es decir, la diferencia entre el Ct del gen mitocondrial y el Ct del nuclear:

$$\Delta Ct = Ct (HN1) - Ct (PSEN2)$$

La comparación del número de copias entre grupos se realizó mediante el cálculo de la  $\Delta\Delta Ct$ , que es la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de los grupos:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Casos}) - \Delta Ct (\text{Controles})$$

A partir de este valor se calcula el *Fold change* siguiendo la fórmula:

$$[\text{mtDNA1}]/[\text{mtDNA2}] = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Valores de *Fold change* inferiores a 0,5 determinaran una disminución significativa de mtDNA y valores superiores a 1,5 un aumento significativo. Se comprobó la presencia de un único pico de fluorescencia en las curvas de *melting* obtenidas en las reacciones de qPCR. Se descartaron aquellas en las que aparecían más picos, o el pico se encontraba desplazado (amplificación de otro fragmento).

# Resultados y discusión







# I. Factores de riesgo clásicos





## Resultados

### Accidente cerebrovascular

La Tabla 3 presenta el porcentaje de individuos, tanto de casos como de controles, incluidos en las categorías de riesgo para los diferentes factores de riesgo no genéticos. Los datos sobre las variables sociodemográficas (edad, género y origen geográfico) utilizadas para emparejar casos y controles se pueden ver en la Tabla suplementaria 4.

En la comparación entre casos y controles de los factores de riesgo no genéticos no se detectó ninguna diferencia significativa entre las frecuencias de ambos grupos, aunque si se pueden observar pequeñas disimilitudes (Tabla 5), siendo la más notoria la que se ve en la hipercolesterolemia, hallándose más frecuentemente en casos.

Dado que estas variables podrían estar influenciándose la una a la otra, realizamos también una regresión logística condicional (CLR) incluyendo todas las variables no apareadas entre casos y controles. Como se puede ver en la Tabla 5, ningún factor de riesgo presentaba una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de ACV.

**Tabla 5.** Características sociodemográficas, bioquímicas y clínicas de individuos con antecedentes de ACV y sus respectivos controles.

|   | Casos<br>n (%) | Controles<br>n (%) | P-valor            | CLR<br>P-valor |
|---|----------------|--------------------|--------------------|----------------|
| <b>Consumo de cigarrillos</b>                   |                |                    |                    |                |
| No fumador                                      | 60 (54,5)      | 62 (56,4)          |                    |                |
| Exfumador                                       | 36 (32,7)      | 38 (34,5)          | 0,431 <sup>b</sup> | 0,786          |
| Fumador   | 14 (12,7)      | 10 (9,1)           |                    |                |
| Hipertensión (≥ 140/90 mmHg)                    | 89 (80,9)      | 88 (80)            | 1 <sup>a</sup>     | 0,738          |
| Diabetes  | 19 (17,3)      | 15 (13,6)          | 0,556 <sup>a</sup> | 0,884          |
| Hipercolesterolemia (> 200 mg/dL)               | 58 (52,7)      | 44 (40)            | 0,082 <sup>a</sup> | 0,109          |
| Soberpeso u obesidad (≥ 25 Kg/m <sup>2</sup> )  | 76 (69,1)      | 81 (73,6)          | 0,568 <sup>a</sup> | 0,842          |
| Perímetro abdominal elevado (> 80 cm o > 94 cm) | 79 (71,8)      | 84 (76,4)          | 0,542 <sup>a</sup> | 0,539          |
| Triglicéridos (≥ 170 mg/dL)                     | 13 (11,8)      | 7 (6,4)            | 0,238 <sup>a</sup> | 0,206          |

<sup>a</sup> p-valor del test de McNemar; <sup>b</sup> p-valor del test de homogeneidad marginal.

Después de demostrar que estas variables no muestran diferencias significativas entre los casos y controles de este estudio, se decidió no incorporarlas en los siguientes análisis.

### Infarto de miocardio

El porcentaje de individuos incluidos en las distintas categorías para los diferentes factores de riesgo clásicos se encuentra recogido en la Tabla 6. Como se puede observar, en esta ocasión, tanto la hipertensión como el hipercolesterolemia son significativamente más frecuentes en individuos con antecedentes de infarto de miocardio que en los controles, a pesar de estar emparejados por género, edad y origen geográfico. Ni el consumo de cigarrillos, la diabetes, el sobrepeso, perímetro abdominal elevado ni los triglicéridos presentan diferencias notables.

## I. Factores de riesgo clásicos

**Tabla 6.** Características sociodemográficas, bioquímicas y clínicas de individuos con antecedentes de IM y sus respectivos controles

|  | Casos      | Controles  | P-valor              |
|--|------------|------------|----------------------|
|  | n (%)      | n (%)      |                      |
| <b>Consumo de cigarrillos</b>                        |            |            |                      |
| No fumador   | 82 (49,1)  | 89 (53,3)  | 0,472 <sup>b</sup>   |
| Exfumador  | 61 (36,5)  | 55 (32,9)  |                      |
| Fumador  | 24 (14,4)  | 23 (13,8)  |                      |
| Hipertensión ( $\geq 140/90$ mmHg)                   | 146 (87,4) | 112 (67,1) | <0,0001 <sup>a</sup> |
| Diabetes   | 39 (23,4)  | 33 (19,8)  | 0,47 <sup>a</sup>    |
| Hipercolesterolemia ( $> 200$ mg/dL)                 | 120 (71,9) | 81 (48,5)  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| Sobrepeso u obesidad ( $\geq 25$ Kg/m <sup>2</sup> ) | 131 (78,4) | 125 (74,9) | 0,519 <sup>a</sup>   |
| Perímetro abdominal elevado ( $> 80$ cm o $> 94$ cm) | 128 (76,6) | 124 (74,3) | 0,688 <sup>a</sup>   |
| Triglicéridos ( $\geq 170$ mg/dL)                    | 23 (13,8)  | 22 (13,2)  | 1 <sup>a</sup>       |

<sup>a</sup> p-valor del test de McNemar; <sup>b</sup> p-valor del test de homogeneidad marginal.

### Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio

En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis de las diversas variables bioquímicas y clínicas que podrían estar afectando al riesgo de sufrir ambas enfermedades (ACV e IM). Tanto la hipertensión como la hipercolesterolemia se encuentran significativamente sobrerrepresentadas en las personas que han manifestado tanto un ACV como un IM. El resto de las variables no muestran diferencias significativas entre ambos grupos.

**Tabla 7.** Características sociodemográficas, bioquímicas y clínicas de individuos con antecedentes tanto de ACV como de IM y sus respectivos controles

|  | Casos      | Controles  | P-valor            |
|--|------------|------------|--------------------|
|  | n (%)      | n (%)      |                    |
| <b>Consumo de cigarrillos</b>                        |            |            |                    |
| No fumador   | 30 (50,75) | 44 (65,67) | 0,343 <sup>b</sup> |
| Exfumador  | 28 (41,70) | 14 (20,90) |                    |
| Fumador  | 5 (7,46)   | 9 (13,43)  |                    |
| Hipertensión ( $\geq 140/90$ mmHg)                   | 63 (94,03) | 50 (74,63) | 0,004 <sup>a</sup> |
| Diabetes   | 18 (16,87) | 11 (16,42) | 0,16 <sup>a</sup>  |
| Hipercolesterolemia ( $> 200$ mg/dL)                 | 44 (65,67) | 28 (41,79) | 0,012 <sup>a</sup> |
| Sobrepeso u obesidad ( $\geq 25$ Kg/m <sup>2</sup> ) | 47 (70,15) | 52 (77,61) | 0,458 <sup>a</sup> |
| Perímetro abdominal elevado ( $> 80$ cm o $> 94$ cm) | 48 (71,64) | 52 (77,61) | 0,584 <sup>a</sup> |
| Triglicéridos ( $\geq 170$ mg/dL)                    | 6 (8,96)   | 8 (11,94)  | 0,774 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> p-valor del test de McNemar; <sup>b</sup> p-valor del test de homogeneidad marginal.

## I. Factores de riesgo clásicos

### Enfermedad cardiovascular global

El análisis comparativo de las variables clínicas entre los 344 casos y sus respectivos controles se encuentra en la tabla 8. Tal y como se puede observar, hallamos diferencias significativas tanto para la hipertensión como la hipercolesterolemia, siendo ambas mucho más frecuentes en los individuos con antecedentes de ECV. El resto de factores de riesgo clásicos no presentan diferencias significativas estadísticamente, aunque el número de individuos no fumadores es bastante superior en controles. Los datos sobre las variables sociodemográficas (edad, género y origen geográfico) utilizadas para emparejar casos y controles se pueden ver en la Tabla suplementaria 4.

**Tabla 8.** Características sociodemográficas, bioquímicas y clínicas de individuos con historial de ECV y sus controles

|  | Casos      | Controles  | P-valor            |
|--|------------|------------|--------------------|
|  | n (%)      | n (%)      |                    |
| <b>Consumo de cigarrillos</b>                        |            |            |                    |
| No fumador   | 176 (51,2) | 195 (56,7) |                    |
| Exfumador  | 125 (36,3) | 107 (31,1) | 0,192 <sup>b</sup> |
| Fumador  | 43 (12,5)  | 42 (12,2)  |                    |
| Hipertensión ( $\geq 140/90$ mmHg)                   | 298 (86,6) | 250 (72,7) | $<0,0001^a$        |
| Diabetes   | 76 (22,1)  | 59 (17,2)  | 0,097 <sup>a</sup> |
| Hipercolesterolemia ( $> 200$ mg/dL)                 | 222 (64,5) | 153 (44,5) | $<0,0001^a$        |
| Sobrepeso u obesidad ( $\geq 25$ Kg/m <sup>2</sup> ) | 254 (73,8) | 258 (75)   | 0,789 <sup>a</sup> |
| Perímetro abdominal elevado ( $> 80$ cm o $> 94$ cm) | 255 (74,1) | 260 (75,6) | 0,725 <sup>a</sup> |
| Triglicéridos ( $\geq 170$ mg/dL)                    | 42 (12,2)  | 37 (10,8)  | 0,620 <sup>a</sup> |


<sup>a</sup> p-valor del test de McNemar; <sup>b</sup> p-valor del test de homogeneidad marginal.

## Discusión

La caracterización de las variables bioquímicas y clínicas mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles tanto para la hipertensión como para la hipercolesterolemia en todos nuestros análisis, a excepción del análisis realizado en individuos únicamente con ACV. En los casos en los que se ha observado una disimilitud, ambas variables se encuentran presentes con mayor frecuencia en los individuos afectados por ECV. Estos resultados concuerdan con la literatura existente, puesto que la hipercolesterolemia y la hipertensión son considerados como los principales factores de riesgo modificables (junto con la edad) tanto de incidencia como de mortalidad por ECV (Donkor, 2018; Jung et al., 2022; Yusuf et al., 2020).

En consecuencia, los resultados obtenidos en el análisis del ACV difieren de los esperados. Por una parte, el hecho de que la hipertensión no sea significativamente más frecuente en casos podría ser debido al alto número de controles en nuestra muestra que tienen hipertensión (80%). Esto podría explicarse por la avanzada edad de los individuos puesto que más del 85% superaban los 60 años, y es conocido que la prevalencia de la hipertensión aumenta con la edad, especialmente a partir de los 60 (Fryar et al., 2017). Por otro lado, las diferencias en la frecuencia de hipercolesterolemia entre casos y controles (C: 52,7% vs CL: 40%) eran mucho más marcadas que para la hipertensión, y podrían no llegar a ser significativas debido al tamaño muestral.

## II. Control de la calidad de la secuenciación





### Resultados

En este apartado de resultados se presenta el análisis de la calidad de las secuencias teniendo en cuenta el total de las muestras (344 casos y sus respectivos controles). En el anexo 1 (Tablas suplementarias 5.1, 5.2 y 5.3) se pueden ver los análisis realizados para los individuos con IM por un lado, los que tienen historia de ACV por otro, y finalmente para aquellos con antecedentes de ambas patologías.

#### Enfermedad cardiovascular global

En relación con los módulos de calidad analizados utilizando el programa FASTQC, enumerados previamente en materiales y métodos, observamos en general buenos resultados. Sin embargo, algunos módulos presentan una disminución de la calidad (Tabla 9 y Tablas suplementarias 6.1 y 6.2).

El 100% de los archivos, tanto de casos como de controles presentan valores óptimos de estadística básica, promedios de calidad por secuencia (módulo 3), contenido de N por base (módulo 6) y contenido de adaptadores (módulo 10).

Respecto a la calidad de la secuencia por base (módulo 1, Figura 14) detectamos diferencias entre los archivos R1 y R2. Los primeros presentan valores muy buenos en el 99,4% de los casos y 100% de los controles, mientras que sólo observamos valores similares en el 28,7% de los archivos R2 de casos y 48,5% de los controles.

El 92,2% de los archivos R1 de casos y el 67,4% de los archivos R1 de controles presentan valores óptimos de calidad por cuadrante de celda de flujo (módulo 2). En los archivos R2 este porcentaje disminuye en casos (64,5%) mientras que en controles es bastante similar (70,3%). Un ejemplo de esta disminución en calidad se puede observar en la Figura 15.

En la gran mayoría de muestras (R1: 95,3% de los casos y 97,4% de los controles; R2: 99,7% de los casos y 100% de los controles) detectamos grandes diferencias en la proporción de base por posición (módulo 4), principalmente en los extremos de las lecturas (Figura 16A). Del mismo modo, tal y como se ejemplifica en la Figura 16B, se ve una desviación generalizada en el contenido teórico de GC (módulo 5) por secuencia cuando se compara con la distribución teórica (95,2% de casos y 70,9% de controles).

En los resultados observamos que todos los archivos, tanto de casos como de controles, presentan una desviación en el parámetro de distribución de longitud de las secuencias (módulo 7). Todos los archivos presentan un patrón muy similar, donde la mayoría de las secuencias presentan un tamaño de 250 nucleótidos, junto con algunas secuencias cortas (Figura 17). El 100% de los archivos presentan valores alterados para los niveles de duplicados (módulo 8), secuencias sobrerrepresentadas (módulo 9) y contenido de *K-mers* (módulo 11).

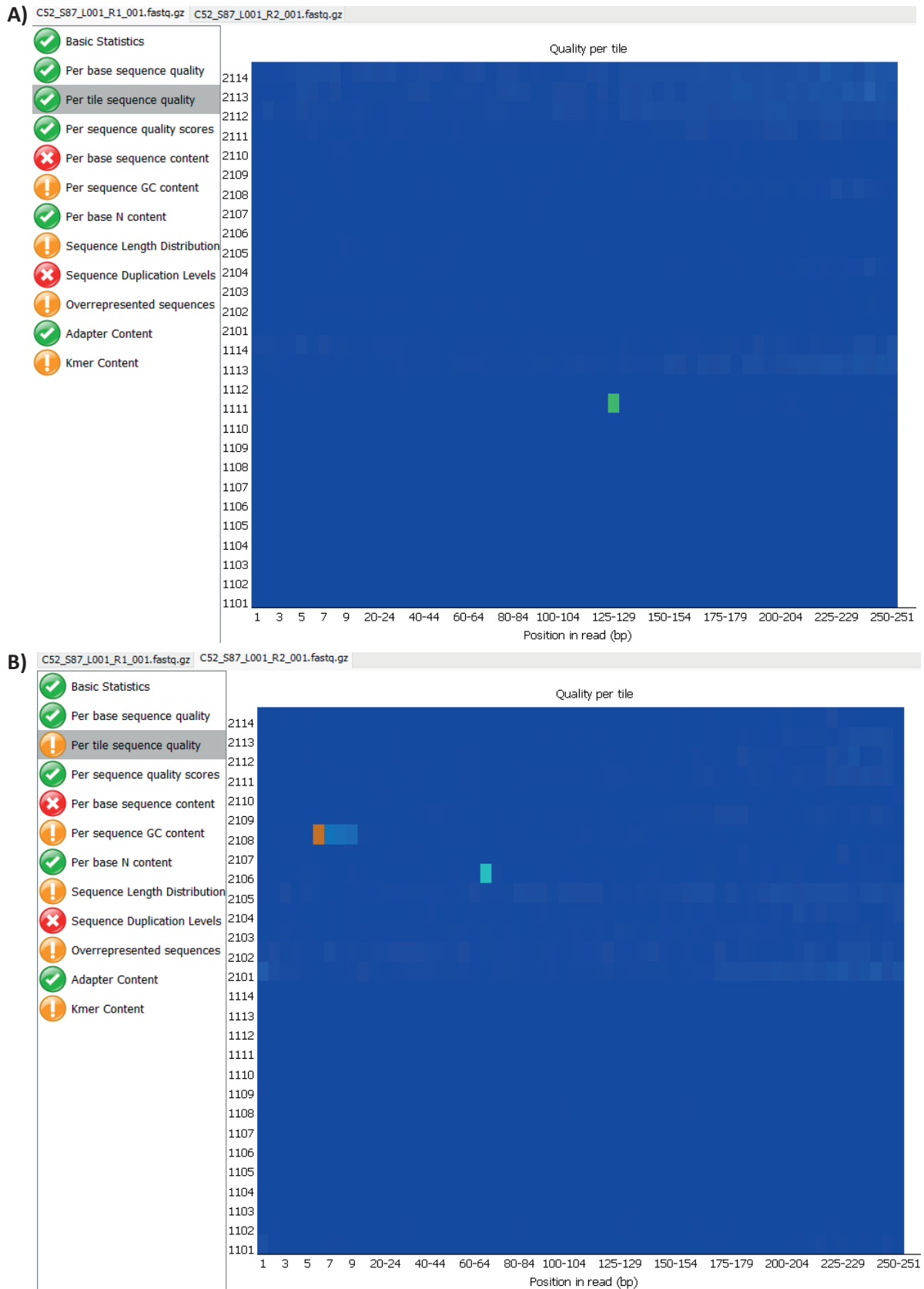


## II. Calidad de la secuenciación



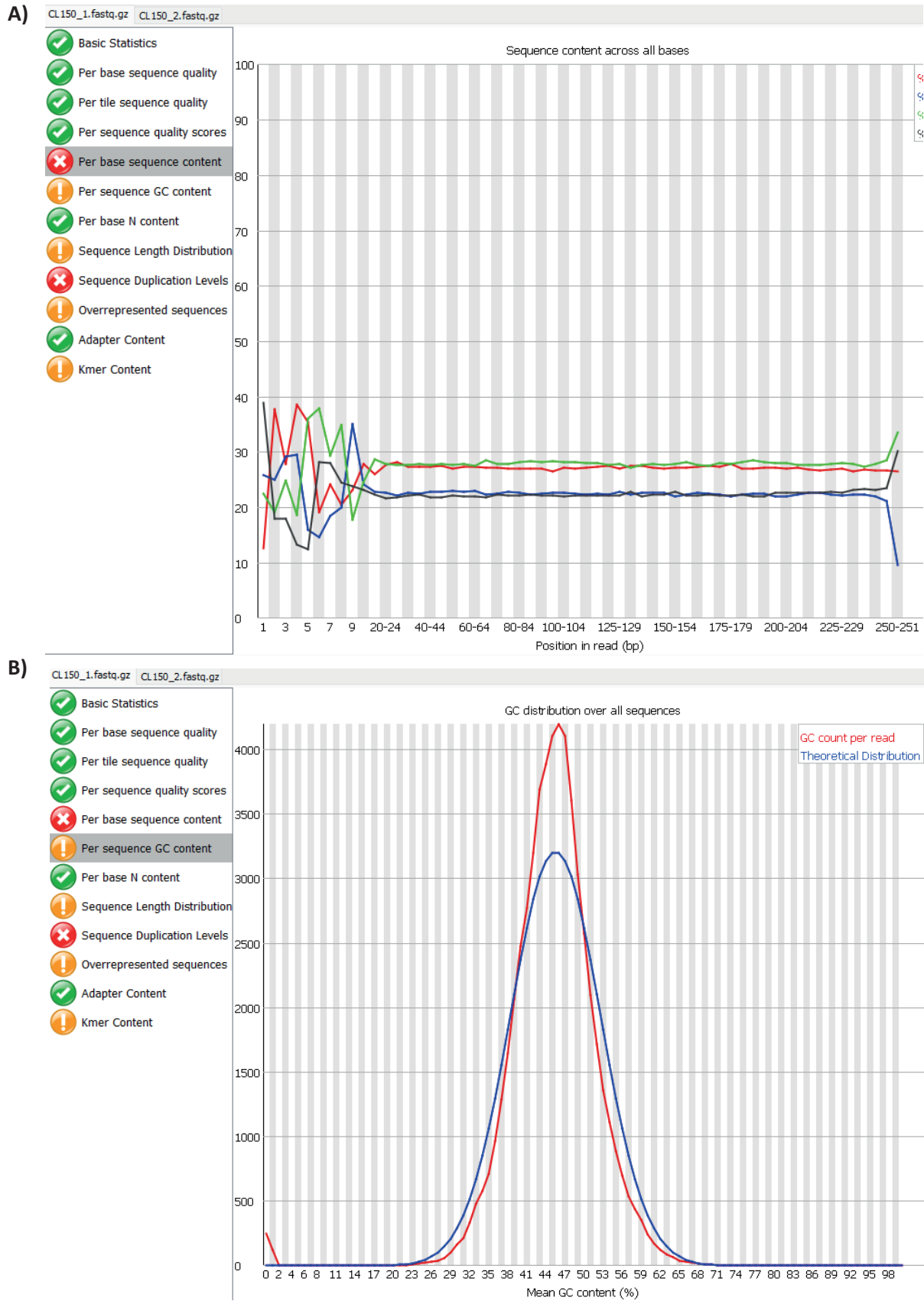
**Figura 115.** Imagen de los resultados de calidad por base de secuencia para el caso 173. Podemos observar valores adecuados de calidad en el archivo R1 (A) y como esta calidad disminuye en el archivo R2 (B).

## II. Calidad de la secuenciación



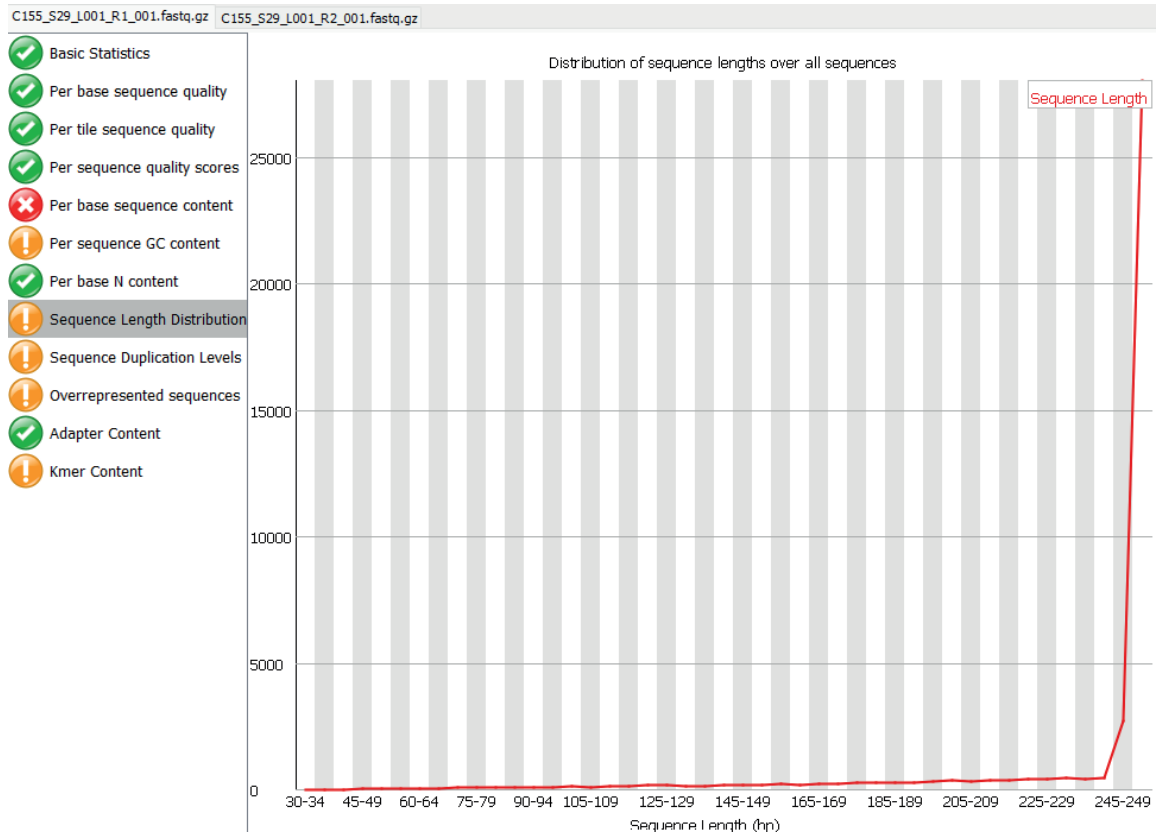
**Figura 15.** Resultados del análisis de calidad por cuadrante de celda de flujo del caso 52. En la parte superior (A) se observa un archivo (R1) con buena calidad mientras que en la inferior (B) el archivo (R2) presenta una calidad menor.

## II. Calidad de la secuenciación



**Figura 16.** Resultados del análisis de calidad del control 150. Se observa la desviación mencionada en la proporción de bases por posición (A) y en el contenido de GC en comparación con la distribución teórica (B).

## II. Calidad de la secuenciación



**Figura 17.** Resultado de la distribución por longitud de secuencias del caso 155. En el gráfico se observa como la gran mayoría de las secuencias incluidas en el archivo R1 presentan una longitud de aproximadamente 250 nucleótidos.

## II. Calidad de la secuenciación

**Tabla 9.** Resumen de la calidad de la secuenciación en el que se describe el número de archivos Fastq categorizados en función de la valoración de calidad (verde = valores adecuados; naranja = valores ligeramente alterados; rojo = valores alterados) obtenida mediante el programa FASTQC para cada parámetro analizado.

|                  |         | Estadística básica |     | Calidad de la secuencia por base |     | Calidad por cuadrante de la flowcell |     | Valores promedio de calidad por secuencia |     | Proporción de base por posición |     | Contenido de GC por secuencia en comparación con una distribución normal teórica |     | Contenido de N (veces que no se ha realizado una lectura) por base |     | Distribución de la longitud de las secuencias |     | Niveles de duplicados por secuencia |     | Secuencias sobrerrepresentadas |     | Contenido de adaptadores |     | Contenido K-mer |     |      |
|------------------|---------|--------------------|-----|----------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|---|-----|---------------------------------|-----|--|-----|--|-----|---|-----|-------------------------------------|-----|--------------------------------|-----|--------------------------|-----|-----------------|-----|------|
|                  |         | n                  | (%) | n                                | (%) | n                                    | (%) | n   | (%) | n                               | (%) | n  | (%) | n  | (%) | n   | (%) | n                                   | (%) | n                              | (%) | n                        | (%) | n               | (%) | n    |
| <b>CASOS</b>     | VERDE   | R1                 | 344 | 100                              | 342 | 99,4                                 | 317 | 92,2                                      | 344 | 100                             | 0   | 0  | 14  | 4,1  | 344 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 344 | 100             | 0   | 0    |
|                  |         | R2                 | 344 | 100                              | 133 | 38,7                                 | 222 | 64,5                                      | 344 | 100                             | 0   | 0  | 19  | 5,5  | 344 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 4   | 1,2                      | 344 | 100             | 0   | 0    |
|                  |         | Total              | 688 | 100                              | 475 | 69                                   | 539 | 78,3                                      | 688 | 100                             | 0   | 0  | 33  | 4,8  | 688 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 4   | 0,6                      | 688 | 100             | 0   | 0    |
|                  | NARANJA | R1                 | 0   | 0                                | 2   | 0,6                                  | 27  | 7,8                                       | 0   | 0                               | 16  | 4,7  | 236 | 68,6   | 0   | 0   | 344 | 100                                 | 29  | 8,4                            | 313 | 91                       | 0   | 0               | 316 | 91,9 |
|                  |         | R2                 | 0   | 0                                | 101 | 29,4                                 | 121 | 35,2                                      | 0   | 0                               | 1   | 0,3  | 248 | 72,1   | 0   | 0   | 344 | 100                                 | 66  | 19,2                           | 312 | 90,7                     | 0   | 0               | 306 | 89   |
|                  |         | Total              | 0   | 0                                | 103 | 15,0                                 | 148 | 21,5                                      | 0   | 0                               | 17  | 2,5  | 484 | 70,3   | 0   | 0   | 688 | 100                                 | 95  | 13,8                           | 625 | 90,8                     | 0   | 0               | 622 | 90,4 |
|                  | ROJO    | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0,0                                  | 0   | 0   | 0   | 0                               | 328 | 95,3   | 94  | 27,3   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 315 | 91,6                           | 31  | 9                        | 0   | 0               | 28  | 8,1  |
|                  |         | R2                 | 0   | 0                                | 110 | 32                                   | 1   | 0,3                                       | 0   | 0                               | 343 | 99,7   | 77  | 22,4   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 278 | 80,8                           | 28  | 8,1                      | 0   | 0               | 38  | 11   |
|                  |         | Total              | 0   | 0                                | 110 | 16                                   | 1   | 0,1                                       | 0   | 0                               | 671 | 97,5   | 171 | 24,9   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 593 | 86,2                           | 59  | 8,6                      | 0   | 0               | 66  | 9,6  |
| <b>CONTROLES</b> | VERDE   | R1                 | 344 | 100                              | 344 | 100                                  | 232 | 67,4                                      | 344 | 100                             | 0   | 0  | 98  | 28,5   | 344 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 344 | 100             | 0   | 0    |
|                  |         | R2                 | 344 | 100                              | 167 | 48,5                                 | 242 | 70,3                                      | 344 | 100                             | 0   | 0  | 102 | 29,7   | 344 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 3   | 0,9                      | 344 | 100             | 0   | 0    |
|                  |         | Total              | 688 | 100                              | 511 | 74,3                                 | 474 | 68,9                                      | 688 | 100                             | 0   | 0  | 200 | 29,1   | 688 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 3   | 0,4                      | 688 | 100             | 0   | 0    |
|                  | NARANJA | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 111 | 32,3                                      | 0   | 0                               | 9   | 2,6  | 175 | 50,9   | 0   | 0   | 344 | 100                                 | 22  | 6,4                            | 315 | 91,6                     | 0   | 0               | 306 | 89   |
|                  |         | R2                 | 0   | 0                                | 89  | 25,9                                 | 95  | 27,6                                      | 0   | 0                               | 0   | 0,0  | 181 | 52,6   | 0   | 0   | 344 | 100                                 | 48  | 14                             | 314 | 91,3                     | 0   | 0               | 320 | 93   |
|                  |         | Total              | 0   | 0                                | 89  | 12,9                                 | 206 | 29,9                                      | 0   | 0                               | 9   | 1,3  | 356 | 51,7   | 0   | 0   | 688 | 100                                 | 70  | 10,2                           | 629 | 91,4                     | 0   | 0               | 626 | 91   |
|                  | ROJO    | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 1   | 0,3                                       | 0   | 0                               | 335 | 97,4   | 61  | 17,7   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 322 | 93,6                           | 29  | 8,4                      | 0   | 0               | 38  | 11   |
|                  |         | R2                 | 0   | 0                                | 88  | 25,6                                 | 7   | 2   | 0   | 0                               | 344 | 100  | 61  | 17,7   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 296 | 86                             | 27  | 7,8                      | 0   | 0               | 24  | 7    |
|                  |         | Total              | 0   | 0                                | 88  | 12,8                                 | 8   | 1,2                                       | 0   | 0                               | 679 | 98,7   | 122 | 17,7   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 618 | 89,8                           | 56  | 8,1                      | 0   | 0               | 62  | 9    |

### Discusión

En los análisis de calidad realizados observamos tanto módulos con valores adecuados de calidad como otros con resultados negativos en la gran mayoría de muestras. Sin embargo, se debe tener muy en cuenta que los valores otorgados por el programa FASTQC a los parámetros de calidad de este tipo de archivos (Fastq) no tienen en cuenta el tipo de genoma que se está analizando ni tampoco la metodología empleada para la generación de las librerías. Por este motivo, es importante entender bien tanto: a) la metodología (Nextera XT) como b) la plataforma (MiSeq de Illumina) empleadas para la secuenciación.

El primer factor por considerar es la metodología empleada en para secuenciar las muestras. La estrategia realizada en el presente estudio implica un paso de amplificación del DNA durante el proceso de creación de las librerías.

Una de las características de la plataforma Illumina es que genera clústeres (conjuntos de moléculas idénticas) para que emitan suficiente señal durante la secuenciación, para que ésta sea detectada. Se ha observado que, durante el segundo ciclo de lecturas, la densidad de clústeres es tan elevada que puede acabar dificultando las lecturas reduciendo la calidad de éstas (Schirmer et al., 2015). Esto explicaría porque, aunque en general obtenemos buenos resultados de calidad por base (módulo 1), estos son superiores en los archivos R1 (resultados óptimos en el 99,4% de los casos y 100% de los controles) en comparación con los archivos R2 (valores óptimos en el 28,7% de los casos y 48,5% de los controles).

Otra característica de esta plataforma es que realiza la secuenciación por síntesis, de manera que todas las moléculas se van secuenciando simultáneamente, incorporándose una base a cada una de ellas por cada ciclo. Este tipo de secuenciación presenta un tipo de errores característicos, los errores de fase y de prefase. Los errores de fase se dan cuando un fragmento de DNA no incorpora ningún nucleótido en un ciclo de secuenciación y queda rezagado, mientras que los errores de prefase ocurren cuando, a un fragmento de DNA, se unen varios nucleótidos en un solo ciclo (Stoler & Nekrutenko, 2021). Como consecuencia de estos errores pueden detectarse diferentes bases en un mismo ciclo de secuenciación, generando una mezcla de señales que provocan la pérdida progresiva de calidad hacia el final de las lecturas (Schirmer et al., 2016) tal y como se observa en nuestros resultados del módulo 4 (incluyendo en aquellos archivos que presentan resultados de calidad por base correctos).

Los errores que se observan en la calidad en algunas celdas de flujo (módulo 2) se deben principalmente a errores con la plataforma de secuenciación como pueden ser el paso de burbujas o la presencia de manchas o residuos (Andrews, 2010). Sin embargo, los datos procedentes de celdas de baja calidad son desestimados en los análisis bioinformáticos posteriores.

Las diferencias en la proporción de base (módulo 4) que observamos en los inicios de las lecturas también pueden ser explicadas por el tipo de librería empleado. EL kit Nextera XT utiliza transposasas Tn5 modificadas para la tagmentación. Estas tienen una mayor capacidad para unirse al DNA (Marine et al., 2011), aunque la tagmentación es un proceso aleatorio, se ha observado que tienden a cortarlo por regiones ricas en adeninas y timinas (AT) flanqueadas por regiones ricas en guanina y citosina (GC), lo que provoca el sesgo observado en nuestros resultados (Ason & Reznikoff, 2004; Sato et al., 2019; Schirmer et al., 2016).

En nuestros resultados se observa un gran sesgo en cuanto a la longitud de secuencias (módulo 7), sin embargo, este sesgo que, el programa FASTQC detecta como incorrecto, cobra

## II. Calidad de la secuenciación

sentido conociendo la metodología de secuenciación que hemos empleado. Todos los archivos muestran una gran cantidad de secuencias de 250 bps que es exactamente lo que esperamos teniendo en cuenta que se ha seguido una estrategia de secuenciación de extremos apareados 2x250bps. Las lecturas de menor tamaño que se han observado en algunos archivos son generadas por defecto por la plataforma de secuenciación.

Según se ha observado en distintos estudios (Bansal, 2017; Jones et al., 2015; Kozarewa et al., 2009) la realización de una PCR durante la creación de librerías Illumina puede producir una elevada presencia de secuencias duplicadas. Este sesgo, podría explicar perfectamente porque en nuestros resultados observamos que un 100% de las muestras presentan una valoración negativa en el módulo de secuencias duplicadas (8). Estas secuencias han sido posteriormente eliminadas en el pipeline implementado por el *mtDNA-server* de manera que no están alterando el análisis de la secuencia realizado posteriormente.

Por otro lado, se ha comprobado que las librerías de Illumina con PCR también pueden generar un sesgo en cuanto al contenido de GC (módulo 5) amplificando de manera desigual algunas secuencias (Aird et al., 2011; Benjamini & Speed, 2012; Sato et al., 2019). Esto podría ser identificado como secuencias sobrerrepresentadas dentro del análisis de calidad de los Fastq permitiéndonos entender porque observamos una advertencia en el módulo de calidad del FASTQC que analiza este parámetro (9).

Finalmente, la distribución desigual de las bases provocada por el sesgo en la tagmentación junto con los errores que se producen a medida que avanza la secuenciación podrían explicar la sobrerrepresentación de secuencias *K-mers* que observamos en el módulo 11 de nuestros resultados.

Todos los sesgos mencionados previamente podrían justificar, *a priori*, las alteraciones que observamos en la calidad de nuestras secuencias.

# III. Distribución de los haplogrupos







### III. Distribución de los haplogrupos

## Resultados

### Accidente cerebrovascular

En la Tabla 10 están recogidas las frecuencias de los diferentes haplogrupos tanto para casos como controles. El macrohaplogrupo (macroHg) R0 (que incluye los haplogrupos H, HV, V y R0) está significativamente sobrerrepresentado en el grupo de controles (64,55% de los controles vs 50% de los casos). Si lo analizamos con mayor profundidad, observamos que el Hg V también se encuentra sobrerrepresentado en controles (9,09% de los controles vs 1,82% de los casos). En este sentido, nuestros resultados muestran que individuos del macroHg R0 y del HgV tienen respectivamente 1,82 y 5,41 (*Odds Ratio* inversa) veces menos riesgo de sufrir un ACV. También se puede observar una sobrerrepresentación considerable del macrohaplogrupo U en casos (16,36% de los controles vs 25,45% de los casos), aunque no es estadísticamente significativa. A nivel de haplogrupo se constata que la diferencia en el macrohaplogrupo U parece ser debida principalmente a la distribución de Hg U (10,91% de los controles vs 17,27% de los casos).

**Tabla 10. ACV (N = 110 casos y 110 controles); Frecuencias de macrohaplogrupos y haplogrupos mitocondriales en casos y controles.**

|             | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>McNemar</b> | <b>Odds Ratio (CI 95%)</b>    |
|-------------|--------------|------------------|----------------|-------------------------------|
|             | n (%)        | n (%)            | P-valor        |                               |
| <b>R0</b>   | 55 (50)      | 71 (64,55)       | <b>0,027</b>   | <b>0,5493 (0,312 – 0,943)</b> |
| H           | 48 (43,64)   | 57 (51,82)       | 0,253          | 0,720 (0,423 – 1,224)         |
| HV          | 4 (3,64)     | 3 (2,73)         | 1              | 1,346 (0,294 – 6,159)         |
| V           | 2 (1,82)     | 10 (9,09)        | <b>0,039</b>   | 0,185 (0,040 – 0,866)         |
| R0          | 1 (0,91)     | 1 (0,91)         | 1              | 1 (0,0618 – 16,192)           |
| <b>JT</b>   | 20 (18,18)   | 14 (12,73)       | 0,327          | 1,524 (0,726 – 3,197)         |
| J           | 12 (10,91)   | 7 (6,36)         | 0,332          | 1,802 (0,681 – 4,764)         |
| T           | 8 (7,27)     | 7 (6,36)         | 1              | 1,154 (0,404 – 3,300)         |
| <b>U</b>    | 28 (25,45)   | 18 (16,36)       | 0,144          | 1,745 (0,900 – 3,386)         |
| U           | 19 (17,27)   | 12 (10,91)       | 0,248          | 1,705 (0,784 – 3,709)         |
| K           | 9 (8,18)     | 6 (5,45)         | 0,581          | 1,545 (0,531 – 4,497)         |
| <b>No-R</b> | 7 (6,36)     | 7 (6,36)         | 1              | 1 (0,339 – 2,953)             |
| I           | 2 (1,82)     | 1 (0,91)         | 1              | 2,019 (0,180 – 22,591)        |
| L           | 0 (0)        | 2 (1,82)         | 0,5            | 0,196 (0,009 – 4,138)         |
| M           | 1 (0,91)     | 0 (0)            | 1              | 3,027 (0,122 – 75,133)        |
| W           | 3 (2,73)     | 2 (1,82)         | 1              | 1,514 (0,248 – 9,243)         |
| X           | 1 (0,91)     | 2 (1,82)         | 1              | 0,495 (0,044 – 5,545)         |

### III. Distribución de los haplogrupos

#### Infarto de miocardio

En la Tabla 11 se detecta que las frecuencias de los diversos macrohaplogrupos (R0, JT, UK y no-R) son muy similares entre los individuos con IM y los controles. A nivel de haplogrupos, aunque en general las frecuencias siguen siendo muy parecidas se observa una disminución de la frecuencia de los haplogrupos HV (3% en casos vs 6% en controles) y T (6,6% en casos vs 8,38% en controles) en casos mientras que las frecuencias de los Hgs J (10,2% en casos vs 7,8% en controles) y U (16,2% en casos vs 13,2% en controles) aumentan ligeramente en los mismos.

**Tabla 11. IM** (N = 167 casos y 167 controles); Frecuencias de macrohaplogrupos y haplogrupos mitocondriales en casos y controles.

|             | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>McNemar<br/>P-valor</b> | <b>Odds Ratio (CI 95%)</b> |
|-------------|--------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
|             | n (%)        | n (%)            |                            |                            |
| <b>R0</b>   | 94 (56,29)   | 100 (59,88)      | 0,594                      | 0,824 (0,532 - 1,277)      |
| H           | 78 (46,71)   | 76 (45,51)       | 0,91                       | 1,049 (0,682 - 1,614)      |
| HV          | 5 (2,99)     | 10 (5,99)        | 0,267                      | 0,485 (0,162 - 1,450)      |
| V           | 10 (5,99)    | 13 (7,78)        | 0,648                      | 0,755 (0,321 - 1,772)      |
| R0          | 1 (0,6)      | 1 (0,6)          | 1                          | 1 (0,062 - 16,122)         |
| <b>JT</b>   | 28 (16,77)   | 27 (16,17)       | 1                          | 1,045 (0,586 - 1,863)      |
| J           | 17 (10,18)   | 13 (7,78)        | 0,584                      | 1,343 (0,630 - 2,860)      |
| T           | 11 (6,59)    | 14 (8,38)        | 0,678                      | 0,771 (0,339 - 1,751)      |
| <b>U</b>    | 35 (20,96)   | 28 (16,77)       | 0,36                       | 1,316 (0,759 - 2,284)      |
| U           | 27 (16,17)   | 22 (13,17)       | 0,499                      | 1,271 (0,691 - 2,337)      |
| K           | 8 (4,79)     | 6 (3,59)         | 0,791                      | 1,350 (0,458 - 3,980)      |
| <b>No-R</b> | 10 (5,99)    | 12 (7,19)        | 0,832                      | 0,823 (0,345 - 1,960)      |
| L           | 3 (1,8)      | 1 (0,6)          | 0,625                      | 3,037 (0,313 - 29,495)     |
| M           | 3 (1,8)      | 2 (1,2)          | 1                          | 1,509 (0,249 - 9,150)      |
| A           | 0 (0)        | 1 (0,6)          | 1                          | 0,331 (0,013 - 8,193)      |
| N           | 1 (0,6)      | 2 (1,2)          | 1                          | 0,497 (0,045 - 5,534)      |
| I           | 0 (0)        | 3 (1,8)          | 0,25                       | 0,140 (0,007 - 2,738)      |
| X           | 2 (1,2)      | 1 (0,6)          | 1                          | 2,012 (0,181 - 22,406)     |
| W           | 1 (0,6)      | 2 (1,2)          | 1                          | 0,497 (0,045 - 5,534)      |

### III. Distribución de los haplogrupos

#### Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio

Analizando las frecuencias de los diferentes macrohaplogrupos y haplogrupo hallamos diferencias entre casos y controles (Tabla 12). La principal diferencia la detectamos en el macrohaplogrupo R0, el cual es significativamente más frecuente en casos que en controles (64,18% de los casos vs 41,79% de los controles, McNemar:  $P = 0,009$ ). Esta diferencia se debe completamente a la diferencia que se observa en el Hg H, que sigue el mismo patrón (58,21% de los casos vs 34,33% de los controles, McNemar:  $P = 0,006$ ). Estos resultados, implican que los individuos que pertenecen al macroHg R0 o al haplogrupo R0 tienen aproximadamente 2,5 veces más probabilidad de sufrir ambas enfermedades.

Por el contrario, los macrohaplogrupos JT, UK y No-R presentan una frecuencia ligeramente mayor en los controles, siendo la diferencia en el haplogrupo U la única estadísticamente significativa (10,45% de los casos vs 22,39% de los controles, McNemar:  $P = 0,039$ ). Pertenecer a este haplogrupo reduce el riesgo de sufrir ambas enfermedades 1,94 veces.

**Tabla 12. ACV e IM (N = 67 casos y 67 controles); Frecuencias de macroHgs y Hgs mitocondriales en casos y controles.**

|             | Casos<br>n (%) | Controles<br>n (%) | McNemar<br>P-valor | Odds Ratio (CI 95%)    |
|-------------|----------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| <b>R0</b>   | 43 (64,18)     | 28 (41,79)         | <b>0,009</b>       | 2,496 (1,244 - 5,008)  |
| H           | 39 (58,21)     | 23 (34,33)         | <b>0,006</b>       | 2,666 (1,323 - 5,366)  |
| HV          | 1 (1,49)       | 2 (2,99)           | 1                  | 0,492 (0,044 - 5,564)  |
| V           | 3 (4,48)       | 2 (2,99)           | 1                  | 1,523 (0,246 - 9,423)  |
| R0          | 0 (0)          | 1 (1,49)           | -                  | 0,328 (0,013 - 8,207)  |
| <b>JT</b>   | 9 (13,43)      | 12 (17,91)         | 0,549              | 0,711 (0,278 - 1,820)  |
| J           | 5 (7,46)       | 6 (8,96)           | 1                  | 0,820 (0,238 - 2,829)  |
| T           | 4 (5,97)       | 6 (8,96)           | 0,727              | 0,646 (0,174 - 2,400)  |
| <b>U</b>    | 10 (14,93)     | 17 (25,37)         | 0,118              | 0,516 (0,217 - 1,230)  |
| U           | 7 (10,45)      | 15 (22,39)         | <b>0,039</b>       | 0,404 (0,153 - 1,068)  |
| K           | 3 (4,48)       | 2 (2,99)           | 1                  | 1,523 (0,246 - 9,423)  |
| <b>No-R</b> | 5 (7,46)       | 10 (14,93)         | 0,267              | 0,460 (0,148 - 1,426)  |
| L           | 1 (1,49)       | 1 (1,49)           | 1                  | 1 (0,061 - 16,323)     |
| M           | 2 (2,99)       | 1 (1,49)           | 1                  | 2,031 (0,180 - 22,950) |
| N           | 0 (0)          | 1 (1,49)           | 1                  | 0,328 (0,013 - 8,207)  |
| I           | 1 (1,49)       | 2 (2,99)           | 1                  | 0,492 (0,044 - 5,564)  |
| X           | 0 (0)          | 4 (5,97)           | 0,125              | 0,105 (0,006 - 1,981)  |
| W           | 1 (1,49)       | 1 (1,49)           | 1                  | 1 (0,061 - 16,323)     |

### III. Distribución de los haplogrupos

#### Enfermedad cardiovascular global

La distribución de los haplogrupos a los cuales pertenecen los individuos analizados se encuentra en la Tabla 13. Tal y como se puede observar en dicha tabla, no hay diferencias significativas ni a nivel de macrohaplogrupo ni de haplogrupo entre casos y controles. A nivel de macrohaplogrupo las frecuencias son muy similares en todos los casos. El haplogrupo H es ligeramente más frecuente en casos, mientras que V, HV y R0 presentan el comportamiento opuesto. Dentro del macroHg JT, J es más frecuente en casos y T en controles. Por lo que respecta a los haplogrupos (U y K) pertenecientes al macroHg U, son levemente más frecuentes en casos. En la agrupación No-R, los Hgs L y W presentan la misma frecuencia en ambos grupos, M es ligeramente más frecuente en casos y A, N, I y X son levemente más frecuentes en controles.

**Tabla 13. ECV global** (N = 344 casos y 344 controles); Frecuencias de macrohaplogrupos y haplogrupos mitocondriales en casos y controles.

|             | <b>Casos</b> | <b>Controles</b> | <b>McNemar</b> | <b>Odds Ratio (CI 95%)</b> |
|-------------|--------------|------------------|----------------|----------------------------|
|             | <b>n (%)</b> | <b>n (%)</b>     | <b>P-valor</b> |                            |
| <b>R0</b>   | 192 (55,81)  | 199 (57,85)      | 0,638          | 0,920 (0,681 - 1,245)      |
| H           | 165 (47,97)  | 156 (45,35)      | 0,523          | 1,111 (0,823 - 1,500)      |
| V           | 15 (4,36)    | 25 (7,27)        | 0,134          | 0,582 (0,301 - 1,124)      |
| HV          | 10 (2,91)    | 15 (4,36)        | 0,383          | 0,657 (0,291 - 1,483)      |
| R0          | 2 (0,58)     | 3 (0,87)         | 1              | 0,665 (0,110 - 4,003)      |
| <b>JT</b>   | 57 (16,57)   | 53 (15,41)       | 0,737          | 1,091 (0,725 - 1,640)      |
| J           | 34 (9,88)    | 26 (7,56)        | 0,35           | 1,341 (0,786 - 2,288)      |
| T           | 23 (6,69)    | 27 (7,85)        | 0,658          | 0,841 (0,472 - 1,499)      |
| <b>U</b>    | 73 (21,22)   | 63 (18,31)       | 0,358          | 1,202 (0,825 - 1,750)      |
| U           | 53 (15,41)   | 49 (14,24)       | 0,727          | 1,097 (0,720 - 1,670)      |
| K           | 20 (5,81)    | 14 (4,07)        | 0,377          | 1,455 (0,723 - 2,930)      |
| <b>No-R</b> | 22 (6,4)     | 29 (8,43)        | 0,381          | 0,742 (0,417 - 1,320)      |
| L           | 4 (1,16)     | 4 (1,16)         | 1              | 1 (0,248 - 4,031)          |
| M           | 6 (1,74)     | 3 (0,87)         | 0,528          | 2,018 (0,501 - 8,134)      |
| A           | 0 (0)        | 1 (0,29)         | 1              | 0,332 (0,014 - 8,188)      |
| N           | 1 (0,29)     | 3 (0,87)         | 0,625          | 0,331 (0,034 - 3,202)      |
| I           | 3 (0,87)     | 6 (1,74)         | 0,528          | 0,496 (0,123 - 1,998)      |
| X           | 3 (0,87)     | 7 (2,03)         | 0,344          | 0,424 (0,109 - 1,652)      |
| W           | 5 (1,45)     | 5 (1,45)         | 1              | 1 (0,287 - 3,486)          |

#### Discusión

La distribución de haplogrupos de casos y controles, en relación al riesgo de accidente cerebrovascular (ACV), ha revelado una sobrerrepresentación estadísticamente significativa del haplogrupo V en los controles (Tabla 10). Este resultado, que marca al haplogrupo V como un potencial factor genético de protección del riesgo de ACV no ha sido previamente reportado en ningún estudio relacionado con el riesgo de ECV. Sin embargo, si ha sido relacionado con la Diabetes mellitus, factor de riesgo clásico de la enfermedad cardiovascular. Asimismo, (Piotrowska-Nowak et al., 2019a) encontraron que el Hg V tenía una menor prevalencia en pacientes con diabetes mellitus que en sus controles (población polaca). Por su parte, (Soini et al., 2012) encontraron una frecuencia 3 veces mayor de individuos del haplogrupo V en pacientes con diabetes matrilineal (en población finlandesa).

El haplogrupo V alcanza su mayor frecuencia poblacional en las poblaciones Sami (entre un 33 y 68%), que habitan el norte de Finlandia, Noruega, Suecia y la península Kola de Rusia (Ingman & Gyllensten, 2007). Como se ha mencionado previamente en el capítulo de introducción, se ha demostrado que, en climas fríos, como respuesta adaptativa a las bajas temperaturas, la eficiencia de acoplamiento del sistema OXPHOS disminuye con el objetivo de incrementar la producción de calor (Chinnery & Gomez-Duran, 2018). Basándonos en estos hechos, a pesar de que no se han realizado estudios que investiguen la eficiencia de acoplamiento del Hg V, se podría hipotetizar que este haplogrupo implica un ligero desacoplamiento de la OXPHOS que disminuiría la producción de especies reactivas de oxígeno reduciendo, a su vez, el daño causado el DNA mitocondrial, y por consiguiente a su funcionalidad.

Nuestro estudio no ha replicado las asociaciones previamente encontradas por otros estudios. Se ha reportado que los haplogrupos K (Chinnery et al., 2010) y H1 (Rosa et al., 2008) podrían actuar como factores de protección frente al riesgo de ACV en población europea, y el haplogrupo J tiene una menor presencia en individuos con cardiomiopatía isquémica (Fernández-Caggiano et al., 2012). En contraste, se ha asociado el Hg U con un incremento del riesgo de ACV migrañoso (Finnilä et al., 2001; Majamaa et al., 1998) y el haplogrupo T tiene una mayor prevalencia en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias y retinopatía diabética (Kofler et al., 2009). También se ha de mencionar que hay otros estudios que no han encontrado evidencias de asociación entre ellos haplogrupos mitocondriales y las enfermedades cardiovasculares isquémicas o el ACV (Benn et al., 2008; Umbria et al., 2019b).

Del mismo modo, la relación entre haplogrupo e infarto de miocardio (IM) ha sido explorada previamente, habiéndose asociado el haplogrupo H con un incremento del riesgo (Palacín et al., 2011; Umbria et al., 2019b). Este haplogrupo también parece actuar como factor de riesgo en otras ECV como la fibrilación atrial (Roselló-Díez et al., 2021) y las cardiomiopatías dilatada e hipertrófica (Fernández-Caggiano et al., 2013; Hagen et al., 2013). Nuestros resultados no respaldan esta asociación, observándose frecuencias muy similares de individuos del haplogrupo H en casos y controles. Esto podría ser debido a que al criterio de inclusión de casos en este análisis ha sido muy riguroso, incluyendo únicamente aquellos individuos con historial de IM únicamente, sin otras comorbilidades cardiovasculares (más allá de la hipertensión). Concretamente, en los dos estudios referentes al incremento del riesgo de IM asociado al haplogrupo H no se precisa si los individuos analizados presentan alguna ECV adicional.

### III. Distribución de los haplogrupos

En este trabajo no se observa ninguna asociación estadísticamente significativa entre el haplogrupo mitocondrial y el riesgo de infarto de miocardio. La asociación de un haplogrupo determinado con el riesgo de ECV no siempre ha podido ser replicado y varios estudios respaldarían nuestros resultados (Abrantes et al., 2016; Benn et al., 2008; Chinnery et al., 2010; Chinnery et al., 2007; Govindaraj et al., 2014; Liu et al., 2019; Mitchell et al., 2017; Mohlke et al., 2005; F. Xiao et al., 2020).

En el análisis en individuos con antecedentes tanto de ACV como de IM se observaron diferencias significativas en la distribución de macrohaplogrupo H, sobrerrepresentado en los casos. El principal responsable de esta diferencia parece ser el haplogrupo H, que también es significativamente más frecuente en los individuos afectados. Como se ha mencionado anteriormente, el haplogrupo H ya ha sido previamente relacionado con el IM (Palacín et al., 2011; Umbria et al., 2019b), y el subhaplogrupo H1 con el ACV (Rosa et al., 2008). Teniendo en cuenta nuestros resultados, el haplogrupo H parece candidato a ser un factor de riesgo para la combinación de ACV e IM, y no un factor de riesgo para esas ECV por separado. En relación con este haplogrupo, se considera que las variantes que lo definen pueden generar una mayor cantidad de ROS en el ambiente y dar lugar a una situación de estrés oxidativo, causando daño oxidativo en el mtDNA (Martínez-Redondo et al., 2010). También se observa una mayor frecuencia del haplogrupo U en los controles, postulándose como un posible factor protector, reduciendo el riesgo de sufrir la combinación de ambas ECVs. Este haplogrupo ha sido descrito previamente como un factor de riesgo en relación con el ACV (Hudson et al., 2014; Martikainen & Majamaa, 2010), probablemente debido a una reducción en la síntesis proteica mitocondrial y de la actividad del complejo IV, deteriorando la producción de energía (Gómez-Durán et al., 2010). Por el contrario, también parece otorgar cierta protección ante la estenosis aortica severa (Serrano-Teruel et al., 2019).

Al analizar todas las muestras de manera conjunta (ECV global) no se observaron diferencias significativas ni a nivel de macrohaplogrupo ni de haplogrupo. De hecho, las diferencias son muy leves. Con estos resultados, junto a los de los análisis anteriores, se puede inferir que el papel que juegan los haplogrupos en el riesgo de ECV no es siempre el mismo. El rol del haplogrupo depende tanto de la ECV en cuestión como de la población, ya que los resultados obtenidos en análisis de poblaciones asiáticas son diferentes a los obtenidos en poblaciones caucásicas (véase Tabla 1, apartado de introducción).

No obstante, al examinar los haplogrupos mitocondriales en su conjunto, aunque su frecuencia no es elevada, llama la atención la presencia de linajes africanos, como el Hg L, el cual aparece tanto en casos (N = 4) como en controles (N = 4), siendo dicho haplogrupo exclusivo de la población negroide. Sin embargo, esta presencia africana ya había sido descrita con anterioridad por (Álvarez et al., 2010, 2014) en estudios poblacionales relativos al genoma mitocondrial (siendo descritos los haplogrupos subsaharianos L1b, L2b, L3b, M1 y el norteafricano U6a, que representan el 5,7% del total de haplogrupos presentes en la provincia de Zamora), así como del genoma del cromosoma Y (haplogrupo E).

Finalmente, cabe destacar que el hecho de analizar el genoma mitocondrial de 344 controles seleccionados aleatoriamente (aunque emparejados por edad, género y procedencia geográfica dentro de la Comunidad de Castilla y León), sin antecedentes de accidente cerebrovascular ni infarto de miocardio permite definir una muestra representativa de la población de la mencionada comunidad autónoma. Por lo tanto, la distribución de haplogrupos y haplotipos (Tabla suplementaria 7) de los controles estudiados responde a la distribución real de la población de la mencionada comunidad.

# IV. Perfil y carga mutacional





### Resultados

#### Accidente cerebrovascular

El perfil haplotípico de mtDNA de cada individuo está incluido en la Tabla suplementaria 7.

En la Tabla 14 se incluyen el número de variantes fijadas de casos y controles estratificados en función de la región del mtDNA donde se encuentran y también la *ratio* en función de la longitud de la región donde se encuentran. En la Tabla 16 se incluye la misma información respecto a las variantes en heteroplasmia.

Analizando la **molécula de mtDNA completa** detectamos que el número de **mutaciones fijadas** era significativamente superior en los casos respecto de los controles (C = 2525 vs CL = 2176; Wilcoxon test: P = 0,02). Resultados similares se obtuvieron cuando analizamos la **región no codificante** por separado (C = 685 vs CL = 557, Wilcoxon test: P = 0,006). Dentro de la NCR, encontramos un incremento estadísticamente significativo de homoplasmas en la HVR1 (C = 256 vs CL = 179; Wilcoxon test: P = 0,002). Este comportamiento también se observa en las HVR2 y HVR3; y aunque las diferencias entre casos y controles en estas regiones no son significativas se constata que, en las tres regiones, el número de homoplasmas de los casos es superior al de los controles.

Las variantes de la **región codificante** se analizaron tanto por complejos como gen a gen, y globalmente se constata que no existen diferencias entre los casos y los controles. El **complejo I** mostró un incremento significativo de homoplasmas en casos de ACV con relación a los controles (C = 658 vs CL = 556, P = 0,041). Esto también se observó en los genes ND1, ND3, ND4L, ND4 y ND5, siendo las diferencias en ND4 y ND5 estadísticamente significativas. Por el contrario, los genes ND2 y ND6 mostraron una disminución del número de variantes fijadas en casos. En el **complejo III** también detectamos un incremento significativo del número de homoplasmas en casos (C = 287 vs CL = 230, P = 0,002). El número de variantes fijadas en el **complejo IV** era similar entre casos y controles (C = 176 vs CL = 171, P = 0,771), una característica común para los 3 genes (CO1, CO2 and CO3). Resultados similares se obtuvieron para el **complejo V** (C = 155 vs CL = 160, P = 0,554) y los genes ATP6, ATP8 y la región solapante entre ellos (ATP6/8).

En relación con los **genes de RNA**, observamos un incremento en el número de homoplasmas en casos de ACV tanto en rRNAs (C = 476 vs CL = 429, P = 0,022) como en tRNAs (C = 81 vs CL = 66, P = 0,21). Las diferencias en los genes de rRNA fueron debidas principalmente a diferencias en el gen RNR1 (C = 254 vs CL = 233, P = 0,02).

A nivel de la *ratio* de mutaciones (Tabla 14) observamos un comportamiento prácticamente idéntico entre casos y controles. La mayor tasa de homoplasmas en relación a la longitud de la región analizada se encuentra en la región no codificante (C = 0,612 y CL = 0,497), y dentro de esta en la HVR2 (C = 0,949 y CL = 0,816); a pesar de ello, como se ha apuntado anteriormente, sólo se han hallado diferencias significativas en la región HVR1. En la región codificante, el complejo III presenta la *ratio* más elevada (C = 0,252 y CL = 0,202), aunque a nivel génico se ve sobrepasada tanto por el gen ND4 del complejo I (C = 0,579 y CL = 0,421), como ATP6 del complejo V (C = 0,676 y CL = 0,720).

#### IV. Perfil y carga mutacional

**Tabla 14. ACV: Número y ratio de variantes fijadas (homoplasmias) en casos de ACV y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.**

| Región mitocondrial   | Longitud (pb) | Homoplasmias |       |              |       | Wilcoxon P-valor |
|-----------------------|---------------|--------------|-------|--------------|-------|------------------|
|                       |               | Casos        |       | Controles    |       |                  |
|                       |               | Σ (%)        | Σ/pb  | Σ (%)        | Σ/pb  |                  |
| <b>NCR</b>            | 1120          | 685 (27,13)  | 0,612 | 557 (25,60)  | 0,497 | <b>0,006</b>     |
| HVR1                  | 360           | 256 (10,14)  | 0,711 | 179 (8,23)   | 0,497 | <b>0,002</b>     |
| HVR2                  | 316           | 300 (11,88)  | 0,949 | 258 (11,86)  | 0,816 | 0,076            |
| HVR3                  | 137           | 44 (1,74)    | 0,321 | 36 (1,65)    | 0,263 | 0,393            |
| Otras regiones        | 307           | 85 (3,37)    | 0,277 | 84 (3,86)    | 0,274 | 0,912            |
| <b>CR</b>             | 15449         | 1840 (72,87) | 0,119 | 1619 (74,40) | 0,105 | 0,056            |
| <b>Complejo I</b>     | <b>6356</b>   | 658 (26,06)  | 0,104 | 556 (25,55)  | 0,087 | <b>0,041</b>     |
| ND1                   | 956           | 61 (2,42)    | 0,064 | 55 (2,53)    | 0,058 | 0,469            |
| ND2                   | 1042          | 166 (6,57)   | 0,159 | 173 (7,95)   | 0,166 | 0,665            |
| ND3                   | 346           | 33 (1,31)    | 0,095 | 23 (1,06)    | 0,066 | 0,21             |
| ND4L                  | 1378          | 26 (1,03)    | 0,019 | 16 (0,74)    | 0,012 | 0,085            |
| ND4                   | 297           | 172 (6,81)   | 0,579 | 125 (5,74)   | 0,421 | <b>0,022</b>     |
| ND5                   | 1812          | 167 (6,61)   | 0,092 | 120 (5,51)   | 0,066 | <b>0,017</b>     |
| ND6                   | 525           | 33 (1,31)    | 0,063 | 44 (2,02)    | 0,084 | 0,209            |
| <b>Complejo III</b>   | 1141          | 287 (11,37)  | 0,252 | 230 (10,57)  | 0,202 | <b>0,002</b>     |
| <b>Complejo IV</b>    | 3010          | 176 (6,97)   | 0,058 | 171 (7,86)   | 0,057 | 0,771            |
| CO1                   | 1542          | 101 (4)      | 0,065 | 109 (5,01)   | 0,071 | 0,48             |
| CO2                   | 684           | 26 (1,03)    | 0,038 | 25 (1,15)    | 0,037 | 0,894            |
| CO3                   | 784           | 49 (1,94)    | 0,063 | 37 (1,70)    | 0,047 | 0,188            |
| <b>Complejo V</b>     | 888           | 155 (6,14)   | 0,175 | 160 (7,35)   | 0,180 | 0,554            |
| ATP8                  | 681           | 12 (0,48)    | 0,018 | 10 (0,46)    | 0,015 | 0,655            |
| ATP8/6                | 842           | 3 (0,12)     | 0,004 | 1 (0,05)     | 0,001 | 0,317            |
| ATP6                  | 207           | 140 (5,54)   | 0,676 | 149 (6,85)   | 0,720 | 0,232            |
| <b>rRNA</b>           | 2537          | 476 (18,85)  | 0,188 | 429 (19,72)  | 0,169 | <b>0,022</b>     |
| RNR1                  | 954           | 254 (10,06)  | 0,266 | 233 (10,71)  | 0,244 | <b>0,02</b>      |
| RNR2                  | 1559          | 222 (8,79)   | 0,142 | 196 (9,01)   | 0,126 | 0,13             |
| <b>tRNA</b>           | 1508          | 81 (3,21)    | 0,054 | 66 (3,03)    | 0,044 | 0,21             |
| <b>mtDNA completo</b> | 16569         | 2525 (100)   | 0,152 | 2176 (100)   | 0,131 | <b>0,028</b>     |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

Comparando la distribución de las **heteroplasmias**, notamos el patrón opuesto en respecto a homoplasmias, aunque mayoritariamente las diferencias no son significativas (Tabla 15). En general detectamos más heteroplasmias en controles que en casos de ACV (C = 132 vs CL = 156, P = 0,239), una característica también presente cuando analizamos la NCR (C = 45 vs CL = 51, P = 0,665) y la CR (C = 87 vs CL = 105, P = 0,296) por separado. A nivel de complejo mitocondrial, observamos un número similar de posiciones con heteroplasmia entre casos y controles en los Complejos I, III y IV, y en los genes de tRNA. El complejo V y los genes de rRNA presentan un mayor número de heteroplasmias en controles, siendo esta diferencia

#### IV. Perfil y carga mutacional

únicamente significativa para el gen CO2 (C = 4 vs CL = 0; Wilcoxon test: P = 0,046). En cuanto a la *ratio* de heteroplasmas se evidencia que casos y controles presentan un patrón muy similar (Tabla 15). La región que presenta una *ratio* más elevada es la región no codificante (C = 0,040 y CL = 0,046), más específicamente la región hipervariable 3 (C = 0,066 y CL = 0,102). A nivel de la región codificante se puede observar que la *ratio* de heteroplasmas es muy similar entre todos los complejos de la OXPHOS e incluso los genes de RNA. Destacarían los genes ND4 (C = 0,034 y CL = 0,051) y ATP6 (C = 0,034 y CL = 0,053) como los que presentan una *ratio* mayor.

**Tabla 15. ACV: Número y ratio de variantes en heteroplasma en casos de ACV y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.**

| Región mitocondrial   | Longitud (pb) | Heteroplasmas |       |             |       | Wilcoxon P-valor |
|-----------------------|---------------|---------------|-------|-------------|-------|------------------|
|                       |               | Casos         |       | Controles   |       |                  |
|                       |               | Σ (%)         | Σ/pb  | Σ (%)       | Σ/pb  |                  |
| <b>NCR</b>            | 1120          | 45 (34,09)    | 0,040 | 51 (32,69)  | 0,046 | 0,665            |
| HVR1                  | 360           | 17 (12,88)    | 0,047 | 15 (9,62)   | 0,042 | 0,713            |
| HVR2                  | 316           | 19 (14,39)    | 0,060 | 22 (14,10)  | 0,070 | 0,729            |
| HVR3                  | 137           | 9 (6,82)      | 0,066 | 14 (8,97)   | 0,102 | 0,445            |
| Otras regiones        | 307           | 0 (0)         | 0,000 | 0 (0)       | 0,000 | 1                |
| <b>CR</b>             | 15449         | 87 (65,91)    | 0,006 | 105 (67,31) | 0,007 | 0,296            |
| <b>Complejo I</b>     | 6356          | 35 (26,52)    | 0,006 | 41 (26,28)  | 0,006 | 0,792            |
| ND1                   | 956           | 6 (4,55)      | 0,006 | 4 (2,56)    | 0,004 | 0,564            |
| ND2                   | 1042          | 3 (2,27)      | 0,003 | 4 (2,56)    | 0,004 | 0,705            |
| ND3                   | 346           | 0 (0)         | 0,000 | 2 (1,28)    | 0,006 | 0,157            |
| ND4L                  | 1378          | 1 (0,76)      | 0,001 | 1 (0,64)    | 0,001 | 1                |
| ND4                   | 297           | 10 (7,58)     | 0,034 | 15 (9,62)   | 0,051 | 0,614            |
| ND5                   | 1812          | 12 (9,09)     | 0,007 | 11 (7,05)   | 0,006 | 0,835            |
| ND6                   | 525           | 3 (2,27)      | 0,006 | 4 (2,56)    | 0,008 | 0,705            |
| <b>Complejo III</b>   | 1141          | 8 (6,06)      | 0,007 | 6 (3,85)    | 0,005 | 0,593            |
| <b>Complejo IV</b>    | 3010          | 15 (11,36)    | 0,005 | 14 (8,97)   | 0,005 | 0,847            |
| CO1                   | 1542          | 6 (4,55)      | 0,004 | 5 (3,21)    | 0,003 | 0,705            |
| CO2                   | 684           | 4 (3,03)      | 0,006 | 0 (0)       | 0,000 | <b>0,046</b>     |
| CO3                   | 784           | 5 (3,79)      | 0,006 | 9 (5,77)    | 0,011 | 0,285            |
| <b>Complejo V</b>     | 888           | 7 (5,30)      | 0,008 | 12 (7,69)   | 0,014 | 0,251            |
| ATP8                  | 681           | 0 (0)         | 0,000 | 1 (0,64)    | 0,001 | 0,317            |
| ATP8/6                | 842           | 0 (0)         | 0,000 | 0 (0)       | 0,000 | 1                |
| ATP6                  | 207           | 7 (5,30)      | 0,034 | 11 (7,05)   | 0,053 | 0,346            |
| <b>rRNA</b>           | 2537          | 19 (14,39)    | 0,007 | 27 (17,31)  | 0,011 | 0,179            |
| RNR1                  | 954           | 7 (5,30)      | 0,007 | 11 (7,05)   | 0,012 | 0,346            |
| RNR2                  | 1559          | 12 (9,09)     | 0,008 | 16 (10,26)  | 0,010 | 0,375            |
| <b>tRNA</b>           | 1508          | 3 (2,27)      | 0,002 | 5 (3,21)    | 0,003 | 0,48             |
| <b>mtDNA completo</b> | 16569         | 132 (100)     | 0,008 | 156 (100)   | 0,009 | 0,239            |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

#### IV. Perfil y carga mutacional

La Tabla 16 muestra que la **carga mutacional ajustada (CMA)** presenta un valor superior en casos ( $\bar{x} = 0,364$ ) que en controles ( $\bar{x} = 0,296$ ) (Wilcoxon test:  $P = 0,109$ ), sin embargo, esta diferencia a nivel global no es estadísticamente significativa. Ese mismo comportamiento ocurre en los complejos I y IV, y la diferencia entre cargas mutacionales del complejo IV se encuentra al borde de la significación. La carga mutacional de los complejos III y V era menor en los individuos con antecedentes de ACV, aunque las diferencias tampoco eran significativas.

A nivel más detallado, se observa que en el complejo I la carga mutacional ajustada es superior en casos en los genes ND1, ND2, ND4 y ND4L y una CMA inferior en casos para los genes ND3 y ND6. El gen ND5 presenta valores casi idénticos en casos y controles. A nivel del complejo IV, los 3 genes presentan el mismo patrón, siendo la CMA de casos superior a la de los controles. En el complejo V, el gen ATP8 y la región solapante entre ATP6 y ATP8 presentan una CMA superior en casos, al contrario que ATP6. Estas diferencias no son estadísticamente significativas, aunque las diferencias en ATP6 se encuentran en el umbral de significación.

**Tabla 16. ACV:** Carga mutacional ajustada calculada a partir de las variantes fijadas tanto en casos de ACV como en controles.

|                               | Casos                        | Controles                     | Wilcoxon<br>P-valor |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|
|                               | $\bar{x}$ (CI)               | $\bar{x}$ (CI)                |                     |
| <b>Complejo I</b>             | 0,250 (-0,049 - 0,550)       | 0,168 (-0,104 - 0,440)        | 0,098               |
| ND1                           | 0,15 (-0,121 - 0,421)        | 0,085 (-0,13 - 0,3)           | 0,091               |
| ND2                           | 0,117 (-0,113 - 0,347)       | 0,06 (-0,112 - 0,232)         | 0,086               |
| ND3                           | 0 (0 - 0)                    | 0,005 (-0,05 - 0,06)          | 0,317               |
| ND4                           | 0,017 (-0,084 - 0,118)       | 0,01 (-0,064 - 0,084)         | 0,225               |
| ND4L                          | 0,007 (-0,062 - 0,076)       | 0 (0 - 0)                     | 0,317               |
| ND5                           | 0,038 (-0,109 - 0,185)       | 0,039 (-0,113 - 0,191)        | 0,850               |
| ND6                           | 0,007 (-0,065 - 0,079)       | 0,034 (-0,111 - 0,179)        | 0,176               |
| <b>Complejo III<br/>(CYB)</b> | 0,120 (-0,123 - 0,364)       | 0,129 (-0,118 - 0,376)        | 0,927               |
| <b>Complejo IV</b>            | 0,064 (-0,133 - 0,261)       | 0,026 (-0,094 - 0,146)        | <b>0,050</b>        |
| CO1                           | 0,022 (-0,09 - 0,134)        | 0,005 (-0,051 - 0,061)        | 0,343               |
| CO2                           | 0,016 (-0,084 - 0,116)       | 0,01 (-0,061 - 0,081)         | 0,480               |
| CO3                           | 0,031 (-0,116 - 0,178)       | 0,011 (-0,068 - 0,09)         | 0,128               |
| <b>Complejo V</b>             | 0,027 (-0,097 - 0,151)       | 0,057 (-0,126 - 0,239)        | 0,112               |
| ATP6                          | 0,017 (-0,083 - 0,117)       | 0,048 (-0,123 - 0,219)        | <b>0,050</b>        |
| ATP6/8                        | 0,006 (-0,053 - 0,065)       | 0 (0 - 0)                     | 0,317               |
| ATP8                          | 0,01 (-0,062 - 0,082)        | 0,005 (-0,044 - 0,054)        | 0,414               |
| <b>Global</b>                 | <b>0,364 (0,067 - 0,661)</b> | <b>0,296 (-0,004 - 0,596)</b> | 0,109               |

Respecto a la carga mutacional en genes de tRNA, no hallamos ninguna variante con un valor de MitoTIP > 12,66, de manera que ninguna de las variantes identificadas parece tener potencial para ser patogénica.

## IV. Perfil y carga mutacional

### Infarto de miocardio

En la Tabla 17 se recogen los datos sobre la distribución de variantes a lo largo de la molécula de mtDNA en relación a la homoplasmias y en la Tabla 18 sobre las heteroplasmias, y el perfil de mtDNA de cada individuo está incluido en la Tabla suplementaria 7.

Centrándonos en las **homoplasmias** podemos observar que el número de mutaciones es superior en casos tanto a nivel de **la molécula completa** (C = 3550 vs CL = 3448; Wilcoxon test: P = 0,387) como en las **regiones codificante** (C = 2607 vs CL = 2512; Wilcoxon test: P = 0,356) y **no codificante** (C = 943 vs CL = 936; Wilcoxon test: P = 0,914), aunque las diferencias no son significativas. En las diferentes fracciones de la RNC los valores son muy similares entre casos y controles.

En el **complejo I** observamos un mayor número de homoplasmias en casos (C = 913 vs CL = 852; Wilcoxon test: P = 0,341), comportamiento estadísticamente no significativo que también se repite en todos los genes de este complejo a excepción de los genes ND2, presenta un número de homoplasmias ligeramente inferior en los casos respecto de los controles, y ND3, en el que no se detecta ninguna diferencia.

En los **complejos III, IV y V** también observamos una ligera sobrerrepresentación de variantes fijadas en los individuos con antecedentes de IM. En el complejo IV, este patrón no se sigue en todos los genes, sino que se presenta de manera leve en el gen CO2 y de manera muy marcada en el gen CO3 (C = 79 vs CL = 53; Wilcoxon test: P = 0,018) mientras que el número de homoplasmias en el gen CO1 es inferior en casos respecto a controles. En el complejo V los resultados fueron similares, con las homoplasmias ligeramente sobrerrepresentadas en casos en el gen ATP8 y en la región solapante entre ATP8 y ATP6, y el comportamiento opuesto en ATP6.

En los **genes de RNA** las homoplasmias son levemente más frecuentes en los controles tanto en los genes de tRNA (C = 112 vs CL = 123; Wilcoxon test: P = 0,596) como en los de rRNA (C = 668 vs CL = 678; Wilcoxon test: P = 0,945), aunque las diferencias son prácticamente nulas.

En la Tabla 17 también se puede observar que, el comportamiento de la relación entre el número de variantes en homoplasmia y la longitud de la región donde se encuentran, es muy similar entre los individuos con historial de infarto de miocardio y sus respectivos controles. La *ratio* más elevada se encuentra en la región no codificante (C = 0,842 y CL = 0,836), y dentro de esta en la HVR2 (C = 1,339 y CL = 1,345). En la región codificante, el complejo III presenta la mayor *ratio* (C = 0,348 y CL = 0,326). Sin embargo, a nivel génico, los genes ND4 del complejo I (C = 0,734 y CL = 0,680) y ATP6 del complejo V (C = 1,005 y CL = 1,034) son los que presentan una *ratio* más elevada.

A nivel de **heteroplasmias** (Tabla 18) observamos un número ligeramente superior en controles a nivel de **la molécula completa** (C = 221 vs CL = 225; Wilcoxon test: P = 0,357) y también en la **región codificante** (C = 146 vs CL = 154; Wilcoxon test: P = 0,248), mientras que en la **región NC** las heteroplasmias son muy ligeramente superiores en casos (C = 75 vs CL = 71; Wilcoxon test: P = 1).

#### IV. Perfil y carga mutacional

**Tabla 17. IM:** Número y ratio de homoplasmas en casos de IM y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.

| Región mitocondrial   | Longitud (bp) | Homoplasmas  |              |              |              | Wilcoxon P-valor |
|-----------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
|                       |               | Casos        |              | Controles    |              |                  |
|                       |               | $\Sigma$ (%) | $\Sigma$ /pb | $\Sigma$ (%) | $\Sigma$ /pb |                  |
| <b>NCR</b>            | 1120          | 943 (26,56)  | 0,842        | 936 (27,15)  | 0,836        | 0,914            |
| HVR1                  | 360           | 335 (9,44)   | 0,931        | 326 (9,45)   | 0,906        | 0,722            |
| HVR2                  | 316           | 423 (11,92)  | 1,339        | 425 (12,33)  | 1,345        | 0,93             |
| HVR3                  | 137           | 68 (1,92)    | 0,496        | 51 (1,48)    | 0,372        | 0,19             |
| Otras regiones        | 307           | 117 (3,3)    | 0,381        | 134 (3,89)   | 0,436        | 0,09             |
| <b>CR</b>             | 15449         | 2607 (73,44) | 0,169        | 2512 (72,85) | 0,163        | 0,356            |
| <b>Complex I</b>      | 6356          | 913 (25,72)  | 0,144        | 852 (24,71)  | 0,134        | 0,341            |
| ND1                   | 956           | 99 (2,79)    | 0,104        | 87 (2,52)    | 0,091        | 0,293            |
| ND2                   | 1042          | 264 (7,44)   | 0,253        | 268 (7,77)   | 0,257        | 0,835            |
| ND3                   | 346           | 41 (1,15)    | 0,118        | 41 (1,19)    | 0,118        | 0,935            |
| ND4L                  | 1378          | 24 (0,68)    | 0,017        | 19 (0,55)    | 0,014        | 0,398            |
| ND4                   | 297           | 218 (6,14)   | 0,734        | 202 (5,86)   | 0,680        | 0,505            |
| ND5                   | 1812          | 215 (6,06)   | 0,119        | 191 (5,54)   | 0,105        | 0,235            |
| ND6                   | 525           | 52 (1,46)    | 0,099        | 44 (1,28)    | 0,084        | 0,443            |
| <b>Complex III</b>    | 1141          | 397 (11,18)  | 0,348        | 372 (10,79)  | 0,326        | 0,426            |
| <b>Complex IV</b>     | 3010          | 278 (7,83)   | 0,092        | 260 (7,54)   | 0,086        | 0,301            |
| CO1                   | 1542          | 160 (4,51)   | 0,104        | 175 (5,08)   | 0,113        | 0,472            |
| CO2                   | 684           | 39 (1,1)     | 0,057        | 32 (0,93)    | 0,047        | 0,34             |
| CO3                   | 784           | 79 (2,23)    | 0,101        | 53 (1,54)    | 0,068        | <b>0,018</b>     |
| <b>Complex V</b>      | 888           | 230 (6,48)   | 0,259        | 226 (6,55)   | 0,255        | 0,74             |
| ATP8                  | 681           | 15 (0,42)    | 0,022        | 10 (0,29)    | 0,015        | 0,317            |
| ATP8/6                | 842           | 7 (0,2)      | 0,008        | 2 (0,06)     | 0,002        | 0,096            |
| ATP6                  | 207           | 208 (5,86)   | 1,005        | 214 (6,21)   | 1,034        | 0,515            |
| <b>rRNA</b>           | 2537          | 668 (18,82)  | 0,263        | 675 (19,58)  | 0,266        | 0,945            |
| RNR1                  | 954           | 362 (10,2)   | 0,379        | 379 (10,99)  | 0,397        | 0,214            |
| RNR2                  | 1559          | 306 (8,62)   | 0,196        | 296 (8,58)   | 0,190        | 0,549            |
| <b>tRNA</b>           | 1508          | 112 (3,15)   | 0,074        | 123 (3,57)   | 0,082        | 0,596            |
| <b>mtDNA completo</b> | 16569         | 3550 (100)   | 0,214        | 3448 (100)   | 0,208        | 0,387            |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

Dentro de la RNC detectamos diferencias significativas en la distribución de heteroplasmas tanto en la región HVR3 (C = 13 vs CL = 2; Wilcoxon test: P = 0,022), como fuera de las 3 regiones hipervariables (C = 1 vs CL = 6; Wilcoxon test: P = 0,025). En la región hipervariable 3 podemos ver una sobrerrepresentación de heteroplasmas en los individuos que, con antecedentes de IM, algo que de manera mucho menos marcada también podemos observar en la HVR2. Por el contrario, fuera de las regiones hipervariables, las heteroplasmas son significativamente más frecuentes en controles, patrón que también sigue la HVR1.

#### IV. Perfil y carga mutacional

En los complejos de la OXPHOS hallamos una sobrerrepresentación estadísticamente significativa de heteroplasmas en los casos en el complejo IV (C = 33 vs CL = 13; Wilcoxon test: P = 0,045), mientras que el resto de los complejos presentan el comportamiento inverso.

El **complejo I** presenta un número de heteroplasmas ligeramente superior en controles (C = 52 vs CL = 56; Wilcoxon test: P = 0,381), patrón especialmente marcado en el gen ND1 (C = 5 vs CL = 12; Wilcoxon test: P = 0,090). Las heteroplasmas son ligeramente más frecuentes en casos en los genes ND2, ND4L y ND6, mientras que ND3, ND4 y ND5 presentan valores muy similares en casos y controles. Las mutaciones en heteroplasma también son más frecuentes en controles en los **complejos III** (C = 11 vs CL = 19; Wilcoxon test: P = 0,168) y **V** (C = 11 vs CL = 17; Wilcoxon test: P = 0,276). El comportamiento que observamos en el **complejo IV** es constante en los 3 genes que componen la parte codificada mitocondrialmente, y es especialmente pronunciado en el gen CO2 (C = 12 vs CL = 1; Wilcoxon test: P = 0,096).

El número de heteroplasmas en los **genes de rRNA** es superior en controles (C = 26 vs CL = 39; Wilcoxon test: P = 0,121). Por el contrario, en los genes de tRNA las heteroplasmas son ligeramente más frecuentes en casos (C = 12 vs CL = 10; Wilcoxon test: P = 0,704).

A nivel de la *ratio* de heteroplasmas (Tabla 18) se constata que los casos y controles siguen un patrón muy similar, siendo la región no codificante (C = 0,067 y CL = 0,063) la que presenta un valor más elevado. Concretamente la región hipervariable 2 (C = 0,114 y CL = 0,104). Como ya se ha visto reflejado en el número de heteroplasmas, la *ratio* de la HVR3 es muy diferente entre casos y controles (C = 0,095 y CL = 0,015). En la región codificante se puede observar que la *ratio* es muy similar entre todos los complejos de la OXPHOS e incluso los genes de rRNA, siendo más baja en los genes de tRNA. A nivel génico, los genes ND4 (C = 0,037 y CL = 0,040) y ATP6 (C = 0,048 y CL = 0,077) son los que presentan una *ratio* mayor.

A nivel global observamos que **la carga mutacional ajustada** (Tabla 19) es bastante superior en los individuos con antecedentes de IM ( $\bar{x}$  = 0,324) en relación con sus controles ( $\bar{x}$  = 0,264), aunque esta diferencia no llega a la significación estadística (Wilcoxon test: P = 0,083). Los complejos I y III siguen este mismo patrón. Por el contrario, el complejo V presenta una CMA superior en controles, mientras que la CMA del complejo IV es muy similar en los dos grupos.

Analizando gen a gen, detectamos que las diferencias son generalmente pequeñas (CMA ligeramente superiores en casos en los genes: ND1, ND2, ND5, CYB, CO2, CO3, ATP6/8 y CMA ligeramente inferiores en casos en los genes: ND4, ND4L, ND6, ATP6 y ATP8). La diferencia más notable se encuentra en el gen CO1 donde observamos una CMA significativamente superior en los controles (C:  $\bar{x}$  = 0 vs CL:  $\bar{x}$  = 0,022; Wilcoxon test: P = 0,026).

#### IV. Perfil y carga mutacional

**Tabla 18. IM:** Número y ratio de heteroplasmas en casos de IM y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.

| Región mitocondrial   | Longitud (bp) | Heteroplasmas |       |             |       | Wilcoxon P-valor |
|-----------------------|---------------|---------------|-------|-------------|-------|------------------|
|                       |               | Casos         |       | Controles   |       |                  |
|                       |               | Σ (%)         | Σ/pb  | Σ (%)       | Σ/pb  |                  |
| <b>NCR</b>            | 1120          | 75 (33,94)    | 0,067 | 71 (31,56)  | 0,063 | 1                |
| HVR1                  | 360           | 25 (11,31)    | 0,069 | 30 (13,33)  | 0,083 | 0,65             |
| HVR2                  | 316           | 36 (16,29)    | 0,114 | 33 (14,67)  | 0,104 | 0,942            |
| HVR3                  | 137           | 13 (5,88)     | 0,095 | 2 (0,89)    | 0,015 | <b>0,022</b>     |
| Otras regiones        | 307           | 1 (0,45)      | 0,003 | 6 (2,67)    | 0,020 | <b>0,025</b>     |
| <b>CR</b>             | 15449         | 146 (66,06)   | 0,009 | 154 (68,44) | 0,010 | 0,248            |
| <b>Complex I</b>      | 6356          | 52 (23,53)    | 0,008 | 56 (24,89)  | 0,009 | 0,381            |
| ND1                   | 956           | 5 (2,26)      | 0,005 | 12 (5,33)   | 0,013 | 0,09             |
| ND2                   | 1042          | 6 (2,71)      | 0,006 | 4 (1,78)    | 0,004 | 0,527            |
| ND3                   | 346           | 1 (0,45)      | 0,003 | 2 (0,89)    | 0,006 | 0,564            |
| ND4L                  | 1378          | 2 (0,9)       | 0,001 | 0 (0)       | 0,000 | 0,157            |
| ND4                   | 297           | 11 (4,98)     | 0,037 | 12 (5,33)   | 0,040 | 0,84             |
| ND5                   | 1812          | 21 (9,5)      | 0,012 | 23 (10,22)  | 0,013 | 0,844            |
| ND6                   | 525           | 6 (2,71)      | 0,011 | 3 (1,33)    | 0,006 | 0,317            |
| <b>Complex III</b>    | 1141          | 11 (4,98)     | 0,010 | 19 (8,44)   | 0,017 | 0,168            |
| <b>Complex IV</b>     | 3010          | 33 (14,93)    | 0,011 | 13 (5,78)   | 0,004 | <b>0,045</b>     |
| CO1                   | 1542          | 12 (5,43)     | 0,008 | 8 (3,56)    | 0,005 | 0,394            |
| CO2                   | 684           | 12 (5,43)     | 0,018 | 1 (0,44)    | 0,001 | 0,096            |
| CO3                   | 784           | 9 (4,07)      | 0,011 | 4 (1,78)    | 0,005 | 0,166            |
| <b>Complex V</b>      | 888           | 11 (4,98)     | 0,012 | 17 (7,56)   | 0,019 | 0,276            |
| ATP8                  | 681           | 1 (0,45)      | 0,001 | 1 (0,44)    | 0,001 | 1                |
| ATP8/6                | 842           | 0 (0)         | 0,000 | 0 (0)       | 0,000 | 1                |
| ATP6                  | 207           | 10 (4,52)     | 0,048 | 16 (7,11)   | 0,077 | 0,26             |
| <b>rRNA</b>           | <b>2537</b>   | 26 (11,76)    | 0,010 | 39 (17,33)  | 0,015 | 0,121            |
| RNR1                  | 954           | 14 (6,33)     | 0,015 | 18 (8)      | 0,019 | 0,493            |
| RNR2                  | 1559          | 12 (5,43)     | 0,008 | 21 (9,33)   | 0,013 | 0,14             |
| <b>tRNA</b>           | 1508          | 12 (5,43)     | 0,008 | 10 (4,44)   | 0,007 | 0,704            |
| <b>mtDNA completo</b> | 16569         | 221 (100)     | 0,013 | 225 (100)   | 0,014 | 0,357            |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

En relación con la carga mutacional de los genes de tRNAs, observamos dos homoplasmas que superaban el umbral de 12,66. La variante m.7543A>G en el tRNA<sup>Asp</sup>, presente en el caso 213 con un valor de patogenicidad de 15,055 (percentil 67,3%); y la variante m.8358A>G del tRNA<sup>Lys</sup>, en el caso 158 con un valor de MitoTIP = 12,867 (percentil 52,2%).



## IV. Perfil y carga mutacional

**Tabla 19. IM:** Carga mutacional ajustada calculada a partir de las variantes fijadas tanto en casos de IM como en controles.

|                       | Casos                  | Controles              | Wilcoxon<br>P-valor |
|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
|                       | $\bar{x}$ (CI)         | $\bar{x}$ (CI)         |                     |
| Complejo I            | 0,216 (-0,083 - 0,514) | 0,173 (-0,106 - 0,453) | 0,295               |
| ND1                   | 0,128 (-0,126 - 0,381) | 0,117 (-0,129 - 0,363) | 0,690               |
| ND2                   | 0,087 (-0,128 - 0,301) | 0,083 (-0,126 - 0,292) | 0,813               |
| ND3                   | 0 (0 - 0)              | 0 (0 - 0)              | 1,000               |
| ND4                   | 0,004 (-0,053 - 0,062) | 0,007 (-0,057 - 0,072) | 1,000               |
| ND4L                  | 0,004 (-0,052 - 0,061) | 0,012 (-0,077 - 0,1)   | 0,450               |
| ND5                   | 0,053 (-0,123 - 0,229) | 0,03 (-0,106 - 0,166)  | 0,339               |
| ND6                   | 0,004 (-0,047 - 0,054) | 0,006 (-0,049 - 0,062) | 1,000               |
| Complejo III<br>(CYB) | 0,114 (-0,127 - 0,355) | 0,082 (-0,125 - 0,29)  | 0,183               |
| Complejo IV           | 0,045 (-0,114 - 0,205) | 0,045 (-0,112 - 0,203) | 0,709               |
| CO1                   | 0 (0 - 0)              | 0,022 (-0,091 - 0,135) | <b>0,026</b>        |
| CO2                   | 0,026 (-0,091 - 0,143) | 0,013 (-0,068 - 0,093) | 0,197               |
| CO3                   | 0,024 (-0,102 - 0,149) | 0,014 (-0,078 - 0,107) | 0,438               |
| Complejo V            | 0,043 (-0,121 - 0,207) | 0,054 (-0,119 - 0,227) | 0,893               |
| ATP6                  | 0,031 (-0,108 - 0,17)  | 0,037 (-0,112 - 0,187) | 0,887               |
| ATP6/8                | 0,004 (-0,053 - 0,062) | 0 (0 - 0)              | 0,317               |
| ATP8                  | 0,008 (-0,063 - 0,078) | 0,016 (-0,077 - 0,11)  | 0,499               |
| Global                | 0,324 (0,012 - 0,635)  | 0,264 (-0,039 - 0,567) | 0,083               |

### Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio

El perfil de mtDNA de cada individuo está incluido en la Tabla suplementaria 7. En la Tabla 20 se incluyen el número de variantes fijadas de casos y controles estratificados en función de la región del mtDNA donde se encuentran y también la *ratio* en función de la longitud de la región donde se encuentran. En la Tabla 21 se incluye la misma información respecto a las variantes en heteroplasmia.

El número de **homoplasmas** manifiesta diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, observándose un número de homoplasmas superior en los controles, tanto a nivel de la **molécula completa** (C = 1319 vs CL = 1589, P = 0,009) como en la **región no codificante** (C = 356 vs CL = 431, P = 0,020) y en la **región codificante** (C = 963 vs CL = 1158, P = 0,012). Dentro de la región no codificante este comportamiento se mantiene en todas las HVRs, aunque las diferencias únicamente son significativas en la HVR1 (C = 118 vs CL = 157, P = 0,037).

El mismo comportamiento se observa también en todos los complejos de la OXPHOS (**Complejo I, III, IV y V**), y en la gran mayoría de genes. No obstante, las únicas diferencias significativas las presenta el complejo I, con un número significativamente superior de homoplasmas en controles (C = 326 vs CL = 423, P = 0,008). Dentro de los genes que componen este complejo, ND4 y ND5 son en los que detectamos una mayor diferencia entre casos y controles.

#### IV. Perfil y carga mutacional

Tanto en los genes de tRNA como de rRNA observamos una sobrerrepresentación de variantes fijadas en los controles. Las diferencias son estadísticamente significativas para el conjunto de genes de tRNA (C = 32 vs CL = 54, P = 0,023) y para el gen de rRNA RNR2 (C = 106 vs CL = 133, P = 0,024).

**Tabla 20. ACV e IM:** Número y ratio de variantes fijadas en casos con ambas patologías y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.

| Región mitocondrial   | Longitud (bp) | Homoplasmias |       |              |       | Wilcoxon P-valor |
|-----------------------|---------------|--------------|-------|--------------|-------|------------------|
|                       |               | Casos        |       | Controles    |       |                  |
|                       |               | Σ (%)        | Σ/pb  | Σ (%)        | Σ/pb  |                  |
| <b>NCR</b>            | 1120          | 356 (26,99)  | 0,318 | 431 (27,12)  | 0,385 | <b>0,02</b>      |
| HVR1                  | 360           | 118 (8,95)   | 0,328 | 157 (9,88)   | 0,436 | <b>0,037</b>     |
| HVR2                  | 316           | 161 (12,21)  | 0,509 | 192 (12,08)  | 0,608 | 0,057            |
| HVR3                  | 137           | 27 (2,05)    | 0,197 | 30 (1,89)    | 0,219 | 0,837            |
| Otras regiones        | 307           | 50 (3,79)    | 0,163 | 52 (3,27)    | 0,169 | 0,752            |
| <b>CR</b>             | 15449         | 963 (73,01)  | 0,062 | 1158 (72,88) | 0,075 | <b>0,012</b>     |
| <b>Complejo I</b>     | 6356          | 326 (24,72)  | 0,051 | 423 (26,62)  | 0,067 | <b>0,008</b>     |
| ND1                   | 956           | 30 (2,27)    | 0,031 | 38 (2,39)    | 0,040 | 0,37             |
| ND2                   | 1042          | 103 (7,81)   | 0,099 | 109 (6,86)   | 0,105 | 0,371            |
| ND3                   | 346           | 18 (1,36)    | 0,052 | 20 (1,26)    | 0,058 | 0,686            |
| ND4L                  | 1378          | 6 (0,45)     | 0,004 | 7 (0,44)     | 0,005 | 0,782            |
| ND4                   | 297           | 74 (5,61)    | 0,249 | 117 (7,36)   | 0,394 | <b>0,004</b>     |
| ND5                   | 1812          | 73 (5,53)    | 0,040 | 100 (6,29)   | 0,055 | 0,099            |
| ND6                   | 525           | 22 (1,67)    | 0,042 | 32 (2,01)    | 0,061 | 0,194            |
| <b>Complejo III</b>   | 1141          | 145 (10,99)  | 0,127 | 164 (10,32)  | 0,144 | 0,222            |
| <b>Complejo IV</b>    | 3010          | 109 (8,26)   | 0,036 | 135 (8,5)    | 0,045 | 0,14             |
| CO1                   | 1542          | 68 (5,16)    | 0,044 | 89 (5,6)     | 0,058 | 0,139            |
| CO2                   | 684           | 17 (1,29)    | 0,025 | 19 (1,2)     | 0,028 | 0,705            |
| CO3                   | 784           | 24 (1,82)    | 0,031 | 27 (1,7)     | 0,034 | 0,567            |
| <b>Complejo V</b>     | 888           | 91 (6,9)     | 0,102 | 100 (6,29)   | 0,113 | 0,175            |
| ATP8                  | 681           | 6 (0,45)     | 0,009 | 9 (0,57)     | 0,013 | 0,257            |
| ATP8/6                | 842           | 2 (0,15)     | 0,002 | 0 (0)        | 0,000 | 0,157            |
| ATP6                  | 207           | 83 (6,29)    | 0,401 | 91 (5,73)    | 0,440 | 0,129            |
| <b>rRNA</b>           | 2537          | 256 (19,41)  | 0,101 | 281 (17,68)  | 0,111 | 0,074            |
| RNR1                  | 954           | 150 (11,37)  | 0,157 | 148 (9,31)   | 0,155 | 0,903            |
| RNR2                  | 1559          | 106 (8,04)   | 0,068 | 133 (8,37)   | 0,085 | <b>0,024</b>     |
| <b>tRNA</b>           | 1508          | 32 (2,43)    | 0,021 | 54 (3,4)     | 0,036 | <b>0,023</b>     |
| <b>mtDNA completo</b> | 16569         | 1319 (100)   | 0,080 | 1589 (100)   | 0,096 | <b>0,009</b>     |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

La *ratio* de homoplasmias (Tabla 20) presenta el mismo patrón en casos y en controles. Se puede observar cómo la región con una *ratio* más elevada es la región no codificante (C = 0,318 y CL = 0,385), y dentro de ésta, la HVR2 (C = 0,509 y CL = 0,608). El complejo III, es de la

#### IV. Perfil y carga mutacional

región codificante, el que presenta el valor más elevado ( $C = 0,127$  y  $CL = 0,144$ ). A nivel de genes destacan el gen ND4 ( $C = 0,249$  y  $CL = 0,394$ ) y el gen ATP6 ( $C = 0,401$  y  $CL = 0,440$ ).

En el análisis de la distribución de **heteroplasmas** hallamos valores muy similares entre individuos que han presentado ACV e IM y sus controles. Las únicas diferencias destacables las encontramos en el gen ND1 del complejo I, donde las heteroplasmas son significativamente más frecuentes en casos que en controles ( $C = 5$  vs  $CL = 0$ ,  $P = 0,025$ ); y en el gen RNR2, donde las heteroplasmas son más frecuentes en controles ( $C = 2$  vs  $CL = 7$ ,  $P = 0,096$ ), aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

**Tabla 21. ACV e IM: Número y ratio de heteroplasmas en casos con ambas patologías y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.**

| Región<br>mitochondrial | Longitud<br>(bp) | Heteroplasmas |              |              |              | Wilcoxon<br>P-valor |
|-------------------------|------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|
|                         |                  | Casos         |              | Controles    |              |                     |
|                         |                  | $\Sigma$ (%)  | $\Sigma$ /pb | $\Sigma$ (%) | $\Sigma$ /pb |                     |
| <b>NCR</b>              | 1120             | 28 (31,11)    | 0,025        | 24 (26,67)   | 0,021        | 0,746               |
| HVR1                    | 360              | 7 (7,78)      | 0,019        | 11 (12,22)   | 0,031        | 0,4                 |
| HVR2                    | 316              | 5 (5,56)      | 0,016        | 2 (2,22)     | 0,006        | 0,45                |
| HVR3                    | 137              | 14 (15,56)    | 0,102        | 11 (12,22)   | 0,080        | 0,651               |
| Otras regiones          | 307              | 2 (2,22)      | 0,007        | 0 (0)        | 0,000        | 0,157               |
| <b>CR</b>               | 15449            | 62 (68,89)    | 0,004        | 66 (73,33)   | 0,004        | 0,844               |
| <b>Complejo I</b>       | 6356             | 28 (31,11)    | 0,004        | 18 (20)      | 0,003        | 0,216               |
| ND1                     | 956              | 5 (5,56)      | 0,005        | 0 (0)        | 0,000        | <b>0,025</b>        |
| ND2                     | 1042             | 3 (3,33)      | 0,003        | 5 (5,56)     | 0,005        | 0,527               |
| ND3                     | 346              | 1 (1,11)      | 0,003        | 1 (1,11)     | 0,003        | 1                   |
| ND4L                    | 1378             | 0 (0)         | 0,000        | 1 (1,11)     | 0,001        | 0,317               |
| ND4                     | 297              | 7 (7,78)      | 0,024        | 3 (3,33)     | 0,010        | 0,317               |
| ND5                     | 1812             | 10 (11,11)    | 0,006        | 7 (7,78)     | 0,004        | 0,448               |
| ND6                     | 525              | 2 (2,22)      | 0,004        | 1 (1,11)     | 0,002        | 0,564               |
| <b>Complejo III</b>     | 1141             | 6 (6,67)      | 0,005        | 10 (11,11)   | 0,009        | 0,396               |
| <b>Complejo IV</b>      | 3010             | 11 (12,22)    | 0,004        | 14 (15,56)   | 0,005        | 0,693               |
| CO1                     | 1542             | 5 (5,56)      | 0,003        | 9 (10)       | 0,006        | 0,38                |
| CO2                     | 684              | 4 (4,44)      | 0,006        | 4 (4,44)     | 0,006        | 1                   |
| CO3                     | 784              | 2 (2,22)      | 0,003        | 1 (1,11)     | 0,001        | 0,564               |
| <b>Complejo V</b>       | 888              | 2 (2,22)      | 0,002        | 6 (6,67)     | 0,007        | 0,206               |
| ATP8                    | 681              | 0 (0)         | 0,000        | 0 (0)        | 0,000        | 1                   |
| ATP8/6                  | 842              | 0 (0)         | 0,000        | 0 (0)        | 0,000        | 1                   |
| ATP6                    | 207              | 2 (2,22)      | 0,010        | 6 (6,67)     | 0,029        | 0,206               |
| <b>rRNA</b>             | 2537             | 13 (14,44)    | 0,005        | 15 (16,67)   | 0,006        | 0,717               |
| RNR1                    | 954              | 11 (12,22)    | 0,012        | 8 (8,89)     | 0,008        | 0,518               |
| RNR2                    | 1559             | 2 (2,22)      | 0,001        | 7 (7,78)     | 0,004        | 0,096               |
| <b>tRNA</b>             | 1508             | 2 (2,22)      | 0,001        | 3 (3,33)     | 0,002        | 0,705               |
| <b>mtDNA completo</b>   | 16569            | 90 (100)      | 0,005        | 90 (100)     | 0,005        | 1                   |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

#### IV. Perfil y carga mutacional

En relación con la *ratio* de heteroplasmias se puede ver un comportamiento muy similar entre casos y controles. La región no codificante (C = 0,025 y CL = 0,021) presenta valores superiores a la región codificante (C = 0,004 y CL = 0,004), y los valores más elevados los encontramos en la región hipervariable 3 (C = 0,102 y CL = 0,080). Los complejos de la cadena de transporte de electrones presentan *ratios* bastante similares entre ellos y al de los genes rRNA, mientras que los genes de tRNA presentan una *ratio* menor. A nivel génico, el gen ND4 presenta el valor de *ratio* más alto en casos (C = 0,024 y CL = 0,010) y el gen ATP6 en controles (C = 0,010 y CL = 0,029).

A nivel global observamos que los controles presentan una **carga mutacional ajustada** ligeramente superior a la de los casos (C:  $\bar{x}$ =0,307 vs CL:  $\bar{x}$ =0,335; Wilcoxon test: P = 0,700), patrón que también encontramos en los complejos I, IV y V (Tabla 22). Sin embargo, ninguna de estas diferencias es significativa. A nivel génico las diferencias más marcadas las encontramos en los genes CO2 (C:  $\bar{x}$  = 0 vs CL:  $\bar{x}$  = 0,033; Wilcoxon test: P = 0,066) y ATP8 (C:  $\bar{x}$  = 0,016 vs CL:  $\bar{x}$  = 0,042; Wilcoxon test: P = 0,059), en ambos casos con una carga mutacional superior en controles.

**Tabla 22. ACV e IM:** Carga mutacional ajustada calculada a partir de las variantes fijadas tanto en casos con ambas patologías como en controles.

|                       | Casos                   | Controles               | Wilcoxon<br>P-valor |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
|                       | $\bar{x}$ (CI)          | $\bar{x}$ (CI)          |                     |
| Complejo I            | 0,217 (-0,078 - 0,14)   | 0,224 (-0,079 - 0,145)  | 0,922               |
| ND1                   | 0,124 (-0,132 - -0,008) | 0,134 (-0,13 - 0,004)   | 0,794               |
| ND2                   | 0,101 (-0,116 - -0,015) | 0,073 (-0,129 - -0,055) | 0,937               |
| ND3                   | 0 (0 - 0)               | 0 (0 - 0)               | 1,000               |
| ND4                   | 0,01 (-0,069 - -0,059)  | 0,019 (-0,09 - -0,071)  | 0,564               |
| ND4L                  | 0 (0 - 0)               | 0,022 (-0,103 - -0,081) | 0,157               |
| ND5                   | 0,039 (-0,117 - -0,078) | 0,053 (-0,119 - -0,065) | 0,798               |
| ND6                   | 0,028 (-0,103 - -0,074) | 0 (0 - 0)               | 0,109               |
| Complejo III<br>(CYB) | 0,073 (-0,129 - -0,055) | 0,053 (-0,117 - -0,065) | 0,556               |
| Complejo IV           | 0,045 (-0,115 - -0,07)  | 0,085 (-0,121 - -0,035) | 0,509               |
| CO1                   | 0,037 (-0,112 - -0,074) | 0,044 (-0,113 - -0,069) | 0,726               |
| CO2                   | 0 (0 - 0)               | 0,033 (-0,1 - -0,067)   | 0,066               |
| CO3                   | 0,008 (-0,058 - -0,05)  | 0,008 (-0,057 - -0,049) | 1,000               |
| Complejo V            | 0,044 (-0,113 - -0,069) | 0,063 (-0,125 - -0,062) | 0,514               |
| ATP6                  | 0,028 (-0,104 - -0,075) | 0,03 (-0,111 - -0,081)  | 0,600               |
| ATP6/8                | 0 (0 - 0)               | 0 (0 - 0)               | 1,000               |
| ATP8                  | 0,016 (-0,075 - -0,059) | 0,042 (-0,106 - -0,065) | 0,059               |
| Global                | 0,307 (0 - 0,306)       | 0,335 (0,029 - 0,363)   | 0,700               |

Respecto a la carga mutacional asociada a variantes en los genes de tRNAs, no identificamos ninguna homoplasmia con un valor de patogenicidad superior a 12,66 ni en casos ni en controles.

## IV. Perfil y carga mutacional

### Enfermedad cardiovascular global

En las Tablas 23 y 24 se incluyen el número de variantes fijadas y posiciones con heteroplasmia de casos y controles estratificados en función de la región del mtDNA donde se encuentran, y el perfil de mtDNA completo de cada individuo está incluido en la Tabla suplementaria 7.

En relación a las **homoplasmas**, observamos que tanto a nivel de la **molécula completa** (C = 4872 vs CL = 5037, P = 0,577) como en la **RC** (C = 3573 vs CL = 3670, P = 0,699) y **NCR** (C = 1299 vs CL = 1367, P = 0,232), los controles presentan un número superior de mutaciones, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Dentro de la región no codificante, este patrón se mantiene en todas las hipervariables menos en las HVR3, que presenta un número de homoplasmas ligeramente superior en los casos.

Analizando complejo a complejo, vimos que tanto el **complejo I** (C = 1240 vs CL = 1275, P = 0,668), como el **complejo IV** (C = 388 vs CL = 395, P = 0,951) y el **complejo V** (C = 321 vs CL = 326, P = 0,695) presentan una sobrerrepresentación de homoplasmas no significativa en controles. Mientras que el **complejo III** presenta el comportamiento contrario. Todos los genes del complejo I (ND1-ND6) presentan valores muy similares en casos y controles; el número de homoplasmas en ND1 y ND4L es ligeramente superior en casos mientras que en el resto de genes es superior en controles. Dentro del complejo IV es donde encontramos una de las diferencias más notables. El gen CO3 presenta un número bastante superior de homoplasmas en casos respecto a controles (C = 104 vs CL = 80, P = 0,056), patrón que también observamos en el gen CO2, aunque de manera mucho más leve. Por el contrario, el gen CO1 presenta un número mayor de mutaciones fijadas en controles. Dentro del complejo V detectamos una sobrerrepresentación de homoplasmas en casos para el gen ATP8 y la región solapante entre ATP8 y ATP6 (C = 9 vs CL = 2, P = 0,035), siendo esta última significativa. El número de mutaciones fijadas en ATP6 es superior en controles.

Tanto los **genes de tRNA** (C = 144 vs CL = 177, P = 0,116) como de **rRNA** (C = 924 vs CL = 956, P = 0,430) presentan un número de homoplasmas superior en controles.

A nivel de la *ratio* de mutaciones (Tabla 23) se observa un comportamiento prácticamente idéntico entre casos y controles. La mayor tasa de homoplasmas en relación con la longitud de la región analizada se encuentra en la región no codificante (C = 1,160 y CL = 1,221), y dentro de esta en la HVR2 (C = 1,848 y CL = 1,953). En la región codificante, el complejo III presenta la *ratio* más elevada (C = 0,476 y CL = 0,470), aunque a nivel génico se ve sobrepasada tanto por el gen ND4 del complejo I (C = 0,983 y CL = 1,074), como ATP6 del complejo V (C = 1,406 y CL = 1,473).

A nivel de **heteroplasmas** (Tabla 24), observamos que son más frecuentes en controles, tanto a nivel de la **molécula completa** (C = 443 vs CL = 471, P = 0,484) como en la **región codificante** (C = 295 vs CL = 325, P = 0,287). Mientras que en la **región no codificante** son ligeramente más frecuentes en casos (C = 148 vs CL = 146, P = 0,858). Dentro de la región no codificante, la HVR1 presenta un mayor número de heteroplasmas en controles, mientras que la HVR2 y HVR3 presentan el comportamiento opuesto, siendo la diferencia en HVR3 (C = 36 vs CL = 27, P = 0,051) destacable.

El complejo I (C = 115 vs CL = 115, P = 0,983) presenta valores muy similares de heteroplasmas en todos sus genes (entre casos y controles). Tanto el **complejo III** (C = 25 vs CL = 35, P = 0,106) como el **complejo V** (C = 20 vs CL = 35, P = 0,115) presentan un número de heteroplasmas

#### IV. Perfil y carga mutacional

bastante superior en controles, especialmente en el gen ATP6 (C = 19 vs CL = 33, P = 0,106). En el **complejo IV** (C = 59 vs CL = 41, P = 0,187) notamos el comportamiento inverso, el cual es especialmente destacable en el gen CO2 (C = 20 vs CL = 5, P = 0,266).

**Tabla 23. ECV global:** Número y ratio de variantes fijadas en casos de ECV global y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.

| Región mitocondrial   | Longitud (bp) | Homoplasmias |       |              |       | Wilcoxon P-valor |
|-----------------------|---------------|--------------|-------|--------------|-------|------------------|
|                       |               | Casos        |       | Controles    |       |                  |
|                       |               | Σ (%)        | Σ/pb  | Σ (%)        | Σ/pb  |                  |
| <b>NCR</b>            | 1120          | 1299 (26,66) | 1,160 | 1367 (27,14) | 1,221 | 0,232            |
| HVR1                  | 360           | 453 (9,3)    | 1,258 | 483 (9,59)   | 1,342 | 0,362            |
| HVR2                  | 316           | 584 (11,99)  | 1,848 | 617 (12,25)  | 1,953 | 0,345            |
| HVR3                  | 137           | 95 (1,95)    | 0,693 | 81 (1,61)    | 0,591 | 0,331            |
| Otras regiones        | 307           | 167 (3,43)   | 0,544 | 186 (3,69)   | 0,606 | 0,109            |
| <b>CR</b>             | 15449         | 3573 (73,34) | 0,231 | 3670 (72,86) | 0,238 | 0,699            |
| <b>Complejo I</b>     | 6356          | 1240 (25,45) | 0,195 | 1275 (25,31) | 0,201 | 0,668            |
| ND1                   | 956           | 129 (2,65)   | 0,135 | 125 (2,48)   | 0,131 | 0,762            |
| ND2                   | 1042          | 368 (7,55)   | 0,353 | 377 (7,48)   | 0,362 | 0,53             |
| ND3                   | 346           | 59 (1,21)    | 0,171 | 61 (1,21)    | 0,176 | 0,875            |
| ND4L                  | 1378          | 30 (0,62)    | 0,022 | 26 (0,52)    | 0,019 | 0,564            |
| ND4                   | 297           | 292 (5,99)   | 0,983 | 319 (6,33)   | 1,074 | 0,323            |
| ND5                   | 1812          | 288 (5,91)   | 0,159 | 291 (5,78)   | 0,161 | 0,984            |
| ND6                   | 525           | 74 (1,52)    | 0,141 | 76 (1,51)    | 0,145 | 0,872            |
| <b>Complejo III</b>   | 1141          | 543 (11,15)  | 0,476 | 536 (10,64)  | 0,470 | 0,885            |
| <b>Complejo IV</b>    | 3010          | 388 (7,96)   | 0,129 | 395 (7,84)   | 0,131 | 0,951            |
| CO1                   | 1542          | 228 (4,68)   | 0,148 | 264 (5,24)   | 0,171 | 0,154            |
| CO2                   | 684           | 56 (1,15)    | 0,082 | 51 (1,01)    | 0,075 | 0,542            |
| CO3                   | 784           | 104 (2,13)   | 0,133 | 80 (1,59)    | 0,102 | 0,056            |
| <b>Complejo V</b>     | 888           | 321 (6,59)   | 0,361 | 326 (6,47)   | 0,367 | 0,695            |
| ATP8                  | 681           | 21 (0,43)    | 0,031 | 19 (0,38)    | 0,028 | 0,724            |
| ATP8/6                | 842           | 9 (0,18)     | 0,011 | 2 (0,04)     | 0,002 | <b>0,035</b>     |
| ATP6                  | 207           | 291 (5,97)   | 1,406 | 305 (6,06)   | 1,473 | 0,184            |
| <b>rRNA</b>           | 2537          | 924 (18,97)  | 0,364 | 956 (18,98)  | 0,377 | 0,43             |
| RNR1                  | 954           | 512 (10,51)  | 0,537 | 527 (10,46)  | 0,552 | 0,289            |
| RNR2                  | 1559          | 412 (8,46)   | 0,264 | 429 (8,52)   | 0,275 | 0,525            |
| <b>tRNA</b>           | 1508          | 144 (2,96)   | 0,095 | 177 (3,51)   | 0,117 | 0,116            |
| <b>mtDNA completo</b> | 16569         | 4872 (100)   | 0,294 | 5037 (100)   | 0,304 | 0,577            |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

En los **genes de rRNA** (C = 58 vs CL = 81, P = 0,135) observamos un mayor número de heteroplasmias en los controles, diferencia que es estadísticamente significativa en el gen RNR2 (C = 26 vs CL = 44, P = 0,039), aunque también vemos este patrón en RNR1. La frecuencia

#### IV. Perfil y carga mutacional

de heteroplasmas en **genes de tRNA** es muy similar entre casos y controles (C = 17 vs CL = 18, P = 0,902).

En cuanto a la *ratio* de heteroplasmas se ve casos y controles presentan un patrón muy similar. La región que presenta una *ratio* más elevada es la región no codificante (C = 0,132 y CL = 0,130), más específicamente la región hipervariable 3 (C = 0,263 y CL = 0,197). A nivel de la región codificante se puede observar que la *ratio* de heteroplasmas es muy similar entre todos los complejos de la OXPHOS e incluso los genes de RNA. Destacarían los genes ND4 (C = 0,094 y CL = 0,101) y ATP6 (C = 0,092 y CL = 0,159) como los que presentan una *ratio* mayor.

**Tabla 24. ECV global: Número y ratio de variantes en heteroplasma en casos de ECV global y controles estratificados en función de las diferentes regiones del genoma mitocondrial. En la columna de ratio se ha incluido un código de colores aumentando en intensidad de rojo a medida que aumenta el valor de ratio.**

| Región mitocondrial   | Longitud (bp) | Heteroplasmas |       |             |       | Wilcoxon P-valor |
|-----------------------|---------------|---------------|-------|-------------|-------|------------------|
|                       |               | Casos         |       | Controles   |       |                  |
|                       |               | Σ (%)         | Σ/pb  | Σ (%)       | Σ/pb  |                  |
| <b>NCR</b>            | 1120          | 148 (33,41)   | 0,132 | 146 (31)    | 0,130 | 0,858            |
| HVR1                  | 360           | 49 (11,06)    | 0,136 | 56 (11,89)  | 0,156 | 0,423            |
| HVR2                  | 316           | 60 (13,54)    | 0,190 | 57 (12,1)   | 0,180 | 0,823            |
| HVR3                  | 137           | 36 (8,13)     | 0,263 | 27 (5,73)   | 0,197 | 0,051            |
| Otras regiones        | 307           | 3 (0,68)      | 0,010 | 6 (1,27)    | 0,020 | 0,257            |
| <b>CR</b>             | 15449         | 295 (66,59)   | 0,019 | 325 (69)    | 0,021 | 0,287            |
| <b>Complejo I</b>     | 6356          | 115 (25,96)   | 0,018 | 115 (24,42) | 0,018 | 0,983            |
| ND1                   | 956           | 16 (3,61)     | 0,017 | 16 (3,4)    | 0,017 | 0,67             |
| ND2                   | 1042          | 12 (2,71)     | 0,012 | 13 (2,76)   | 0,012 | 1                |
| ND3                   | 346           | 2 (0,45)      | 0,006 | 5 (1,06)    | 0,014 | 0,655            |
| ND4L                  | 1378          | 3 (0,68)      | 0,002 | 2 (0,42)    | 0,001 | 0,564            |
| ND4                   | 297           | 28 (6,32)     | 0,094 | 30 (6,37)   | 0,101 | 0,732            |
| ND5                   | 1812          | 43 (9,71)     | 0,024 | 41 (8,7)    | 0,023 | 0,843            |
| ND6                   | 525           | 11 (2,48)     | 0,021 | 8 (1,7)     | 0,015 | 0,248            |
| <b>Complejo III</b>   | 1141          | 25 (5,64)     | 0,022 | 35 (7,43)   | 0,031 | 0,106            |
| <b>Complejo IV</b>    | 3010          | 59 (13,32)    | 0,020 | 41 (8,7)    | 0,014 | 0,187            |
| CO1                   | 1542          | 23 (5,19)     | 0,015 | 22 (4,67)   | 0,014 | 0,879            |
| CO2                   | 684           | 20 (4,51)     | 0,029 | 5 (1,06)    | 0,007 | 0,266            |
| CO3                   | 784           | 16 (3,61)     | 0,020 | 14 (2,97)   | 0,018 | 0,134            |
| <b>Complejo V</b>     | 888           | 20 (4,51)     | 0,023 | 35 (7,43)   | 0,039 | 0,115            |
| ATP8                  | 681           | 1 (0,23)      | 0,001 | 2 (0,42)    | 0,003 | 1                |
| ATP8/6                | 842           | 0 (0)         | 0,000 | 0 (0)       | 0,000 | 1                |
| ATP6                  | 207           | 19 (4,29)     | 0,092 | 33 (7,01)   | 0,159 | 0,106            |
| <b>rRNA</b>           | 2537          | 58 (13,09)    | 0,023 | 81 (17,2)   | 0,032 | 0,135            |
| RNR1                  | 954           | 32 (7,22)     | 0,034 | 37 (7,86)   | 0,039 | 0,898            |
| RNR2                  | 1559          | 26 (5,87)     | 0,017 | 44 (9,34)   | 0,028 | 0,039            |
| <b>tRNA</b>           | 1508          | 17 (3,84)     | 0,011 | 18 (3,82)   | 0,012 | 0,902            |
| <b>mtDNA completo</b> | 16569         | 443 (100)     | 0,027 | 471 (100)   | 0,028 | 0,484            |

NCR: región no codificante, CR: región codificante.

#### IV. Perfil y carga mutacional

Observamos una **carga mutacional ajustada** global significativamente superior en casos respecto a controles (C:  $\bar{x} = 0,333$  vs CL:  $\bar{x} = 0,288$ ; Wilcoxon test:  $P = 0,045$ ) (Tabla 25).

El complejo I también presenta una CMA superior en casos (C:  $\bar{x} = 0,227$  vs CL:  $\bar{x} = 0,181$ ; Wilcoxon test:  $P = 0,082$ ), comportamiento que también se detecta en los genes ND1, ND2, ND4, ND4L y ND5, mientras que ND3 y ND6 presentan una CMA ligeramente superior en controles.

La CMA del complejo III es superior en individuos que han presentado una ECV (C:  $\bar{x} = 0,108$  vs CL:  $\bar{x} = 0,092$ ; Wilcoxon test:  $P = 0,218$ ). Este comportamiento se mantiene en el complejo IV (C:  $\bar{x} = 0,051$  vs CL:  $\bar{x} = 0,047$ ; Wilcoxon test:  $P = 0,598$ ), aunque no en todos los genes que lo conforman. Mientras CO2 y CO3 presentan una CMA superior en casos CO1 presenta el comportamiento inverso.

La CMA del complejo V (C:  $\bar{x} = 0,038$  vs CL:  $\bar{x} = 0,057$ ; Wilcoxon test:  $P = 0,269$ ) es superior en controles, hecho que se observa también en ATP6 y ATP8.

**Tabla 25. ECV global:** Carga mutacional ajustada calculada a partir de las variantes fijadas tanto en casos de ECV global como en controles.

|                       | Casos                  | Controles              | Wilcoxon<br>P-valor |
|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
|                       | $\bar{x}$ (CI)         | $\bar{x}$ (CI)         |                     |
| Complejo I            | 0,227 (-0,071 - 0,525) | 0,181 (-0,1 - 0,463)   | 0,082               |
| ND1                   | 0,134 (-0,125 - 0,393) | 0,11 (-0,13 - 0,35)    | 0,251               |
| ND2                   | 0,099 (-0,121 - 0,319) | 0,074 (-0,123 - 0,27)  | 0,320               |
| ND3                   | 0 (0 - 0)              | 0,002 (-0,029 - 0,033) | 0,317               |
| ND4                   | 0,009 (-0,068 - 0,087) | 0,01 (-0,068 - 0,088)  | 0,788               |
| ND4L                  | 0,004 (-0,051 - 0,06)  | 0,01 (-0,073 - 0,093)  | 0,366               |
| ND5                   | 0,045 (-0,118 - 0,208) | 0,038 (-0,111 - 0,186) | 0,560               |
| ND6                   | 0,01 (-0,069 - 0,088)  | 0,014 (-0,078 - 0,106) | 1,000               |
| Complejo III<br>(CYB) | 0,108 (-0,127 - 0,343) | 0,092 (-0,124 - 0,307) | 0,218               |
| Complejo IV           | 0,051 (-0,121 - 0,223) | 0,047 (-0,112 - 0,206) | 0,598               |
| CO1                   | 0,014 (-0,078 - 0,106) | 0,021 (-0,089 - 0,131) | 0,545               |
| CO2                   | 0,018 (-0,081 - 0,117) | 0,016 (-0,075 - 0,106) | 0,809               |
| CO3                   | 0,023 (-0,101 - 0,147) | 0,012 (-0,072 - 0,095) | 0,121               |
| Complejo V            | 0,038 (-0,112 - 0,189) | 0,057 (-0,122 - 0,235) | 0,269               |
| ATP6                  | 0,026 (-0,1 - 0,152)   | 0,039 (-0,116 - 0,194) | 0,144               |
| ATP6/8                | 0,004 (-0,048 - 0,056) | 0 (0 - 0)              | 0,180               |
| ATP8                  | 0,01 (-0,065 - 0,085)  | 0,018 (-0,079 - 0,114) | 0,218               |
| Global                | 0,333 (0,027 - 0,639)  | 0,288 (-0,015 - 0,591) | <b>0,045</b>        |

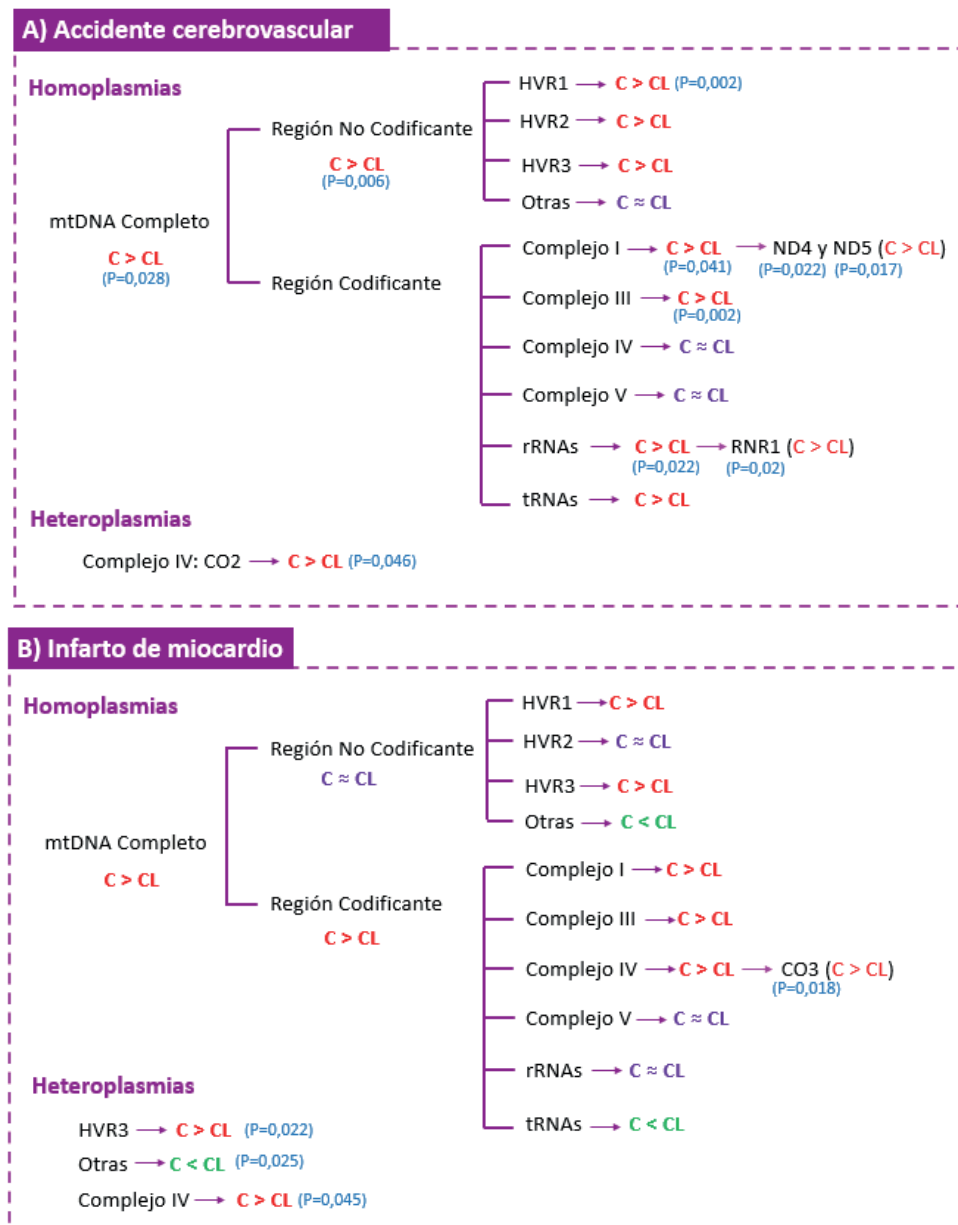
En relación con los genes de tRNA, únicamente se identificaron dos variantes con valores de patogenicidad superiores a 12,66. Ambas en individuos con historial de infarto de miocardio.

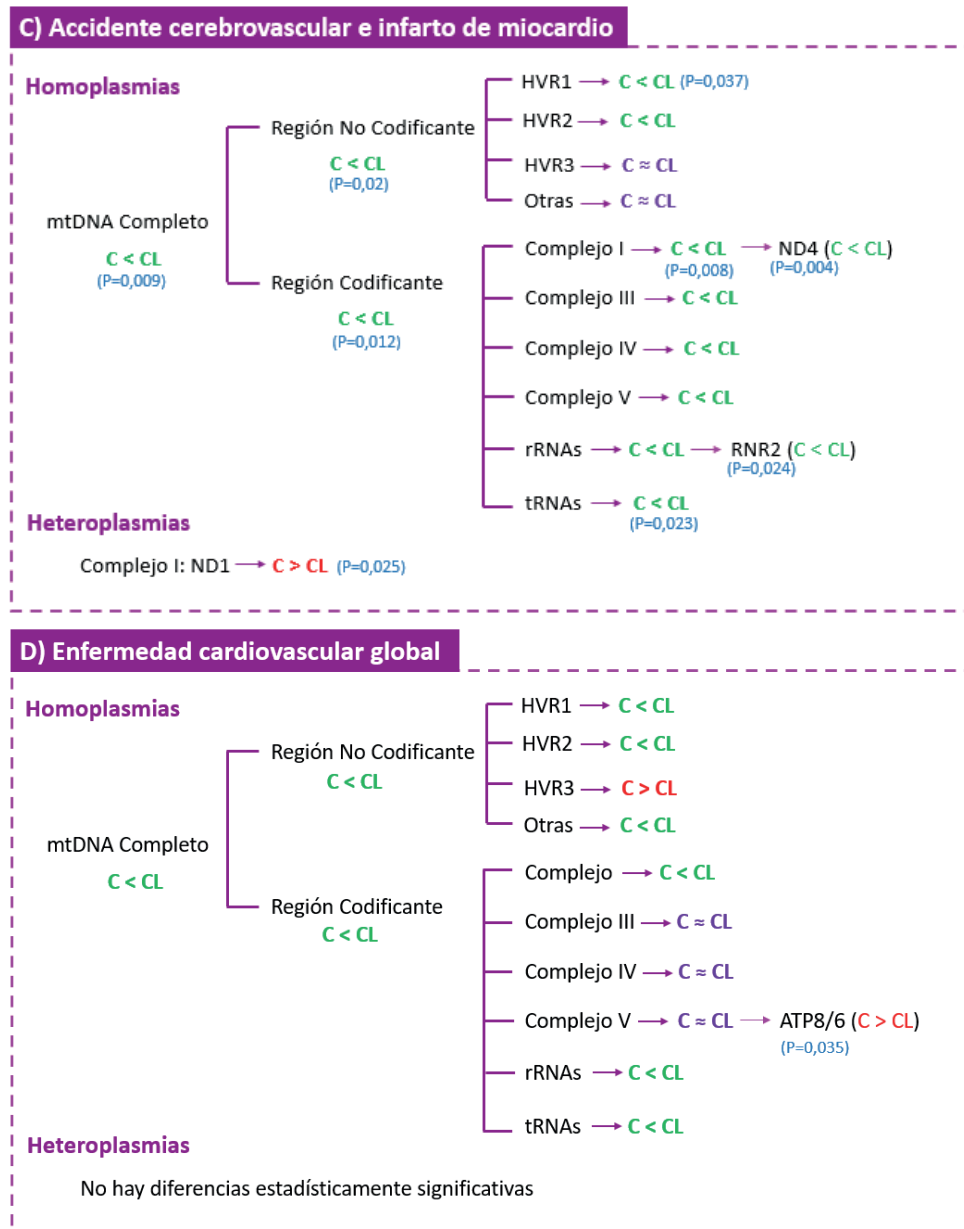


## Discusión

### Distribución por regiones de las variantes

A pesar de que varios estudios han analizado los cambios en la distribución de variantes del mtDNA (principalmente heteroplasmia) en relación al cáncer (Kazdal et al., 2017; Pérez-Amado et al., 2020), Síndrome de Down (Hefti et al., 2017) y la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LOHN) (Piotrowska-Nowak et al., 2019b), hasta la fecha no se han publicado estudios que analicen dicha distribución en relación con el riesgo de ECV, siendo nuestro trabajo el primero. El análisis del número de mutaciones en función de la región del genoma mitocondrial intenta dilucidar la posibilidad de que estas mutaciones se den de manera diferencial en alguna región del genoma entre casos y controles. Esto podría destacar la posible relevancia de alguno de los complejos o incluso genes en el riesgo de las diferentes enfermedades cardiovasculares. Los resultados más relevantes obtenidos en esta tesis se encuentran en el siguiente Resumen esquemático 1.





**Resumen esquemático 1.** Detalle de los resultados obtenidos en los análisis de distribución de las variantes mitocondriales detectadas (homoplasmias y heteroplasmias). Se incluyen los P valores de las comparaciones que presentan diferencias estadísticamente significativas. Leyenda: rojo (C > CL); morado (C ≈ CL); verde (C < CL) y azul (P-valores < 0,05).

En el caso del ACV se han hallado diferencias estadísticamente significativas en el número de **homoplasmias** a nivel del genoma mitocondrial completo y también de la región no codificante, los complejos I y III y los genes de rRNA, siendo éstas mucho más frecuentes en los casos. Al analizar gen a gen se ha observado una sobrerrepresentación de las mutaciones en los casos en los genes ND4, ND5 y RNR1. Estos resultados, junto con el hecho de que las ROS mitocondriales son generadas principalmente por los complejos I y III (Y. R. Chen & Zweier, 2014), apoyan la idea de que variaciones individuales en estos complejos pueden modificar la formación de ROS y por lo tanto el riesgo de ACV (J.C. Chang et al., 2010). De hecho, se ha propuesto que debido a la función de la subunidad codificada por el gen ND5 como canal de protones, mutaciones en este gen pueden contribuir de manera significativa a un rendimiento deficiente del sistema OXPHOS (Blok et al., 2007; Pérez-Amado et al., 2020). El

#### IV. Perfil y carga mutacional

incremento de mutaciones en la región control observado en nuestros resultados podría influir en la regulación de la replicación y transcripción mitocondrial.

En contraste, los individuos con antecedentes de IM presentan un número de homoplasmas muy similar al de sus controles, a excepción del gen CO3, donde se observa una sobrerrepresentación significativa de éstas en los casos.

Curiosamente, cuando se analizan los individuos que han manifestado tanto un accidente cerebrovascular (ACV) como un infarto de miocardio (IM) se puede observar casi el patrón opuesto, siendo los controles los que presentan un número de homoplasmas significativamente superior tanto a nivel de la molécula de mtDNA completa como en las dos principales regiones (codificante y no codificante). Este mismo comportamiento también es estadísticamente significativo en el complejo I y en los genes ND4, RNR2 y el conjunto de genes de tRNA. Piotrowska-Nowak et al., (2019b) obtuvieron resultados similares al analizar la variación del genoma mitocondrial en glaucoma. En este estudio también observan un número superior de mutaciones en los controles, tanto en la región codificante como en la no codificante, describiendo las mayores diferencias en el complejo I. El incremento de mutaciones en la secuencia del genoma mitocondrial ha sido previamente reportado en varias enfermedades complejas sugiriendo que contribuye al desarrollo de dichas enfermedades actuando como un factor de riesgo (Herrnstadt & Howell, 2004). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que un incremento en el número de mutaciones no siempre se encuentra asociado a un aumento del riesgo de sufrir una enfermedad y que en el caso de la comorbilidad del ACV y el IM estaría relacionado con una disminución del mismo.

Al analizar todas las muestras conjuntamente (ECV global) observamos que no hay diferencias estadísticamente significativas a nivel global, pero sí en el fragmento solapante entre los genes ATP6 y ATP8 (ATP8/ATP6).

A pesar de la disparidad en cuanto a estos resultados entre las diferentes agrupaciones de individuos, la *ratio* calculada dividiendo el número de homoplasmas entre la longitud de la región estudiada, nos permite detectar que la acumulación de mutaciones sigue el mismo patrón tanto en casos como en controles y en todas las ECV. La región no codificante concentra el mayor número de homoplasmas, y dentro de esta destaca la HVR2, seguida de la HVR1 y por último la HVR3. Dentro de la región codificante, el complejo con una mayor *ratio* es el complejo III, destacando a nivel génico los genes ND4 y ATP6. Estos resultados concuerdan con los encontrados por (Kazdal et al., 2017) en individuos con cáncer de pulmón que también detectan que ATP6 y el *D-Loop* son los segmentos que presentan una relación entre el número de mutaciones y la longitud más alta. En su caso, está seguido del gen del 12S rRNA (RNR1). En otro trabajo, centrado en el análisis de tejidos tumorales, observaron que la mayor tasa de mutaciones se encontraba también en el *D-Loop* y en los genes ATP6, CO1, 12S rRNA y algunos tRNA (Pérez-Amado et al., 2020).

En el análisis del número de **heteroplasmas** se han observado muy pocas diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles. En los individuos con ACV se detectó una sobrerrepresentación en el gen CO2 (complejo III). En los individuos con antecedentes de infarto de miocardio (IM) se observó un número significativamente mayor de heteroplasmas en casos en el complejo IV y en la HVR3; por el contrario, la zona de la región no codificante fuera de las regiones hipervariables presentaba un mayor número de heteroplasmas en los controles.

#### IV. Perfil y carga mutacional

Al analizar los individuos con antecedentes tanto de ACV como de IM únicamente observamos diferencias significativas en el gen ND1, encontrando más heteroplasmas en casos que en controles. Si tenemos en cuenta todas las muestras (ECV global), detectamos diferencias significativas en el gen RNR2 (más frecuentes en controles) mientras que las diferencias que observamos en la región hipervariable 3 (más frecuentes en casos) quedan muy cerca de la significación.

De manera similar a lo que ocurre con la *ratio* de homoplasmas, la *ratio* de heteroplasmas nos permite observar que las mutaciones se reparten de manera similar entre casos y controles. Sin embargo, podemos ver que si bien en los análisis de ACV, ambas enfermedades y ECV global, la región con una *ratio* mayor es la HVR3, en el análisis de los individuos con IM estas heteroplasmas se encuentran más en la HVR2. En la región codificante los resultados son más homogéneos entre las diferentes enfermedades, destacando los genes ND4 y ATP6 como los que presentan unas *ratios* más elevadas.

En general, se ha aceptado que la heteroplasma está asociada con muchas manifestaciones clínicas (Wallace & Chalkia, 2013). En nuestros resultados no se detectan diferencias en el número de heteroplasmas entre casos y controles a nivel del genoma completo mitocondrial ni en las regiones codificante y no codificante. Esto se puede explicar por el hecho probado de que la heteroplasma también ocurre con una frecuencia apreciable en la población general (Rose et al., 2007; Umbria et al., 2017), y, un porcentaje nada despreciable de los individuos sanos con heteroplasma presentan variantes que han sido implicadas en alguna enfermedad (K. Ye et al., 2014).

Nuestros resultados concuerdan bastante con los resultados obtenidos por (Hefti et al., 2017) en su análisis de muestras de tejido cardíaco de individuos con Síndrome de Down (SD). En este estudio observaron que tanto el número de heteroplasmas por muestra, la frecuencia de estas y su patrón de distribución era muy similar entre los individuos con SD y sus respectivos controles (apareados por edad). Justifican este resultado como consecuencia de una respuesta adaptativa de estas células, que reducen la función mitocondrial y conjuntamente la producción de ROS, con el objetivo de preservar el genoma mitocondrial y su función. Por el contrario, en otro estudio se describe una mayor presencia a nivel global de heteroplasmas en individuos con hipertensión (Calabrese et al., 2022).

A nivel de complejo IV se ha detectado una presencia superior de variantes en heteroplasma en los individuos con antecedentes de infarto de miocardio. En esta misma dinámica, el gen CO2 presenta un número significativamente superior de heteroplasmas en los individuos con ACV. Mientras que los individuos afectados por ambas patologías presentan un número significativamente superior de heteroplasmas en el gen ND1 respecto a sus controles. La disfunción de los complejos I y IV son los principales defectos que se observan más comúnmente en la OXPHOS (Rosa et al., 2008), siendo el complejo I, como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales productores de ROS (Y. R. Chen & Zweier, 2014).

También se ha identificado una sobrerrepresentación de variantes en heteroplasma en la región hipervariable 2 de los individuos con IM, esta tendencia se observa, de manera no estadísticamente significativa (P-valor = 0,051) también en el análisis conjunto de todas las muestras. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio en el que se compara la distribución de heteroplasmas en muestras de tejido aórtico con lesiones ateroscleróticas y muestras de tejido sano (Sobenin et al., 2019).

## IV. Perfil y carga mutacional

De manera opuesta, los individuos con IM acumulan menos heteroplasmas que sus controles en la región no codificante sin incluir las HVR.

En el análisis conjunto de todas las muestras también se detecta un número significativamente mayor de heteroplasmas en el gen RNR2 de los controles. Este gen, además de codificar el 16S rRNA, este gen también produce el péptido conocido como Humanina y otros péptidos derivados de la mitocondria (MDPs). Se ha observado que los individuos con enfermedad de las arterias coronarias presentan niveles circulantes de Humanina más bajos, y es posible que estas heteroplasmas afecten de manera positiva a la producción de este péptido generando un beneficio en los individuos.

### Carga mutacional ajustada

El análisis de la carga mutacional ajustada (CMA) llevado a cabo en este estudio se centra en variantes fijadas que producen un cambio aminoacídico con una puntuación MutPred superior al 0,5. Se utilizan estas variantes debido a que el tamaño poblacional efectivo a nivel de genoma mitocondrial es muy reducido, haciendo que las mutaciones más comunes pueden presentar estratificación poblacional. De esta manera, se espera que las variantes analizadas sean variantes raras, de las cuales muy pocas estarán asociadas al haplogrupo reduciendo la influencia de la posición de la secuencia de referencia en la filogenia. Adicionalmente, se ha visto que la selección natural es igual de eficiente eliminando variantes deletéreas de todos los linajes mitocondriales (Pereira et al., 2011). En este sentido, mediante el estudio de la carga mutacional buscamos investigar el efecto combinado de variantes mitocondriales raras en relación el riesgo de las diferentes enfermedades cardiovasculares.

En todas las agrupaciones (ACV, IM y ECV global) a excepción de los individuos que presentan ambas enfermedades, se observa que la carga mutacional del **complejo I** es superior en casos respecto a controles, aunque las diferencias no son igual de marcadas en todas las ocasiones. Las diferencias más marcadas se encuentran entre los casos y controles de ACV y cuando se analiza la ECV global. En ningún caso son estadísticamente significativas. A nivel de genes dentro del complejo se ve muchísima variación sin un patrón claro más que para ND2, que presenta una carga mutacional ajustada superior en los casos en todos los análisis. La carga mutacional de ND1 es superior en casos cuando se analizan las muestras de ACV, IM y ECV global, mientras que en las muestras con ambas patologías es ligeramente superior en los controles. Para ND3 sólo se detectan variantes con valores de MutPred >0,5 en ACV, donde la carga es superior en los controles. Los genes ND4 y ND4L siguen el mismo patrón mostrando una CMA superior en casos en ACV y superior en controles en los análisis referentes a IM, ambas patologías y ECV global. En el gen ND5, la CMA es superior en casos respecto a controles en IM y ECV global, mientras que en ACV y ambas patologías la CMA es superior en controles. ND6 presenta el patrón contrario a ND1, con una CMA superior en controles en todos los análisis excepto al analizar las muestras con ambas enfermedades, donde es superior en los casos.

Como ya se ha mencionado previamente, el complejo I es uno de los principales responsables de la producción de ROS mitocondrial. Una mayor carga de mutaciones patogénicas en esta región podría estar relacionada con la producción excesiva de ROS por una fuga de electrones en este complejo, hecho que ha sido previamente implicado en la patogénesis del infarto de miocardio (Y. R. Chen & Zweier, 2014).

#### IV. Perfil y carga mutacional

El **complejo III** muestra una carga superior en controles en ACV y el comportamiento contrario en los análisis referentes a IM, ambas patologías y ECV global. En ningún caso las diferencias son significativas, y los valores entre casos y controles en ACV son muy similares ( $C = 0,123$ ;  $CL = 0,129$ ;  $P\text{-valor} = 0,927$ ).

EL **complejo IV** tampoco sigue un patrón similar al analizar las diferentes enfermedades. Mientras que en ACV los casos presentan una carga mutacional significativamente superior que los controles, en el análisis de IM la CMA de casos y controles es muy similar y en ambas patologías (ACV e IM) es superior en los controles. Cuando se analizan todas las muestras (ECV global) la CMA del complejo IV es superior en casos, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. A nivel génico se observa un comportamiento muy diferente en el análisis de los individuos con ambas enfermedades, donde en todos los genes la CMA es superior en controles (o igual). En cambio, en ACV todos presentan una CMA superior en casos, y en IM y ECV global CO2 y CO3 siguen el mismo patrón. En el gen CO1, la CMA es significativamente superior en controles en los individuos con infarto de miocardio; en el análisis conjunto de todas las muestras observamos el mismo comportamiento, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Como se ha mencionado anteriormente, la CMA del complejo IV es significativamente superior en los individuos con historial de ACV ( $P\text{-valor} = 0,05$ ). La enzima citocromo C oxidasa (CO, complejo IV) es la última enzima de la OXPHOS localizada en la membrana y aunque esta codificada tanto por genes nucleares como mitocondriales, los centros catalíticos se encuentran exclusivamente en los 2 genes mitocondriales, CO1 y CO2 (codifican las subunidades I y II de la CO respectivamente). Mutaciones en los genes de la CO se han asociado al Síndrome de Leigh (Bruno et al., 1999; Campos et al., 2001; Clark et al., 1999) y al Síndrome MELAS (W. Wang et al., 2021).

Teniendo en cuenta esta información, no es sorprendente ver un incremento en la carga mutacional del complejo IV en los pacientes con ACV, dado que una acumulación de mutaciones levemente deletéreas en estos genes podría alterar la función del complejo y por consiguiente la función mitocondrial y la generación de ROS, ambos modificadores conocidos del riesgo de ACV. Sería de gran interés investigar si los pacientes de ACV presentan un déficit de complejo IV en relación a sus controles de manera previa al ACV (Rosa et al., 2008).

En los individuos con antecedentes de IM se ha observado que la CMA del gen CO1 (complejo IV) es significativamente superior en controles respecto a casos. Cabe pensar que los efectos de esta variación mitocondrial sean compensados por otras vías regulatorias.

La CMA del **complejo V** es superior en los controles en todos los análisis realizados, aun si las diferencias no son estadísticamente significativas. En el análisis gen a gen, se ve que la CMA de ATP6 sigue este mismo patrón (a excepción del análisis de las muestras con individuos con ambas enfermedades donde es igual), quedando al límite de la significación estadística en los individuos con ACV. El gen ATP 8 mantiene este mismo patrón a excepción de en los individuos con ACV, donde la CMA es superior en casos. La carga mutacional ajustada de la región solapante entre estos dos genes (ATP6/8) es superior en casos en relación con los controles en los individuos con ACV, IM y en el análisis de ECV global. En las muestras con ambas enfermedades no se identificó ninguna variante con un valor de MutPred2  $>0,5$  en ningún individuo.

A nivel **global** (genoma mitocondrial completo) la CMA es superior en casos en los análisis de individuos con ACV, IM y ECV global. En este último las diferencias son estadísticamente

#### IV. Perfil y carga mutacional


significativas. Contrariamente, en el análisis con los individuos que presentan ambas enfermedades cardiovasculares la CMA global es superior en los controles. Esto nos permite hipotetizar que, si bien la CM parece ser relevante para el desarrollo de las ECV de manera individual, no parece estar afectando al riesgo de desarrollar ambas de manera conjunta. En este sentido, los trabajos de (Piotrowska-Nowak et al., 2019a) encontraron una asociación entre una CMA elevada y la arteriosclerosis, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el análisis global de todas las muestras, donde la CMA también se encuentra asociada al riesgo de ECV. Por el contrario, (Venter et al., 2017) no pudieron identificar ninguna relación entre la carga mutacional y diversos fenotipos de las ECV ni, en un estudio posterior, con marcadores de estrés oxidativo e inflamación, resultantes de la disfunción mitocondrial (Venter et al., 2019).

Respecto a la carga mutacional de las variantes halladas en genes de tRNA, únicamente se han observado 2 variantes con valores MitoTip superiores a 12,66, indicando que podrían tratarse de variantes posiblemente patogénicas. Cada una de estas variantes se ha identificado de manera exclusiva en un individuo, aunque ambos tienen historial de infarto de miocardio.

La variante m.7543A>G se localiza en el brazo del anticodón del tRNA ácido aspártico (MitoTIP = 15,055) y ha sido asociada con la epilepsia mioclónica y regresión psicomotora (Toncheva et al., 2020). Por otro lado, la variante m.8358A>G (MitoTIP = 12,867) se localiza en el brazo aceptor del tRNA lisina, y ha sido asociada con la intolerancia al ejercicio, debilidad muscular y fatiga (Landsverk et al., 2011).

La mayor parte de los estudios que analizan la carga mutacional realizados hasta la fecha, llevan a cabo un análisis global, sin investigar cómo se comporta a nivel de los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones, y aún menos a nivel de los distintos genes que codifican las subunidades proteicas. Como queda patente en este estudio, la CMA varía mucho entre las diferentes subunidades de la cadena de transporte de electrones y el análisis conjunto, a pesar de ser informativo, puede estar enmascarando diferencias en este parámetro en complejos de la OXPHOS determinados.

# V. Variación mitocondrial por posición







## Resultados

### Accidente cerebrovascular

La comparación de cada variante individual (tanto homoplasmias como heteroplasmias) entre casos y controles nos permitió detectar 3 variantes (m.73G, m.11719A and m.14766G) - todas ellas fijadas - que estaban significativamente sobrerrepresentadas en casos de ACV; y 4 variantes (m.72C, m.4580A, m.15904T and m.16298C) - también fijadas - subrepresentadas en casos (Tabla 26).

Las variantes m.72C, m.4580A, m.15904T y m.16298C son más prevalentes en controles, coincidiendo en número las tres primeras (m.72C, m.4580A y m.15904T), y siendo algo más frecuente la variante m.16298C. Esto implica que los portadores de dichas variantes manifiestan una *Odds Ratio* inversa de 5,99 y 3,06 respectivamente, lo que conlleva un menor riesgo de presentar un ACV. Las mencionadas variantes podrían estar reflejando el papel protector del haplogrupo V, ya que son descriptivas del mismo (Figura suplementaria 1). En contraste, las variantes m.73G, m.11719A y m. 14766G son muy comunes en todos los linajes y no están asociadas a un haplogrupo en particular. Los portadores de alguna de estas tres variantes tienen aproximadamente 2 veces más riesgo de expresar un ACV.

**Tabla 26. ACV: Variantes mitocondriales posiblemente asociadas al riesgo de ACV.**

| Variantes  | Localización | Casos      | Controles  | McNemar<br>p-valor | Odds Ratio (95% CI)   |
|------------|--------------|------------|------------|--------------------|-----------------------|
|            |              | n (%)      | n (%)      |                    |                       |
| m.72T>C    | HVR2         | 2 (1,82)   | 11 (10,00) | <b>0,012</b>       | 0,167 (0,036 – 0,771) |
| m.73A>G    | HVR2         | 57 (51,82) | 38 (34,55) | <b>0,012</b>       | 2,038 (1,185 – 3,506) |
| m.4580G>A  | ND2          | 2 (1,82)   | 11 (10,00) | <b>0,022</b>       | 0,167 (0,036 – 0,771) |
| m.11719G>A | ND4          | 55 (50,00) | 37 (33,64) | <b>0,014</b>       | 1,973 (1,145 – 3,340) |
| m.14766C>T | CYB          | 56 (50,91) | 38 (34,55) | <b>0,014</b>       | 1,965 (1,142 – 3,380) |
| m.15904C>T | TT           | 2 (1,82)   | 11 (10,00) | <b>0,022</b>       | 0,167 (0,036 – 0,771) |
| m.16298T>C | HVR1         | 5 (4,55)   | 14 (12,73) | <b>0,049</b>       | 0,327 (0,113 – 0,941) |

Para predecir el impacto de estas variantes se realizó un análisis de estabilidad. Los resultados se presentan en la Tabla 27, donde se incluyen varias medidas de estabilidad como son: la frecuencia de cada variante en la base de datos poblacional, el número de hits en la filogenia mitocondrial y el índice de conservación a nivel nucleotídico.

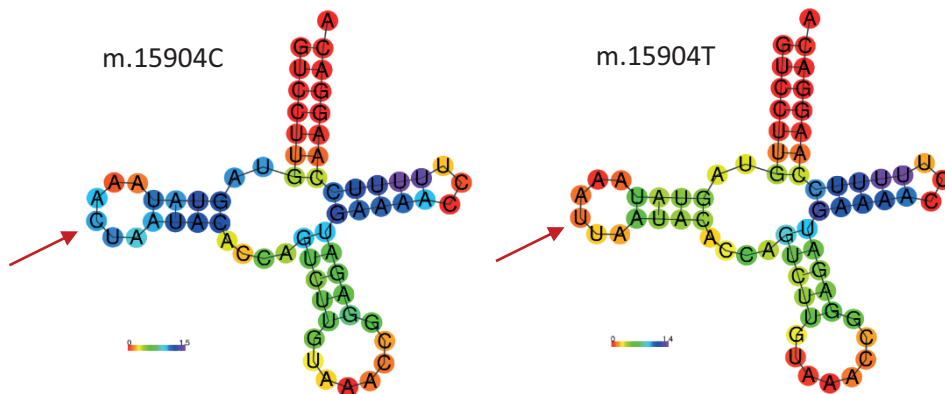
Por lo que respecta a la frecuencia de las variantes en la base de datos poblacional (Mitomap), se observa que las variantes identificadas en nuestro estudio en las posiciones 73, 11719 y 14766 son altamente prevalentes (frecuencia >75%), mientras que las variantes de las posiciones 72, 4580, 14766 y 15904 presentan una baja frecuencia (<2%).

En relación a la estabilidad, las posiciones 4580, 11719, 14766 y 15904 parecen ser bastante estables ya que presentan 4 hits en la filogenia o menos, mientras que las posiciones 72, 73 y 16298 presentan un número mayor y podrían ser consideradas no estables (Tabla 27). A nivel del índice de conservación nucleotídico se puede observar que las posiciones 72, 73 y 4580 presentan valores inferiores al 20% o superiores al 80%, indicando que se trata de posiciones conservadas. Por el contrario, las posiciones 11719, 14766, 15904 y 16298 presentan valores intermedios, identificándose como posiciones no conservadas.

## V. Variación mitocondrial por posición

Utilizando la estrategia introducida en material y métodos (*RNAFold web server*) para predecir el impacto que tienen estas mutaciones en la estabilidad de la estructura secundaria de los **RNAs**, se estudiaron las 7 posiciones con una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de ACV. Los resultados resumidos se encuentran en la Tabla 28, y la representación gráfica de las diferentes estructuras secundarias en la Tabla suplementaria 8.

Las variantes m.73A>G, m.4580G>A y m.11719G>A implican un cambio conformacional de las estructuras secundarias de los RNAs (HVR2, ND2 y CYB respectivamente). Mientras que la Energía Libre Mínima (MFE) de las variantes m.72T>C y m.73A>G disminuye en comparación a la molécula salvaje, la MFE de las variantes m.4580G>A y m.11719G>A aumenta. Las variantes m.14766C>T, m.15904C>T y m.16298T>C (Figura 18) producían una estructura plegada con la misma MFE que la estructura salvaje.



**Figura 18.** Cambios en la entropía del tRNA Thr con la variante m.15904C>T. Se puede observar una disminución en los niveles de entropía en los nucleótidos que rodean la variante m.15904T.

## V. Variación mitocondrial por posición

**Tabla 27. ACV: Resultados completos del análisis de mutaciones fijadas asociadas al riesgo de ACV.**

|   | Variante   |  |                          |                                |                          |   |   |
|---|--|--|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|---|---|
|   | m.72T>C  | m.73A>G  | m.4580G>A                | m.11719G>A                     | m.14766C>T               | m.15904C>T                              | m.16298T>C  |
| Casos: n (%) / Controles: n (%)               | 2 (1,82) / 11 (10)                                     | 57 (51,82) / 38 (34,55)                        | 2 (1,82) / 11 (10)       | 55 (50) / 37 (33,64)           | 56 (50,91) / 38 (34,55)  | 2 (1,82) / 11 (10)                      | 5 (4,55) / 14 (12,73)                                   |
| P-valor del test de McNemar                   | <b>0,012</b>   | <b>0,012</b>                                   | <b>0,022</b>             | <b>0,014</b>                   | <b>0,014</b>             | <b>0,022</b>                            | <b>0,049</b>  |
| OR (95% CI)                                   | 0,167<br>(0,036 – 0,771)                               | 2,038<br>(1,185 – 3,506)                       | 0,167<br>(0,036 – 0,771) | 1,973<br>(1,145 – 3,340)       | 1,965<br>(1,142 – 3,380) | 0,167<br>(0,036 – 0,771)                | 0,327<br>(0,113 – 0,941)                                |
| <b>Análisis de estabilidad</b>                |  |  |                          |                                |                          |   |   |
| CRS   | T  | A  | G                        | G                              | C                        | C                                       | T   |
| Distribución en base de datos poblacional (%) | T: 98,12; C: 1,79;<br>A: 0,005; G: 0,08;<br>Del: 0,002 | G: 75,91;<br>A: 24,08; C: 0,005;<br>Del: 0,002 | G: 98,31;<br>A: 1,69     | A: 77,23; G: 22,77             | T: 76,71; C: 23,29       | C: 98,40;<br>T: 1,59;<br>A: 0,002       | T: 93,37; C: 6,61;<br>A: 0,002; G: 0,007;<br>Del: 0,012 |
| No. Hits en la filogenia (PhyloTree,org)      | 9  | 12   | 2                        | 4                              | 4                        | 1                                       | 18  |
| No. Hits Soares et al, 2009                   | 6  | 11   | 2                        | 7                              | 10                       | 1                                       | 13  |
| Índice de Conservación Nucleotídica (%)       | GAP: 87,5; T: 12,5                                     | GAP: 87,5; A: 2,1; C: 6,3; G: 4,2              | A:85,4; G:14,6           | A: 60,4; T: 4,2; C: 25; G:10,4 | A: 25; T: 8,3; C: 66,7   | GAP: 4,2; A: 2,1; T: 25; C: 66,7; G:2,1 | A: 29,2; C: 8,3; T:37,5; G:2,1; GAP: 22,9               |

## V. Variación mitocondrial por posición

**Tabla 28. ACV:** Resumen de los resultados obtenidos de la predicción de la estructura secundaria de las variantes asociadas al riesgo de ACV. WT = variante salvaje, o wild type; Mut = variante mutada.

|   | <b>m.72T&gt;C</b> |        | <b>m.73A&gt;G</b> |       | <b>m.4580G&gt;A</b> |         | <b>m.11719G&gt;A</b> |         | <b>m.14766C&gt;T</b> |         | <b>m.15904C&gt;T</b> |       | <b>m.16298T&gt;C</b> |        |
|---|-------------------|--------|-------------------|-------|---------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|-------|----------------------|--------|
|   | WT                | Mut    | WT                | Mut   | WT                  | Mut     | WT                   | Mut     | WT                   | Mut     | WT                   | Mut   | WT                   | Mut    |
| Región de análisis                                  | HVR2              |        | HVR2              |       | ND2                 |         | ND4                  |         | CYB                  |         | TT                   |       | HVR1                 |        |
| Energía libre mínima (kcal/mol)                     | -67,4             | -69,4  | -67,4             | -71,2 | -117,68             | -114,88 | -181,64              | -180,54 | -180,7               | -180,7  | -14                  | -14   | -54,30               | -54,30 |
| Energía libre del conjunto termodinámico (kcal/mol) | -72,97            | -74,31 | -72,97            | -75,7 | -131,12             | -128,37 | -200,52              | -198,93 | -198,84              | -199,15 | -15,09               | -14,8 | -60,42               | -60,50 |
| Diferencias en la estructura secundaria             | No                |        | Si (leves)        |       | Si                  |         | Si                   |         | No (o muy leves)     |         | No (o muy leves)     |       | No                   |        |

## V. Variación mitocondrial por posición

### Infarto de miocardio

Al analizar las variantes de manera individualizada no encontramos ninguna homoplasmias que presentara diferencias significativas en su frecuencia entre casos y controles. Sin embargo, se debería destacar la variante m.72T>C, puesto que se duplicaba su frecuencia en controles (C: 6% vs CL:15,57%, McNemar: P = 0,054). También encontramos 2 variantes en heteroplasmia (het) que presentaban diferencias bastante marcadas entre casos y controles. Tanto la variante m.709G>A (C: 0,67% vs CL:4,67%, McNemar: P = 0,07) como la variante m.4157A>T se encuentran sobrerrepresentadas en los controles, siendo esta última la única estadísticamente significativa (Tabla 29).

**Tabla 29. IM: Variantes mitocondriales posiblemente asociadas al riesgo de MI.**

| Variantes     | Localización | Casos    | Controles | McNemar<br>P-valor | Odds Ratio (95% CI)   |
|---------------|--------------|----------|-----------|--------------------|-----------------------|
|               |              | n (%)    | n (%)     |                    |                       |
| het m.4157A>T | ND1          | 1 (0,67) | 11 (7,33) | <b>0,006</b>       | 0,085 (0,011 – 0,666) |

Mediante una regresión logística condicional en la cual se introdujeron tanto la hipercolesterolemia como la hipertensión como covariables se confirmó que la variante m.4157A>T actuaba como un factor protector independiente mediante una regresión logística condicional. Tal y como se puede ver en la Tabla 31, esta variante actúa como un factor protector independiente, disminuyendo 15,38 (*Odds Ratio* inversa) veces aproximadamente el riesgo de sufrir un infarto de miocardio. Además, no parece encontrarse asociado a ningún haplogrupo en concreto (Figura suplementaria 2).

La posición m.4157 es una posición muy conservada y estable ya que no presenta hits en la filogenia y tanto su distribución en la base de datos poblacional (Mitomap) como el índice de conservación nucleotídico son del 100%. Esta variante implica un cambio en el aminoácido número 284 (Glutamina → Leucina) del gen ND1. No obstante esta variante no parece afectar a la estructura secundaria del mRNA de este gen (Tabla 30).

**Tabla 30. IM: Resultados completos del análisis de mutaciones fijadas asociadas al riesgo de IM.**

|   | m.4157A>T            |         |
|---|----------------------|---------|
| Casos: n (%) / Controles: n (%)                     | 1 (0,67) / 11 (7,33) |         |
| Regresión logística condicional: P-valor            | <b>0,017</b>         |         |
| OR  | 0,065                |         |
| (95% CI)  | (0,007 - 0,608)      |         |
| Análisis de estabilidad                             |                      |         |
| CRS   | A                    |         |
| Distribución en base de datos poblacional (%)       | A: 100               |         |
| No. Hits en la filogenia (PhyloTree.org)            | 0                    |         |
| No. Hits Soares et al.                              | 0                    |         |
| Índice de Conservación Nucleotídica (%)             | A: 100               |         |
| Análisis de estructura secundaria de RNA            |                      |         |
| Región de análisis                                  | WT                   | Mut     |
|   | ND1                  |         |
| Energía libre mínima (kcal/mol)                     | -148                 | -148    |
| Energía libre del conjunto termodinámico (kcal/mol) | -162,13              | -162,12 |
| Diferencias en la estructura secundaria             | No                   |         |

## V. Variación mitocondrial por posición

### Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio

El perfil mitocondrial completo tanto de casos como de controles se encuentra en la Tabla suplementaria 7, mencionada en el capítulo anterior.

Mediante el análisis independiente de las variantes fijadas presentes en más del 5% de los individuos detectamos 10 variantes que presentaban diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles. 9 de estas variantes se encuentran sobrerrepresentadas en los controles (Tabla 31), mientras que únicamente la variante m.6776T>C está sobrerrepresentada en los individuos con historial de IM y ACV.

En cuanto a las variantes en heteroplasmia, no observamos diferencias significativas en ninguna de las posiciones analizadas.

Mediante el uso de la regresión logística condicional, en la cual se incluyeron tanto la hipertensión como la hipercolesterolemia, observamos que únicamente 5 de estas homoplasmas presentan una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de ACV e IM. Según nuestros resultados, las variantes m.73A>G, m.11467A>G, m.11719G>A y m.16362T>C actuarían como factores de protección ante el riesgo combinado de ACV e IM, reduciendo 2,87; 4,61; 2,87 y 15,87 veces (*Odds Ratios* inversas), respectivamente, el riesgo de sufrir ambas enfermedades. Por el contrario, la variante m.6776T>C actuaría como un factor de riesgo incrementándolo 13,41 veces.

Las variantes m.73G, m.11719A son muy comunes en todos los linajes y no están asociadas a un haplogrupo particular (Figura suplementaria 3). Por el contrario, la variante m.6776C se encuentra asociada al haplogrupo H, concretamente define el haplogrupo H3, de manera que podría estar reflejando el papel de riesgo de este haplogrupo. Las variantes m.11467G y m.16362C, a pesar de que son bastante comunes en varios haplogrupos parecen ser especialmente frecuentes en individuos pertenecientes al haplogrupo U.

En relación al análisis de la estabilidad de estas variantes (Tabla 32) se identifica que las variantes observadas en nuestro estudio en las posiciones 73 y 11719 son altamente prevalentes en la base de datos poblacional (Mitomap) (frecuencia >75%) mientras que la variante de la posición 6776 presenta una baja frecuencia (<3%). Las frecuencias de las variantes m.11467G y m.16362C son intermedias (12,7% y 16,9% respectivamente).

También se observa que las posiciones 6776 y 11467 son posiciones estables ya que presentan menos de 6 hits en la filogenia. En cambio, las posiciones 73 y 16362, especialmente esta última presentan un número elevado de hits, pudiéndose considerar posiciones no estables. La posición 11719 varía en su situación en función de la base de datos considerada.

A nivel del índice de conservación nucleotídica, las variantes m.73G y m.11467G se pueden considerar variantes conservadas, puesto que presentan índices inferiores al 20% o superiores al 80%. Por el contrario, los índices de conservación nucleotídica de las variantes m.6776C, m.11719A y m.16362C presentan valores intermedios, identificándose como variantes menos conservadas.

## V. Variación mitocondrial por posición

**Tabla 31. ACV e IM: Variantes mitocondriales posiblemente asociadas al riesgo de ACV e IM.**

| Variantes  | Localización | Casos      | Controles  | McNemar<br>P-valor | Odds Ratio (95% CI)    |
|------------|--------------|------------|------------|--------------------|------------------------|
|            |              | n (%)      | n (%)      |                    |                        |
| m.73A>G    | HVR2         | 24 (35,82) | 39 (58,21) | <b>0,009</b>       | 0,401 (0,200 – 0,804)  |
| m.2706A>G  | RNR2         | 26 (58,21) | 39 (58,21) | <b>0,037</b>       | 0,455 (0,228 – 0,908)  |
| m.6776T>C  | CO1          | 8 (11,94)  | 1 (1,49)   | <b>0,039</b>       | 9,103 (1,105 – 74,983) |
| m.7028C>T  | CO1          | 29 (43,28) | 43 (64,18) | <b>0,018</b>       | 0,426 (0,213 – 0,853)  |
| m.11467A>G | ND4          | 8 (11,94)  | 17 (25,37) | <b>0,035</b>       | 0,399 (0,159 – 1,002)  |
| m.11719G>A | ND4          | 24 (35,82) | 39 (58,21) | <b>0,009</b>       | 0,401 (0,200 – 0,804)  |
| m.14766C>T | CYB          | 23 (34,33) | 36 (53,73) | <b>0,021</b>       | 0,450 (0,224 – 0,903)  |
| m.16183A>C | HVR1         | 2 (2,99)   | 9 (13,43)  | <b>0,039</b>       | 0,198 (0,041 – 0,956)  |
| m.16278C>T | HVR1         | 0 (0)      | 8 (11,94)  | <b>0,008</b>       | 0,052 (0,003 – 0,918)  |
| m.16362T>C | HVR1         | 1 (1,49)   | 8 (11,94)  | <b>0,039</b>       | 0,112 (0,014 – 0,920)  |

A nivel del impacto que tienen estas variantes en la estabilidad de la estructura secundaria de los RNAs (Tabla 33) detectamos que todas ellas implican un cambio conformacional a excepción de la variante en la posición 6776 (en el gen CO1). En las variantes m.73A>G y m.11467A>G observamos una disminución de la MFE en relación con la molécula salvaje, mientras que las variantes m.11719G>A y m.16362T>C presentan el comportamiento contrario. Para m.6776T>C la MFE se mantiene estable.



## V. Variación mitocondrial por posición

**Tabla 32. ACV e IM: Resultados completos del análisis de mutaciones fijadas asociadas al riesgo de ACV e IM.**

|   | Variante                                 |  |                      |                              |                                    |                                 |                         |  |                                   |   |
|---|--|--|----------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--|-----------------------------------|---|
|   | m.73A>G                                  | m.2706A>G                              | m.6776T>C            | m.7028C>T                    | m.11467A>G                         | m.11719G>A                      | m.14766C>T              | m.16183A>C   | m.16278C>T                        | m.16362T>C  |
| Casos: n (%) / Controles: n (%)               | 24 (35,82) / 39 (58,21)                  | 26 (58,21) / 39 (58,21)                | 8 (11,94) / 1 (1,49) | 29 (43,28) / 43 (64,18)      | 8 (11,94) / 17 (25,37)             | 24 (35,82) / 39 (58,21)         | 23 (34,33) / 36 (53,73) | 2 (2,99) / 9 (13,43)   | 0 (0) / 8 (11,94)                 | 1 (1,49) / 8 (11,94)                              |
| RLC's P – valor                               | <b>0,032</b>                             | 0,091                                  | <b>0,025</b>         | 0,061                        | <b>0,034</b>                       | <b>0,035</b>                    | 0,056                   | 0,071  | 0,974                             | <b>0,019</b>                                      |
| OR  | 0,348                                    | 0,483                                  | 13,405               | 0,419                        | 0,217                              | 0,348                           | 0,379                   | 0,135  | 0                                 | 0,063   |
| (95% CI)                                      | (0,132 – 0,915)                          | (0,208 – 1,124)                        | (1,39 – 129,241)     | (0,169 – 1,039)              | (0,053 – 0,89)                     | (0,131 – 0,928)                 | (0,14 – 1,026)          | (0,015 – 1,185)  | (0 – 0)                           | (0,006 – 0,637)                                   |
| Análisis de estabilidad                       |  |  |                      |                              |                                    |                                 |                         |  |                                   |   |
| CRS   | A  | A                                      | T                    | C                            | A                                  | G                               | C                       | A  | C                                 | C   |
| Distribución en base de datos poblacional (%) | G: 75,91; A: 24,08; C: 0,005; Del: 0,002 | G: 78,06; A: 21,93; C: 0,002; T: 0,002 | T: 97,79; C: 2,21    | T: 79,71; C: 20,29; G: 0,004 | A: 87,31; G: 12,69                 | A: 77,23; G: 22,77              | T: 76,71; C: 23,29      | Del: 0,05; AA: 0,005; AAC: 0,002; ATT: 0,002; C: 13,11; G: 0,119; T: 0,002 | C: 90,31; T: 9,69                 | T: 83,09; C: 16,88; G: 0,02; Del: 0,005; A: 0,004 |
| No. Hits en la filogenia (PhyloTree.org)      | 12                                       | 10                                     | 3                    | 4                            | 2                                  | 4                               | 4                       | 4  | 53                                | 87  |
| No. Hits Soares et al.                        | 11                                       | 9                                      | 2                    | 2                            | 1                                  | 7                               | 10                      | 2  | 43                                | 67  |
| Índice de Conservación Nucleotídica (%)       | GAP: 87,5; A: 2,1; C: 6,3; G: 4,2        | A: 85,42; G: 14,58                     | T: 60,42; C: 39,58   | C: 54,17; T: 31,25; A: 14,58 | A: 87,5; C: 6,25; T: 4,17; G: 2,08 | A: 60,4; T: 4,2; C: 25; G: 10,4 | A: 25; T: 8,3; C: 66,7  | T: 35,42; A: 31,25; C: 20,83; G: 6,25; GAP: 6,25                           | T: 47,96; C: 25; GAP: 25; G: 2,08 | T: 64,58; A: 16,67; C: 16,67; GAP: 2,08           |

## V. Variación mitocondrial por posición

**Tabla 33.ACIV e IM:** Resumen de los resultados obtenidos de la predicción de la estructura secundaria de las variantes asociadas al riesgo de ACIV e IM. WT=variante salvaje, o wild type; Mut = variante mutada.

|   | <b>m.73A&gt;G</b> |       | <b>m.6776T&gt;C</b> |         | <b>m.11467A&gt;G</b> |         | <b>m.11719G&gt;A</b> |         | <b>m.16362T&gt;C</b> |       |
|---|-------------------|-------|---------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|-------|
|   | WT                | Mut   | WT                  | Mut     | WT                   | Mut     | WT                   | Mut     | WT                   | Mut   |
| Región de análisis                                  | HVR2              |       | CO1                 |         | ND4                  |         | ND4                  |         | HVR1                 |       |
| Energía libre mínima (kcal/mol)                     | -67,4             | -71,2 | -334,16             | -334,16 | -181,64              | -183,64 | -181,64              | -180,54 | -54,3                | -53,6 |
| Energía libre del conjunto termodinámico (kcal/mol) | -72,97            | -75,7 | -358,35             | -358,48 | -200,52              | -202,55 | -200,52              | -198,93 | -60,42               | -59,6 |
| Diferencias en la estructura secundaria             | Si (leves)        |       | No                  |         | Si                   |         | Si                   |         | Si                   |       |

## V. Variación mitocondrial por posición

### Enfermedad cardiovascular global

La comparación de cada variante individual (tanto homoplasmias como heteroplasmias) entre casos y controles nos permitió detectar 4 variantes (m.72C>T, m.15904C>T, het m.709G>A y het m.14766C>T) – dos fijadas y 2 en heteroplasmia – que estaban sobrerrepresentados en los individuos con ECV (Tabla 34). La homoplasmia m.4580G>A y la heteroplasmia m.9152T>C, también presentaban diferencias bastante marcadas, también siendo más frecuentes en controles.

Tras realizar un análisis de asociación de cada una de estas 4 variantes con relación al riesgo de ECV mediante regresión logística condicional (incluyendo la hipertensión e hipercolesterolemia como covariables), únicamente las 2 homoplasmias mostraron un resultado estadísticamente significativo. Ambas variantes estarían reflejando un rol protector frente al riesgo de ECV, siendo que los individuos que presenten la variable m.72C o la variable m.15904T tienen aproximadamente entre 2,7 y 3 veces menos riesgo de sufrir una ECV. Estas variables se encuentran mayoritariamente en individuos pertenecientes a los haplogrupos HV y V (Figura suplementaria 4).

**Tabla 34. ECV global: Variantes mitocondriales posiblemente asociadas al riesgo de ECV.**

| Variantes      | Localización | Casos     | Controles  | McNemar<br>P-valor | Odds Ratio (95% CI)   |
|----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|-----------------------|
|                |              | n (%)     | n (%)      |                    |                       |
| m.72T>C        | HVR2         | 15 (4,36) | 34 (9,84)  | <b>0,006</b>       | 0,416 (0,222 – 0,778) |
| het m.709G>A   | RNR1         | 2 (0,651) | 10 (3,257) | <b>0,039</b>       | 0,195 (0,043 – 0,898) |
| het m.14766C>T | CYB          | 0 (0)     | 6 (1,954)  | <b>0,031</b>       | 0,076 (0,004 – 1,347) |
| m.15904C>T     | TT           | 14 (4,07) | 29 (8,43)  | <b>0,025</b>       | 0,461 (0,239 – 0,888) |

En relación al análisis de la estabilidad, en la Tabla 35 se puede observar que ambas variantes (m.72T>C y m.15904C>T) son poco frecuentes en la base de datos poblacional (<2%). La posición 72 presenta más de 6 hits en la filogenia y un índice de conservación nucleotídico <20%, pudiendo ser considerada una posición no estable, pero una variante conservada. Mientras que la posición 15904 únicamente tiene 1 hit en la filogenia y un índice con un valor intermedio (25%) y se consideraría una posición estable pero no conservada.

Utilizando el *RNAFold web server*, para estudiar el efecto de estas mutaciones en la estabilidad de los RNAs observamos (Tabla 35) que ninguna de las 2 variantes supone un cambio conformacional en la estructura secundaria de los RNAs. Mientras que la MFE de la variante m.72T>C disminuye en comparación a la molécula salvaje, la MFE de la m.15904C>T se mantiene constante.

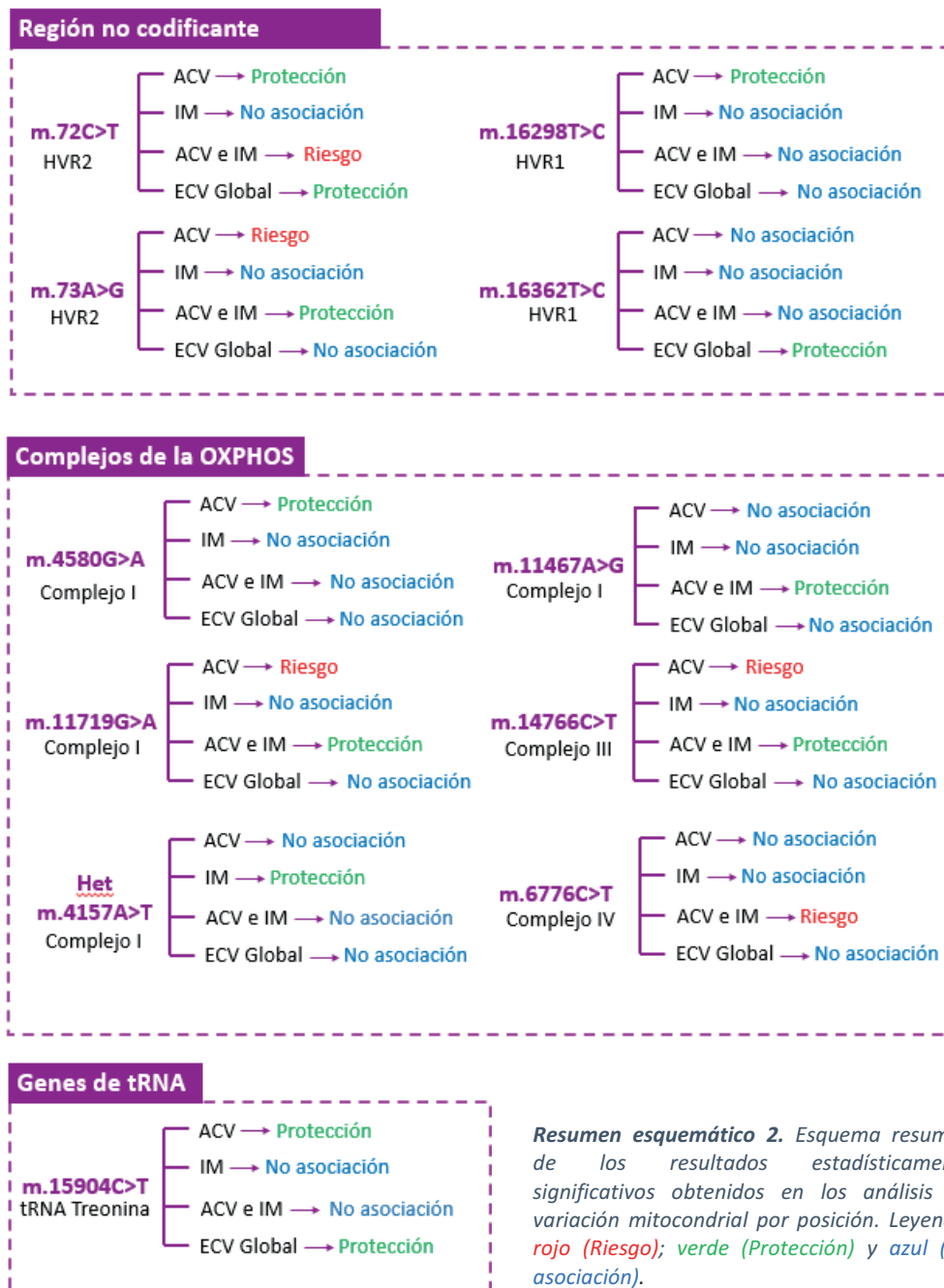
## V. Variación mitocondrial por posición

**Tabla 35.ECV global:** Resultados completos del análisis de mutaciones fijadas asociadas al riesgo de ECV.

|   | Variante                              |   |                 |       |
|---|---------------------------------------|---|-----------------|-------|
|   | m.72T>C                               | m.15904C>T                              |                 |       |
| Casos: n (%) / Controles: n (%)                     | 15 (4,36) / 34 (9,84)                 | 14 (4,07) / 29 (8,43)                   |                 |       |
| Regresión logística condicional                     |                                       |   |                 |       |
| P-valor   | <b>0,003</b>                          | <b>0,011</b>                            |                 |       |
| OR [95% CI]   | 0,339 (0,166 – 0,691)                 | 0,396 (0,193 – 0,812)                   |                 |       |
| Análisis de estabilidad                             |                                       |   |                 |       |
| CRS   | T                                     | C                                       |                 |       |
| Distribución en base de datos poblacional (%)       | T: 98,22; C: 1,77; A: 0,004; G: 0,001 | C: 98,40; T: 1,59; A: 0,002             |                 |       |
| No. Hits en la filogenia (PhyloTree.org)            | 9                                     | 1                                       |                 |       |
| No. Hits Soares et al, 2009                         | 6                                     | 1                                       |                 |       |
| Índice de conservación nucleotídica (%)             | GAP: 87,5; T: 12,5                    | GAP: 4,2; A: 2,1; T: 25; C: 66,7; G:2,1 |                 |       |
| Análisis de estructura secundaria de RNA            |                                       |   |                 |       |
|   | WT                                    | Mut                                     | WT              | Mut   |
| Región de análisis                                  | HVR2                                  |   | TT              |       |
| Energía libre mínima (kcal/mol)                     | -67,4                                 | -69,4                                   | -14             | -14   |
| Energía libre del conjunto termodinámico (kcal/mol) | -72,97                                | -74,31                                  | -15,09          | -14,8 |
| Diferencias en la estructura secundaria             | No                                    |   | No (o muy leve) |       |

## Discusión

Muchos SNPs nucleares han sido relacionados con el riesgo de ECV, sin embargo, estos no explican toda la heredabilidad. El papel de la mitocondrial como un factor clave para el correcto funcionamiento celular permite pensar que variaciones en la secuencia del genoma mitocondrial, que proporciona algunos de los elementos esenciales de la OXPHOS podría encontrarse también asociada a este riesgo. Con esto en mente, en esta tesis se ha secuenciado de manera fiable el genoma mitocondrial completo de 110 individuos con historial de accidente cerebrovascular, 167 individuos con antecedentes de infarto de miocardio, 67 individuos que presentan ambas patologías y sus respectivos controles; y se han analizado las variantes observadas tanto en homoplasmia como en heteroplasmia (con una frecuencia alélica del alelo menor superior al 3%). Los resultados más destacados se recogen en el Resumen esquemático 2.



### Variantes de la región no codificante

La región no codificante del genoma mitocondrial incluye los promotores para la transcripción de las dos cadenas del mtDNA y también el origen de replicación de la cadena pesada, de manera que variables en esta región, aunque no afecten directamente a una subunidad de la cadena de transporte de electrones, o a un tRNA o ribosoma mitocondrial, pueden estar alterando de manera significativa la función mitocondrial afectando tanto la replicación como la transcripción.

La variante m.72C>T se localiza en la región no codificante, más precisamente en la HVR2. Basándonos en nuestros resultados parece estar actuando como una variante protectora frente al riesgo de ACV, y el riesgo de ECV (IM, ACV, y la combinación de estas), mientras que no parece modificar el riesgo de la comorbilidad de ACV e IM. En el caso de las muestras con infarto miocárdico, aunque no encontramos una asociación significativa, si observamos que la frecuencia de la variante m.72C>T era el doble en los controles (C: 6% vs CL: 15,57%, McNemar:  $P = 0,054$ ), concordando con un posible papel protector también en esta enfermedad. Esta variante ya fue descrita por Umbría et al., (2020) como una variante protectora ante el infarto de miocardio, lo cual se alinea con nuestros resultados, y da más robustez al carácter protector de esa en relación a la ECV.

Por otro lado, se detectó que la variante m.73A>G parece estar actuando como un factor de riesgo en relación con el ACV y como un factor de protección ante la presencia combinada del ACV e IM. En los individuos con IM y en el análisis conjunto de todas las muestras no muestra ninguna asociación. Esta variante, que también se localiza en la HVR2, se ha relacionado con un incremento del riesgo de obesidad (Eaaswarkhanth et al., 2019), un conocido factor de riesgo en la ECV. Por el contrario, Umbria y colaboradores describieron este polimorfismo como un factor de protección ante el infarto de miocardio. Se ha hipotetizado que esta variante podría estar alterando la replicación y/o transcripción del mtDNA (Umbria et al., 2020). Con los resultados obtenidos en el análisis del número de copias de DNA mitocondrial realizado en este estudio podemos inferir que esta variante no altera de manera significativa la replicación del mtDNA, aunque no disponemos de información sobre una posible alteración de la transcripción.

El hecho de que la variante m.73A>G continúe ampliamente distribuida en las diferentes ramas del árbol filogenético mitocondrial, tras haber estado bajo presión selectiva durante miles de años, indicaría que se trata de una mutación que carece de efecto patogénico por sí misma. Basándonos en nuestros resultados, esta mutación parece tener un efecto complejo en el riesgo de las diferentes ECV, ya que observamos que parece jugar un papel de riesgo en el ACV mientras que actúa de manera protectora en los pacientes que presentan tanto IM como ACV. Estos resultados corroborarían la hipótesis de expuesta por Hudson et al., (2014) en la que propone que las mutaciones de la región control mitocondrial pueden tener efectos tanto de riesgo como protectores en enfermedades diferentes.

También se detectaron dos variantes en la región hipervariable I que parecen estar actuando como factores de protección en el riesgo de ECV.

La variante m.16298T>C se encuentra localizada en la HVR1 y parece jugar un papel protector en el riesgo de ACV. No se ha descrito anteriormente como modificadora del riesgo de alguna enfermedad, y podría estar reflejando el papel protector del haplogrupo V, y no actuar de manera independiente.

## V. Variación mitocondrial por posición

Finalmente, la variante m.16362T>C, localizada también en la HVR1 se ha encontrado sobrerrepresentada en los controles en el análisis conjunto de todas las ECV, insinuando que estaría actuando como un factor de protección frente al riesgo de ECV. Esta variante ha sido descrita como un factor de riesgo frente a la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en población mejicana (Restrepo et al., 2015) y en la forma familiar de cáncer de mama (Cheng et al., 2014).

### Variantes de los complejos de la OXPHOS

En este trabajo se han detectado diversas variantes que modifican el riesgo de ECV en genes de los complejos de la OXPHOS. La mayoría de estas se localizan en los genes del complejo I.

La variante m.4580G>A se encontraba sobrerrepresentada en los individuos controles del análisis de ACV, postulándose como un factor de protección frente a esta enfermedad. Se trata de un SNP sinónimo en el gen ND2 que no ha sido asociado con ninguna condición hasta la fecha y podría simplemente estar demostrando el papel protector del haplogrupo V, ya que se trata de una de las variantes que lo definen.

La variante sinónima 11467A>G, localizada en el gen ND4 (aminoácido 236L), se encuentra sobrerrepresentada en controles en comparación con los individuos que han presentado tanto un ACV como un IM. El significado clínico de esta variable es controvertido, ya que se ha reportado como posiblemente patogénica y también como benigna en la base de datos ClinVar (NCBI, accedido 2022).

En este mismo gen (ND4) se detectó que la variante m.11719G>A también estaba representada de manera estadísticamente diferente entre casos y controles en dos de los análisis realizados. Cuando se investigó su relación con el riesgo de ACV se observó una frecuencia superior en los individuos afectados, sugiriéndose como un factor de riesgo. Por el contrario, en el análisis de las muestras que habían manifestado tanto un ACV como un IM se encontraba sobrerrepresentada en los controles, indicando que en este caso estaba actuando como un factor de protección. Esta variante implica no implica ningún cambio aminoacídico.

El producto génico de ND4 es una subunidad del complejo I de la OXPHOS el cual acepta electrones de NADH, los transfiere a la ubiquinona y utiliza la energía liberada para bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna. Una mutación en este gen (m.11778G>A) se ha relacionado con más del 50% y 90% de todos los casos de LHON en población caucásica y asiática, respectivamente (Yu-Wai-Man & Chinnery, 2021). En concordancia con nuestros resultados en ACV, Rosa et al., (2008) describieron m.11719G como una variante protectora para ACV y propusieron que la proximidad de esta variante con el polimorfismo patogénico m.11778A sugiere que podría localizarse en o cerca de un dominio funcional importante potencialmente alterando la función de ND4. Además, se ha visto que la variante m.11719G>A es más prevalente en pacientes con esclerosis múltiple (Al-Kafaji et al., 2022).

En el gen CYB del complejo III de la OXPHOS hemos detectado una variante relacionada con el riesgo de ACV. Se trata de la variante m.14766C>T, una mutación no sinónima que resulta en la sustitución aminoacídica Thr7Ile. Este cambio está involucrado en el flujo de electrones y bombeo de protones y podría conllevar una reducción de la eficiencia del ciclo Q del complejo III y consiguientemente un incremento en la producción de ROS (Beckstead et al., 2009). Sin

## V. Variación mitocondrial por posición

embargo, en el análisis de los individuos que presentan ambas enfermedades, presenta una distribución inversa, encontrándose sobrerrepresentada, aunque de manera no significativa, en los controles.

Estas últimas 2 variantes, m.11719G>A y m.14766C>T, presentan el mismo patrón actuando como factor de riesgo en el ACV incrementándolo aproximadamente 2 veces, mientras que reducen el riesgo de sufrir un ACV en combinación con un IM entre 2,6 y 2,9 veces. Pueden parecer resultados contradictorios, sin embargo, se ha de tener en cuenta que, aunque estas 2 ECV compartan muchas características, ya hemos visto que en relación con la variación en el genoma mitocondrial se comportan de manera diferente. Esto nos lleva a pensar en la posibilidad de que el papel beneficioso que proporcionan en los individuos con ambas enfermedades no se deba directamente a un papel protector de las variantes, como podría ser la producción de proteínas más estables o eficientes, sino que aumentan son características del ACV, y no de la combinación de este con otras ECV como el infarto de miocardio.

En el complejo IV se detectó una variante en el gen CO1 sobrerrepresentada en los casos con antecedentes tanto de accidente cerebrovascular como de infarto de miocardio. Se trata de la variante m.6776T>C, una transición que no provoca ningún cambio de aminoácido (291H) ni altera la energía mínima ni la estructura secundaria de este gen. Esta variante no ha sido asociada a ninguna condición patológica, aunque si ha sido descrita en individuos con deficiencia auditiva neurosensorial familiar (Lehtonen et al., 2003). La variante m.6776T>C define el haplogrupo mitocondrial H3, habiendo observado una sobrerrepresentación de individuos del haplogrupo H en los afectados de ambas enfermedades y teniendo en cuenta lo que se sabe de esta variante, probablemente no tenga un efecto perjudicial por sí misma, sino que refleje el riesgo que supone el haplogrupo H en el riesgo de ACV e IM.

No se ha detectado ninguna variante en homoplasma parece estar asociada al riesgo de sufrir infarto de miocardio. Sin embargo, la variante en heteroplasma m.4157A>T se encuentra significativamente asociada con una marcada disminución del riesgo de IM. Esta mutación no ha sido descrita previamente asociada a ninguna patología. Se encuentra en una posición muy estable del gen ND1 y, aunque implica un cambio aminoacídico, no parece estar afectando a la estructura secundaria del mRNA de este gen. Otra variante en esta misma posición, que provoca el cambio aminoacídico Gln248Arg tampoco ha sido asociada a ninguna condición patológica (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P03886/entry>) a pesar de que la variante del aminoácido contiguo (Leu285Pro) está implicada en la LHON (Howell et al., 1991).

### Variantes de los genes de tRNA

La variante m.15904C>T, que en nuestros resultados parece jugar un papel protector tanto frente al ACV como a la ECV global, se localiza en el gen mitocondrial de tRNA treonina, en el *D-Loop* de la estructura secundaria, sin modificar el apareamiento codón-anticodón. Esta variante ha sido descrita como benigna en casos de miopatía, encefalopatía, acidosis láctica y ACV juvenil (Wong et al., 2020) y está clasificada como benigna (MitoTIP = 1,7). Aunque el impacto funcional de los cambios en la MFE de las variantes en el *D-Loop* y en los genes no tRNA no es claro, podríamos hipotetizar que la disminución en la entropía observada en la variante del gen de tRNA podría resultar en un incremento de la estabilidad y por lo tanto de la disponibilidad, mejorando la traducción a proteína.



### Variantes de los genes de rRNA

En nuestros resultados no se ha hallado ninguna variante localizada en un gen de rRNA que se encuentre significativamente asociada al riesgo de sufrir ninguna de las ECV (o combinaciones de ellas) estudiadas en esta tesis. A pesar de que si se han observado diferencias bastante marcadas en la distribución de la variante m.2706A>G, localizada en el gen RNR2, que es más frecuente en los controles respecto a los individuos que han presentado tanto ACV como IM y también en la distribución de la heteroplasmia m.709G>A también más frecuente en los controles que en los individuos afectados por ECV.

Un estudio realizado en población china identificó las variantes m.681T>C y m.735A>G como factores de riesgo en las enfermedades de las arterias coronarias (Jia et al., 2020). Esta segunda variante ya había sido previamente relacionada con la pérdida auditiva (Alves et al., 2016). Teniendo en cuenta que estas variantes rodean la variante m.709G>A permite pensar que pueda tener relevancia funcional y que en futuros trabajos con un tamaño muestral superior se pueda comprobar si realmente podría estar actuando como un factor protector.

Los polimorfismos en los genes de rRNA no tiene porqué alterar la función de estos para impactar al correcto funcionamiento mitocondrial, sino que pueden estar afectando a la función de péptidos derivados de la mitocondria (MDPs). La humanina, es uno de estos MDPs, se localiza dentro del gen RNR2 y se ha mostrado como protector frente a la arteriosclerosis. Se ha investigado como la variación a nivel de secuencia afecta a la producción de este péptido y se ha visto que la variante m.2706A>G se encuentra asociada a unos menores niveles de circulantes de humanina y con un envejecimiento cognitivo acelerado en población afroamericana mientras que no presenta el mismo efecto en población americana caucasiana (Yen et al., 2018).

# VI. Número de copias de mtDNA

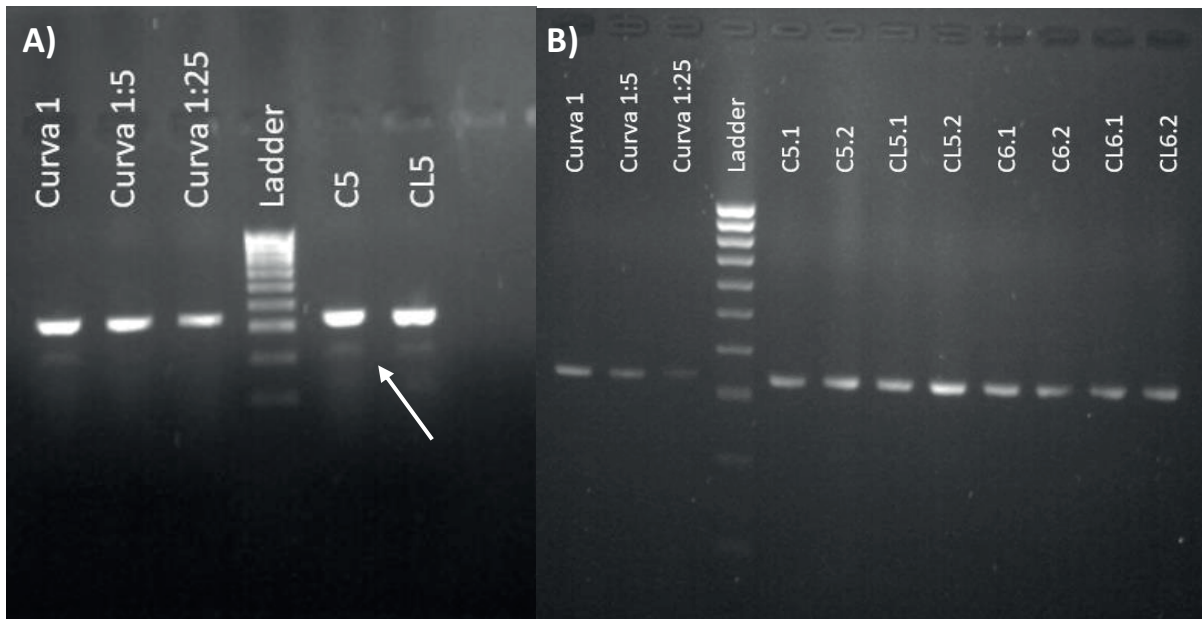
---



## Resultados

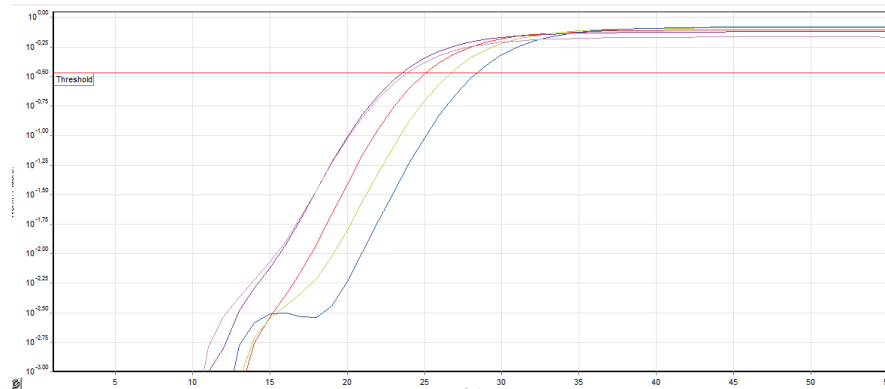
### Accidente cerebrovascular

Antes de poder analizar el mtDNA-CN se optimizó la metodología de análisis para evitar la co-amplificación de bandas inespecíficas en el fragmento del gen nuclear PSEN2 (Figura 19). Esto comportó un incremento de la temperatura y una reducción del número de ciclos hasta llegar a los ajustes finales descritos en el apartado de material y métodos.



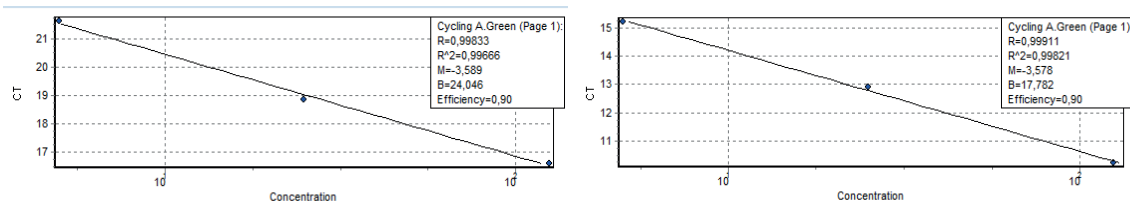
**Figura 19.** Geles de agarosa de 2 de las qPCRs durante el proceso de optimización. A) Una de las primeras qPCR realizadas, en la cual se puede observar la presencia de bandas de amplificación inespecíficas. B) qPCR realizada con las condiciones definitivas, donde se puede apreciar como las bandas inespecíficas han desaparecido.

Los resultados del análisis del número de copias del mtDNA de cada una de las muestras ( $\Delta Ct$ ) se encuentran en la Tabla suplementaria 9. En todas las qPCRs que fueron utilizadas se comprobó que las diferentes concentraciones utilizadas en la creación de la curva estándar presentaran una separación más o menos similar entre ellas (Figura 20) y que tanto el valor de R como de  $R^2$  fueran superiores a 0,99 (Figura 21).



**Figura 20.** Resultados de qPCR para las 4 diluciones junto a una muestra (en rosa). Se puede observar que las diluciones [morado = 1, rojo = 1:5, amarillo = 1:25 y azul = 1:125] presentan el comportamiento correcto y la separación entre ellas es aproximadamente igual.

## VI. Número de copias de mtDNA



**Figura 21.** Detalle de las rectas estándar obtenidas a partir de las diluciones de concentración conocida en la qPCR del caso 5. En la izquierda se encuentra la correspondiente al gen nuclear PSEN2 y a la derecha la del gen mitocondrial (HN1). Como se puede observar, la eficiencia de ambas reacciones es la misma (0,90) permitiendo así comparar los valores de obtenidos. Los valores de R y R<sup>2</sup> superan el 0,99.

El número de copias de mtDNA resultó ser muy similar entre casos ( $\Delta\text{Ct}$  promedio = -5,86) y controles ( $\Delta\text{Ct}$  promedio = -5,78) (*Fold change* = 1,35). Esta pequeña diferencia no fue significativa en el Test t: P = 0,430.

### Infarto de miocardio

El protocolo optimizado obtenido con las muestras de ACV, demostró buenos resultados también con los individuos con IM y sus respectivos controles. Como se puede observar en la Figura 22 (A y B), la serie de diluciones se encontraba correctamente espaciada y tanto su comportamiento como el de las muestras era el esperado.

La amplificación única del fragmento deseado se comprobó mediante la observación del gráfico de *melting* (Figura 22C) en el cual podemos ver un único pico que se corresponde con el fragmento diana. Se puede observar una pequeña desviación del pico en algunas de las muestras (por ejemplo, entre las que presentan un pico de amplificación mayor) que se corresponde con pequeños polimorfismos en la secuencia.

Los resultados del análisis para cada una de las muestras ( $\Delta\text{Ct}$ ) se encuentran en la Tabla suplementaria 7. El número de copias de mtDNA resultó ser prácticamente idéntico entre casos ( $\Delta\text{Ct}$  promedio = -6,56) y controles ( $\Delta\text{Ct}$  promedio = -6,55) (*Fold change* = 1,14 y Test t: P = 0,871).

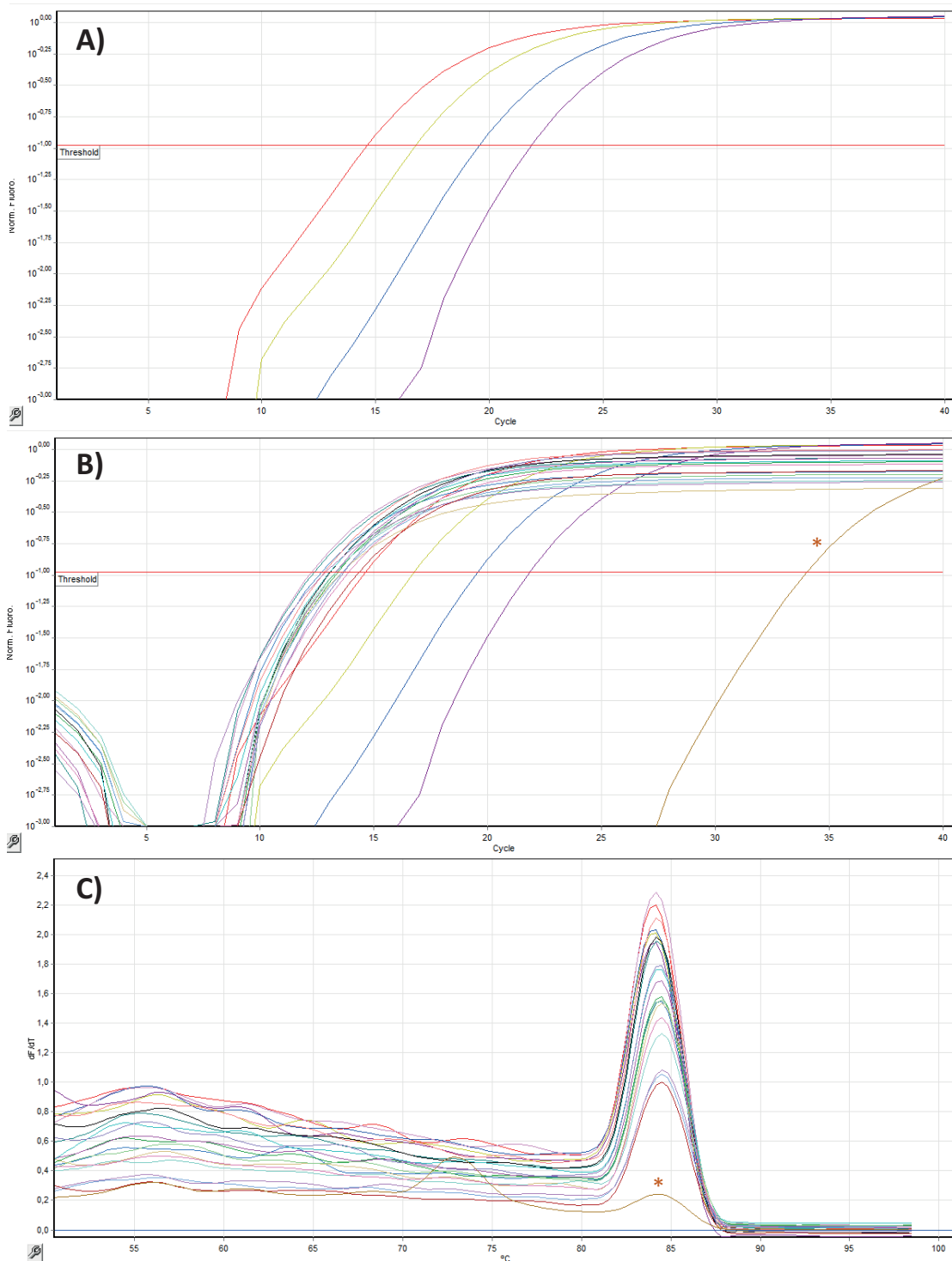
### Accidente cerebrovascular e infarto de miocardio

Tras ver que los valores de  $\Delta\text{Ct}$  eran muy similares entre casos y controles, tanto para el ACV como para el IM, se tomó la decisión de no analizar muestras que presentaran ambas enfermedades.

### Enfermedad cardiovascular global

Se analizaron de manera conjunta las muestras con ACV o IM que nos habían proporcionado resultados correctos en los apartados anteriores. No encontramos diferencias en el número de copias de mtDNA entre casos y controles (*Fold change* = 1,24 y Test t: P = 0,470) dado que las diferencias en  $\Delta\text{Ct}$  entre los grupos son mínimas ( $\Delta\text{Ct}$  casos = -6,21 y  $\Delta\text{Ct}$  controles = -6,16).

## VI. Número de copias de mtDNA



**Figura 22.** Resultados de la qPCR de HN1 en algunas de las muestras. A) Únicamente se visualizan los resultados de las diluciones seriadas, observándose un comportamiento y distancia entre ellas correcto. B) Se han incorporado los resultados de las distintas muestras analizadas. La muestra naranja (\*) es el control negativo o blanco. C) Resultados de melting, en el cual observamos la presencia de un único pico en todas las muestras (a excepción del blanco, \*).

### Discusión

La variación en el número de copias de mtDNA ha sido relacionado con muchos factores, incluyendo la edad (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020), el género (Ding et al., 2015; Vyas et al., 2020), la ancestralidad (Domínguez-de-la-Cruz et al., 2020; Vyas et al., 2020), enfermedades y características del estilo de vida como puede ser el ejercicio físico (Y. Kyung. Chang et al., 2016), tabaquismo (Vyas et al., 2020) y la mortalidad por cualquier causa (Ashar et al., 2015). Aunque la asociación entre el mtDNA-CN y el riesgo de enfermedad cardiovascular esta comúnmente aceptada, aún ha de ser investigada con profundidad.

Se ha asociado un menor mtDNA-CN con un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular (R. Wei et al., 2021; Yue et al., 2018). Se ha observado que esta asociación varía de magnitud dependiendo de la ECV estudiada, e incluso entre estudios. En 2017, Ashar y colaboradores observaron que la asociación entre el ACV y el mtDNA-CN era más débil que con la enfermedad de las arterias coronarias; mientras que, en 2022, Sundquist y colaboradores describieron la asociación de ambas como de magnitud similar. Esta asociación no parece suceder en todas las ECV, puesto que Lei et al., (2017) no encontraron asociación entre el mtDNA-CN y la hipertensión; Nymberg et al., (2021) tampoco encontró asociación con el tromboembolismo venoso ni Guyatt et al., (2018) en relación a varios factores de riesgo cardiometabólicos.

En este estudio no hemos encontrado una asociación significativa entre el número de copias de DNA mitocondrial y el riesgo de sufrir un ACV o IM. Como hemos mencionado previamente, el mtDNA-CN depende de muchos factores, muchos de los cuales están apareados entre casos y controles en nuestra muestra (edad, sexo, origen geográfico) o no presentan diferencias (tabaquismo, sobrepeso, diabetes, etc.). Este hecho aumenta el valor de nuestros resultados, al haber neutralizado tantos factores que podrían estar contribuyendo a cambios en el mtDNA-CN. De esta manera, nuestros análisis nos permiten cuestionar la asociación con el riesgo de ECV con una mayor fiabilidad. Una posible limitación de esta parte del estudio es el tamaño muestral, que podría considerarse reducido. Sin embargo, se ha demostrado que tamaños muestrales similares permiten detectar asociaciones estadísticamente significativas entre el mtDNA-CN y el cáncer de próstata (Zhou et al., 2014), el carcinoma de células escamosas (Masuike et al., 2018), el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (Öğütlü et al., 2020) y la esclerosis sistémica (Movassaghi et al., 2020).

Otro factor que parece estar muy implicado en el mantenimiento del número de copias del genoma mitocondrial es el Factor de Transcripción Mitocondrial A (TFAM). Esta proteína no solo se encarga de la correcta replicación del DNA mitocondrial, sino que también regula su transcripción y el empaquetamiento de dicho genoma en nucleoides.

Mediante la creación de modelos animales con *knock-downs* del gen TFAM, se ha visto que la reducción de esta proteína resulta en un menor número de copias de mtDNA, junto con una reducción de los transcritos producidos por la cadena pesada y de la producción de ATP celular (Otten et al., 2020). Concretamente, se ha visto que se reduce considerablemente la actividad de los complejos I y II, y, de manera no estadísticamente significativa, también la de los complejos III y IV. De hecho, se ha relacionado que la disminución de mtDNA-CN que se observa en individuos que han pasado por una lesión OGD/R (lesión por privación de oxígeno-glucosa y reperfusión, simulando el proceso patológico que ocurre tras un ACV), podría ser debida a una reducción en la expresión de TFAM (Aasumets et al., 2021).

## VI. Número de copias de mtDNA

Por el contrario, se ha observado que tanto la sobreexpresión de TFAM producen un incremento en el número de copias de genoma mitocondrial, mejora la remodelación cardíaca, previene la generación de ROS e incrementa la supervivencia tras un IM en modelos animales (Ikeda et al., 2015).

En relación a la expresión de TFAM se ha observado que puede estar implicado el control epigenético mediante la metilación de su promotor (en el genoma nuclear) (Kietzmann et al., 2017). Esto se constata en el trabajo de Zhang y colaboradores 2013, en el cual observaron que en ratones expuestos al humo de cigarrillos se incrementaba la metilación de dicho promotor resultando en una reducción importante de la expresión de TFAM, del número de copias de mtDNA y en la apoptosis de células endoteliales (H. [Zhang et al., 2013](#)).

En este sentido sería de gran interés investigar el papel que estaría jugando la expresión de TFAM y/o la regulación epigenética de este gen en nuestra cohorte.



# Consideraciones finales





### En relación con la muestra estudiada

Genéricamente, la enfermedad cardiovascular (ECV) comprende tanto las patologías del músculo cardíaco como las de los vasos sanguíneos. En esta Tesis Doctoral se incluye el estudio de dos patologías distintas: el accidente cerebrovascular (ACV) y el infarto de miocardio (IM), que son las principales causas de muerte a nivel mundial. Y, aunque es cierto que la etiología y la patogénesis del ACV y del IM tiene diferencias en el modo de presentación, ambos grupos de enfermedades tienen un mismo origen. Las bases etiológicas de dichas patologías están íntimamente relacionadas con la arterioesclerosis, la hipertensión arterial y los procesos inflamatorios de la pared vascular. Además, comparten tanto los factores de riesgo modificables asociados al estilo de vida, como la obesidad, el tabaquismo, el sedentarismo y sus enfermedades asociadas, la diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia, como los no modificables relacionados con la edad y los factores genéticos. Por otra parte, no es probable que la inclusión de las dos patologías en este estudio pueda diluir las posibles asociaciones con el mtDNA, puesto que la base de datos con la que se trabaja permite distinguir entre individuos con antecedentes de ECV tanto en el caso de IM como en el caso de ACV.

Los aspectos que se acaban de señalar tienen importancia dado que, aparte de estudiar estas patologías por separado, se incluye también el análisis de un grupo muestral conformado por individuos que han padecido ambas afecciones, así como el estudio que, bajo el epígrafe de Enfermedad cardiovascular global, agrupa la totalidad de las muestras.

Otra cuestión que también se debe tener en cuenta el número muestral de casos i controles de cada grupo poblacional, que si bien es suficiente en los grupos poblacionales con antecedentes de ACV (N= 220; 110 casos y 110 controles) e infarto de miocardio (N= 334; 167 casos y 167 controles), es relativamente bajo en la muestra poblacional que presenta ambas patologías (N= 134; 67 casos y 67 controles), mientras que al considerar la enfermedad cardiovascular en su conjunto se reúne una muestra respetable (N= 688; 344 casos y 344 controles).

Dichas muestras proceden de un Estudio de Riesgo de Enfermedades Cardiovasculares de Castilla y León (Vega Alonso et al. 2007). Se trata de un estudio transversal, observacional y descriptivo realizado en la mencionada Comunidad Autónoma, a partir de una muestra aleatoria de población general (densidad de población en 2022: 25 habitantes/Km<sup>2</sup>), que se sometió a un examen de salud en relación con los factores de riesgo cardiovascular en 2004. Estos individuos fueron seguidos con la misma metodología en 2009 y 2014.

### Respecto al marcador genético estudiado

Existe un número elevado de polimorfismos nucleares asociados al riesgo de ECV, sin embargo, estos sólo explican una parte de la variabilidad de las manifestaciones clínicas del IM y el ACV. La investigación llevada a cabo mediante el análisis del ADN mitocondrial permite aportar nuevos datos sobre la ECV.

En los últimos años, el papel de la mitocondria en relación al riesgo de ECV ha ganado relevancia puesto que es la principal encargada de la producción de energía celular, de la homeostasis del calcio y de la producción de ROS. Siguiendo esta línea, algunos estudios se centran en el genoma mitocondrial para encontrar asociaciones significativas entre éste y el riesgo de ECV, dado que el mtDNA codifica subunidades de los diferentes complejos de la OXPHOS relacionados con la producción de ROS (Andalib et al., 2017). Hasta la fecha, muchos

de los trabajos realizados se limitan al estudio de los haplogrupos mitocondriales, aunque, más recientemente, ya se empieza a incorporar el estudio del genoma mitocondrial completo.

En esta línea, la presente tesis se ha propuesto determinar el papel que juega la variación de la molécula completa de mtDNA en la ECV en una muestra poblacional bien delimitada geográficamente.

### En cuanto a los parámetros estudiados

**Calidad de la secuenciación:** en la presente tesis queda reflejada la importancia de comprender tanto la metodología empleada para la realización de las librerías como la plataforma utilizada para la secuenciación; dado que estas pueden introducir sesgos en los valores de calidad de la secuenciación, que no representan errores reales en la calidad de los datos obtenidos.

**Haplogrupos:** Una vez definidos haplotípicamente los grupos poblacionales, se ha realizado un análisis de la relación entre haplogrupos mitocondriales y las patologías, pudiendo realizarse las siguientes observaciones:

El haplogrupo V (Hg V) parece actuar como un factor de protección frente al riesgo de accidente cerebrovascular. A pesar de no haber realizado estudios para determinar si las variantes que definen este haplogrupo implican cambio en la eficiencia de la OXPHOS, se conoce que alcanza puntos altos de frecuencia en poblaciones que habitan territorios de clima frío. Esto nos lleva a considerar que las variantes que lo definen podrían implicar un ligero desacoplamiento en la OXPHOS, disminuyendo la producción de ROS, y reduciendo, por tanto, el daño que estas causan en el genoma mitocondrial, que mantendría su integridad y funcionalidad.

El haplogrupo H parece jugar un papel como factor de riesgo en la comorbilidad del ACV y el IM. Esta asociación seguramente sea debida a que las variantes genéticas que definen este haplogrupo provocan un incremento en la producción de ROS, que, a su vez, incrementa la disfunción endotelial, predisponiendo al desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Palacín et al., 2011), procesos comunes en las patologías cardiovasculares objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. Por su parte, en este mismo grupo poblacional (ACV e IM), el haplogrupo U parece tener un efecto protector, disminuyendo el riesgo de sufrir ambas patologías. Se ha descrito que este haplogrupo presenta una menor cantidad de rRNA mitocondrial, de proteínas mitocondriales total y de actividad del complejo IV.

**Perfil mitocondrial:** En el ámbito de la enfermedad cardiovascular, la presente Tesis Doctoral es el primer estudio que, además de realizar un análisis de la variabilidad genética mitocondrial variante a variante, también estudia cómo las homoplasmias y heteroplasmias se distribuyen a lo largo del genoma mitocondrial. En este sentido, se ha constatado que existen disimilitudes en la distribución tanto de homoplasmias como de heteroplasmias, siendo más evidentes las que se observan en los análisis realizados en individuos con antecedentes de ACV (mayor presencia de homoplasmias en casos que en controles) e individuos con antecedentes de ambas enfermedades (presentan globalmente menos mutaciones fijadas que los controles). Las diferencias a nivel de heteroplasmias son mucho más discretas, observándose principalmente a nivel génico y no global o de complejos.

La *ratio* de mutaciones fijadas, en función de la longitud de la región mitocondrial analizada, muestra el mismo patrón en casos y controles, y también en las diferentes ECV analizadas. Por

su parte, la *ratio* de heteroplasmas también presenta un patrón muy similar entre casos y controles aunque difiere levemente en función de la ECV que se estudie.

**Carga mutacional ajustada (CMA):** Se trata de un análisis que permite contrarrestar algunos de los sesgos típicos de los estudios de asociación con haplogrupos investigando el efecto combinado de variantes mitocondriales raras. En relación con los resultados obtenidos en el presente estudio, se pone de manifiesto que, a pesar de existir diferencias en la CMA entre casos y controles, éstas no son las mismas en las distintas ECV analizadas. El resultado más destacable evidencia que, la CMA considerando el genoma mitocondrial completo, a nivel de ECV global, es superior en los individuos con antecedentes de ECV.

**Variación mitocondrial por posición:** Se investiga el papel que juega cada una de las variantes mitocondriales, de todo el genoma, en el riesgo de ECV como factor de riesgo independiente. Este análisis nos permite describir diversas variantes que estarían actuando como modificadores del riesgo, algunas incrementándolo y otras disminuyéndolo. Respecto a estas mutaciones, los análisis *in-silico* realizados no permiten conocer el impacto que pueden llegar a tener realmente en las patologías estudiadas, de manera que, la realización de estudios funcionales de la variación mitocondrial detectada puede ser un objetivo muy interesante para futuros estudios.

**Número de copias:** Este parámetro se ha determinado tanto en individuos con antecedentes de ACV como de IM. El análisis de los datos indica que el mtDNA-CN no parece encontrarse asociado al riesgo de ECV.

En conjunto la presente Tesis Doctoral permite aumentar la comprensión sobre la implicación de la variación en el genoma mitocondrial en la patogénesis de las ECV, y proporciona una base para estudios adicionales. Sin embargo, los resultados producidos han de ser tratados con cautela dado que, debido al tamaño muestral limitado, muchos de ellos no tolerarían una corrección por comparación múltiple. En este sentido, sería muy interesante ampliar el tamaño muestral o ratificar los resultados en otra cohorte de mayor tamaño.

# Conclusiones





### Factores de riesgo clásicos

1. La hipercolesterolemia y la hipertensión son los principales factores de riesgo clásico que se encuentran afectando al riesgo de ECV, de manera que es necesario incluirlas en análisis posteriores para evitar que actúen como factores de confusión.

### Calidad de la secuenciación

2. La calidad de los datos obtenidos en la secuenciación del genoma mitocondrial se evidencia a través de los resultados de los módulos analizados mediante el programa FASTQC. Los valores inferiores de calidad encontrados en algunos parámetros son explicados por los sesgos introducidos por la tecnología empleada en la elaboración de las librerías y la plataforma de secuenciación utilizada, y no evidencian errores de calidad real de los datos.

### Distribución de los haplogrupos

3. El análisis de las frecuencias de haplogrupos en individuos con antecedentes de ACV ha revelado que el macrohaplogrupo R0 y concretamente el haplogrupo V podrían estar actuando como factores protectores frente al riesgo de accidente cerebrovascular. Mientras que no se halla asociación entre los haplogrupos mitocondriales y el riesgo de IM, ni de ECV global.
4. El haplogrupo H podría estar actuando como un factor de riesgo en relación a la comorbilidad del ACV y el IM. En el sentido contrario, el haplogrupo U actuaría como un factor de protección en este mismo grupo poblacional.

### Perfil y carga mutacional

5. En relación a la distribución de las homoplasmias en el genoma mitocondrial se ha observado: a) una sobrerrepresentación en los individuos con antecedentes de ACV (mtDNA completo, NCR, HVR1, Complejo I, Complejo III y rRNAs); b) una disminución de homoplasmias en el gen CO3 de los individuos con antecedentes de IM; c) una sobrerrepresentación en los controles emparejados con los individuos con antecedentes de ambas enfermedades (mtDNA complejo, NCR, CR, HVR1, Complejo I y tRNAs), d) una sobrerrepresentación en el fragmento solapante entre los genes ATP6 y ATP8 en los individuos con antecedentes de ECV global.
6. La distribución de las heteroplasmias presenta diferencias mucho más discretas, detectándose principalmente a nivel génico. En individuos con historial de ACV se observa una sobrerrepresentación de estas en el gen CO2. En individuos con IM observamos una sobrerrepresentación en HVR3 y el complejo IV, mientras que presentan una subrepresentación de heteroplasmias en la región no codificante (no HVRs). En individuos con antecedentes de ACV e IM las heteroplasmias se encuentran sobrerrepresentadas en el gen ND1. En las ECV global no se observan diferencias estadísticamente significativas.
7. En el estudio de la distribución de mutaciones, se ha determinado que, en todos los análisis, la *ratio* (número de mutaciones/longitud en pares de bases de la región analizada) presenta un patrón muy similar entre casos y controles tanto para las homoplasmias como para las heteroplasmias.



8. Se ha evidenciado que la carga mutacional ajustada presenta diferencias entre los individuos con antecedentes de ECV y los controles, sin embargo, no se observan las mismas diferencias en todas las ECV analizadas. En ACV los casos presentan una CMA superior en el complejo IV, mientras que la CMA del gen ATP6 es significativamente superior en los controles. Los individuos con antecedentes de IM presentan una CMA inferior en el gen CO1 en relación a sus controles, mientras que los individuos con antecedentes de ambas patologías no muestran diferencias significativas. En el análisis de la ECV global se detecta una carga mutacional ajustada general superior en los individuos con historial de ECV.

### Variación mitocondrial por posición

9. Las variantes m.72T>C, m.4580G>A, m.15904C>T y m.16298T>C en homoplasmia aparecen como factores de protección frente al ACV. Sin embargo, es posible que dichas variantes no estén actuando como factores independientes, sino que reflejen el papel protector del haplogrupo V. Por el contrario, las variantes m.73A>G, m.11719G>A y m.14766C>T se postulan como factores de riesgo.
10. No se ha detectado ninguna variante en homoplasmia que modifique el riesgo de IM, sin embargo, la variante m.4157A>T en heteroplasmia actuaría como un posible factor de protección.
11. En los individuos con ambas patologías (ACV e IM), las variantes m.73A>G, m.11467A>G, m.11719G>A y m.16362T>C se comportarían como factores de protección. Por el contrario, la variante m.6776T>C actuaría como un factor de riesgo.
12. Las variantes m.72T>C y m.15904C>T parecen estar actuando como factores protectores frente al riesgo de sufrir una ECV global.

### Número de copias de mtDNA

13. En número de copias del genoma mitocondrial no muestra ningún tipo de asociación con el riesgo de IM, ACV o la ECV global.

# Bibliografía



- Aasumets, K., Basikhina, Y., Pohjoismäki, J. L., Goffart, S., & Gerhold, J. (2021). TFAM knockdown-triggered mtDNA-nucleoid aggregation and a decrease in mtDNA copy number induce the reorganization of nucleoid populations and mitochondria-associated ER-membrane contacts. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *28*, 101142. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2021.101142>
- Abrantes, P., Rosa, A., Francisco, V., Sousa, I., Xavier, J. M., & Oliveira, S. A. (2016). Mitochondrial genome association study with peripheral arterial disease and venous thromboembolism. *Atherosclerosis*, *252*, 97–105. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2016.07.920>
- Abu-Amero, K. K., Al-Boudari, O. M., Mousa, A., Gonzalez, A. M., Larruga, J. M., Cabrera, V. M., & Dzimiri, N. (2010). The mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, *14*(1), 43–47. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2009.0095>
- Achilli, A., Rengo, C., Battaglia, V., Pala, M., Olivieri, A., Fornarino, S., Magri, C., Scozzari, R., Babudri, N., Santachiara-Benerecetti, A. S., Bandelt, H. J., Semino, O., & Torroni, A. (2005). Saami and Berbers—An Unexpected Mitochondrial DNA Link. *American Journal of Human Genetics*, *76*(5), 883. <https://doi.org/10.1086/430073>
- Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J. M., Roostalu, U., Loogväli, E. L., Kivisild, T., Bandelt, H. J., Richards, M., Villems, R., Silvana Santachiara-Benerecetti, A., ... Torroni, A. (2004). The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms That the Franco-Cantabrian Glacial Refuge Was a Major Source for the European Gene Pool. *American Journal of Human Genetics*, *75*(5), 910. <https://doi.org/10.1086/425590>
- Adegbija, O., Hoy, W., & Wang, Z. (2015). Prediction of cardiovascular disease risk using waist circumference among Aboriginals in a remote Australian community. *BMC Public Health*, *15*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-1406-1>
- Agha, G., Mendelson, M. M., Ward-Caviness, C. K., Joehanes, R., Huan, T. X., Gondalia, R., Salfati, E., Brody, J. A., Fiorito, G., Bressler, J., Chen, B. H., Ligthart, S., Guarrera, S., Colicino, E., Just, A. C., Wahl, S., Gieger, C., Vandiver, A. R., Tanaka, T., ... Baccarelli, A. A. (2019). Blood leukocyte DNA methylation predicts risk of future myocardial infarction and coronary heart disease: A longitudinal study of 11,461 participants from population-based cohorts. *Circulation*, *140*(8), 645. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039357>
- Aguilar, G., Vilchis, P., & Valdés, L. (2017). Los códigos genéticos mitocondriales: características, origen y evolución. In *Revista de Educación Bioquímica* (Vol. 36, Issue 4).
- Ahmed, Z. M., Smith, T. N., Riazuddin, S., Makishima, T., Ghosh, M., Bokhari, S., Menon, P. S. N., Deshmukh, D., Griffith, A. J., Riazuddin, S., Friedman, T. B., & Wilcox, E. R. (2002). Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and usher syndrome type IC are allelic mutations of USHC. *Human Genetics*, *110*(6), 527–531. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0732-4>
- Aibara, S., Singh, V., Modelska, A., & Amunts, A. (2020). Structural basis of mitochondrial translation. *ELife*, *9*, 1–17. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.58362>
- Aird, D., Ross, M. G., Chen, W. S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D. B., Nusbaum, C., & Gnirke, A. (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology*, *12*(2). <https://doi.org/10.1186/GB-2011-12-2-R18>

- Al-Kafaji, G., Bakheit, H. F., AlAli, F., Fattah, M., Alhajeri, S., Alharbi, M. A., Daif, A., Alsabbagh, M. M., Alwehaidah, M. S., & Bakhiet, M. (2022). Next-generation sequencing of the whole mitochondrial genome identifies functionally deleterious mutations in patients with multiple sclerosis. *PLoS ONE*, *17*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0263606>
- Álvarez, L., Ciria, E., Marques, S. L., Santos, C., & Aluja, M. P. (2014). Y-chromosome analysis in a Northwest Iberian population: unraveling the impact of Northern African lineages. *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, *26*(6), 740–746. <https://doi.org/10.1002/AJHB.22602>
- Álvarez, L., Santos, C., Ramos, A., Pratedesaba, R., Francalacci, P., & Aluja, M. P. (2010). Mitochondrial DNA patterns in the Iberian Northern plateau: Population dynamics and substructure of the Zamora province. *American Journal of Physical Anthropology*, *142*(4), 531–539. <https://doi.org/10.1002/AJPA.21252>
- Alves, R. M., da Silva Costa, S. M., do Amôr Divino Miranda, P. M., Ramos, P. Z., Marconi, T. G., Santos Oliveira, G., Castilho, A. M., & Sartorato, E. L. (2016). Analysis of mitochondrial alterations in Brazilian patients with sensorineural hearing loss using MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Medical Genetics*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/S12881-016-0303-5>
- Anand, R., Reichert, A. S., & Kondadi, A. K. (2021). Emerging Roles of the MICOS Complex in Cristae Dynamics and Biogenesis. *Biology*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10070600>
- Andalib, S., Divani, A. A., Michel, T. M., Høilund-Carlsen, P. F., Vafaei, M. S., & Gjedde, A. (2017). Pandora’s Box: mitochondrial defects in ischaemic heart disease and stroke. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *19*. <https://doi.org/10.1017/ERM.2017.5>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, *290*(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Andrabi, S. S., Parvez, S., & Tabassum, H. (2020). Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets. *Protoplasma*, *257*(2), 335–343. <https://doi.org/10.1007/S00709-019-01439-2>
- Andrews, S. (2010). *Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arnberg, A., van Bruggen, E. F. J., ter Schegget, J., & Borst, P. (1971). The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, *246*(2), 353–357. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(71\)90147-X](https://doi.org/10.1016/0005-2787(71)90147-X)
- Ásgeirsdóttir, S. A., van Solingen, C., Kurniati, N. F., Zwiers, P. J., Heeringa, P., van Meurs, M., Satchell, S. C., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Banas, B., Kamps, J. A. A. M., Rabelink, T. J., van Zonneveld, A. J., & Molema, G. (2012). MicroRNA-126 contributes to renal microvascular heterogeneity of VCAM-1 protein expression in acute inflammation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *302*(12). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00400.2011>
- Ashar, F. N., Moes, A., Moore, A. Z., Grove, M. L., Chaves, P. H. M., Coresh, J., Newman, A. B., Matteini, A. M., Bandeen-Roche, K., Boerwinkle, E., Walston, J. D., & Arking, D. E. (2015). Association of mitochondrial DNA levels with frailty and all-cause mortality. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *93*(2), 177–186. <https://doi.org/10.1007/S00109-014-1233-3>

- Ashar, F. N., Zhang, Y., Longchamps, R. J., Lane, J., Moes, A., Grove, M. L., Mychaleckyj, J. C., Taylor, K. D., Coresh, J., Rotter, J. I., Boerwinkle, E., Pankratz, N., Guallar, E., & Arking, D. E. (2017). Association of mitochondrial DNA copy number with cardiovascular disease. *JAMA Cardiology*, 2(11), 1247–1255. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.3683>
- Ashrafi, G., & Schwarz, T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 20, Issue 1, pp. 31–42). Cell Death Differ. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>
- Ason, B., & Reznikoff, W. S. (2004). DNA Sequence Bias during Tn5 Transposition. *Journal of Molecular Biology*, 335(5), 1213–1225. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.039>
- Bansal, V. (2017). A computational method for estimating the PCR duplication rate in DNA and RNA-seq experiments. *BMC Bioinformatics*, 18(Suppl 3). <https://doi.org/10.1186/S12859-017-1471-9>
- Beckstead, W. A., Ebbert, M. T. W., Rowe, M. J., & McClellan, D. A. (2009). Evolutionary Pressure on Mitochondrial Cytochrome b Is Consistent with a Role of Cytb17T Affecting Longevity during Caloric Restriction. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005836>
- Benjamini, Y., & Speed, T. P. (2012). Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 40(10). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS001>
- Benn, M., Schwartz, M., Nordestgaard, B. G., & Tybjaerg-Hansen, A. (2008). Mitochondrial haplogroups: ischemic cardiovascular disease, other diseases, mortality, and longevity in the general population. *Circulation*, 117(19), 2492–2501. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.756809>
- Blok, M. J., Spruijt, L., de Coo, I. F., Schoonderwoerd, K., Hendrickx, A., & Smeets, H. J. (2007). Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease. *Journal of Medical Genetics*, 44(4), e74. <https://doi.org/10.1136/JMG.2006.045716>
- Bock, R. (2017). Witnessing Genome Evolution: Experimental Reconstruction of Endosymbiotic and Horizontal Gene Transfer. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 51, pp. 1–22). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035329>
- Boehm, E., Zaganelli, S., Maundrell, K., Jourdain, A. A., Thore, S., & Martinou, J. C. (2017). FASTKD1 and FASTKD4 have opposite effects on expression of specific mitochondrial RNAs, depending upon their endonuclease-like RAP domain. *Nucleic Acids Research*, 45(10), 6135–6146. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx164>
- Botto, N., Berti, S., Manfredi, S., Al-Jabri, A., Federici, C., Clerico, A., Ciofini, E., Biagini, A., & Andreassi, M. G. (2005). Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 570(1), 81–88. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2004.10.003>
- Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A., & Holt, I. J. (2003). Mammalian Mitochondrial DNA Replicates Bidirectionally from an Initiation Zone. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50961–50969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308028200>

- Brandon, M. C., Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Procaccio, V., Lott, M. T., Nguyen, K. C., Spolim, S., Patil, U., Baldi, P., & Wallace, D. C. (2009). MITOMASTER – A Bioinformatics Tool For the Analysis of Mitochondrial DNA Sequences. *Human Mutation*, *30*(1), 1. <https://doi.org/10.1002/HUMU.20801>
- Brown, M. D., & Wallace, D. C. (1994). Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *26*(3), 273–289. <https://doi.org/10.1007/BF00763099>
- Bruno, C., Martinuzzi, A., Tang, Y., Andreu, A. L., Pallotti, F., Bonilla, E., Shanske, S., Fu, J., Sue, C. M., Angelini, C., DiMauro, S., & Manfredi, G. (1999). A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV. *American Journal of Human Genetics*, *65*(3), 611–620. <https://doi.org/10.1086/302546>
- Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D. P., McCarthy, M. I., Ouwehand, W. H., Samani, N. J., Todd, J. A., Donnelly, P., Barrett, J. C., Davison, D., Easton, D., Evans, D., Leung, H. T., Marchini, J. L., Morris, A. P., ... Compston, A. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, *447*(7145), 661–678. <https://doi.org/10.1038/nature05911>
- Cabrera, V. M. (2021). Human molecular evolutionary rate, time dependency and transient polymorphism effects viewed through ancient and modern mitochondrial DNA genomes. *Scientific Reports* *2021 11:1*, *11*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84583-1>
- Cai, B., Zhang, Z., Liu, K., Fan, W., Zhang, Y., Xie, X., Dai, M., Cao, L., Bai, W., Du, J., Dai, Q., Zhou, S., Zhang, H., Zhu, W., Ma, M., Liu, W., Liu, X., & Xu, G. (2015). Mitochondrial DNA haplogroups and short-term neurological outcomes of ischemic stroke. In *Scientific Reports* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1038/srep09864>
- Calabrese, C., Pyle, A., Griffin, H., Coxhead, J., Hussain, R., Braund, P. S., Li, L., Burgess, A., Munroe, P. B., Little, L., Warren, H. R., Cabrera, C., Hall, A., Caulfield, M. J., Rothwell, P. M., Samani, N. J., Hudson, G., & Chinnery, P. F. (2022). Heteroplasmic mitochondrial DNA variants in cardiovascular diseases. *PLoS Genetics*, *18*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1010068>
- Calabrese, C., Simone, D., Diroma, M. A., Santorsola, M., Gutta, C., Gasparre, G., Picardi, E., Pesole, G., & Attimonelli, M. (2014). MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(21), 3115–3117. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU483>
- Campos, Y., García-Redondo, A., Fernández-Moreno, M. A., Martínez-Pardo, M., Goda, G., Rubio, J. C., Martín, M. A., del Hoyo, P., Cabello, A., Bornstein, B., Garesse, R., & Arenas, J. (2001). Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene. *Annals of Neurology*, *50*(3), 409–413. <https://doi.org/10.1002/ANA.1141>
- Cann, R. L., Brown, W. M., & Wilson, A. C. (1984). Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*, *106*(3), 479–499. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/106.3.479>

- Cardena, M. M. S. G., Mansur, A. J., Pereira, A. D. C., & 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. <https://doi.org/10.3109/19401736.2012.717933>
- Cardona Maya, W., & Cadavid, Á. P. (2010). ¿Entran el axonema y las mitocondrias espermáticas en el oocito durante el proceso de la fecundación? In *Actas Urológicas Españolas* (Vol. 34, Issue 2). Ene Ediciones. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0210-48062010000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062010000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Carelli, V., Achilli, A., Valentino, M. L., Rengo, C., Semino, O., Pala, M., Olivieri, A., Mattiazi, M., Pallotti, F., Carrara, F., Zeviani, M., Leuzzi, V., Carducci, C., Valle, G., Simionati, B., Mendieta, L., Salomao, S., Belfort, R., Sadun, A. A., & Torroni, A. (2006). Haplogroup Effects and Recombination of Mitochondrial DNA: Novel Clues from the Analysis of Leber Hereditary Optic Neuropathy Pedigrees. *American Journal of Human Genetics*, *78*(4), 564. <https://doi.org/10.1086/501236>
- Castro, M. G., Huerta, C., Reguero, J. R., Soto, M. I., Doménech, E., Alvarez, V., Gómez-Zaera, M., Nunes, V., González, P., Corao, A., & Coto, E. (2006). Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, *112*(2), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.09.008>
- Cayuela, L., Gómez Enjuto, S., Olivares Martínez, B., Rodríguez-Domínguez, S., & Cayuela, A. (2021). Is the pace of decline in cardiovascular mortality decelerating in Spain? *Revista Espanola de Cardiologia (English Ed.)*, *74*(9), 750–756. <https://doi.org/10.1016/J.REC.2020.09.007>
- Chang, D. D., & Clayton, D. A. (1984). Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell*, *36*(3), 635–643. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90343-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90343-X)
- Chang, J. Chih., Kou, S. Jen., Lin, W. Ting., & Liu, C. San. (2010). Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World Journal of Cardiology*, *2*(6), 150. <https://doi.org/10.4330/WJC.V2.I6.150>
- Chang, Y. Kyung., Kim, D. Eun., Cho, S. Hyun., & Kim, J. Ha. (2016). Association between Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number and Regular Exercise in Postmenopausal Women. *Korean Journal of Family Medicine*, *37*(6), 334–339. <https://doi.org/10.4082/KJFM.2016.37.6.334>
- Chen, W., Gao, R., Liu, L., Zhu, M., Wang, W., Wang, Y., Wu, Z., Li, H., Zheng, Z., Jiang, L., & Hu, S. (2016). Outline of the report on cardiovascular diseases in China, 2014. *European Heart Journal Supplements : Journal of the European Society of Cardiology*, *18*(Suppl F), F2–F11. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/SUW030>
- Chen, Y. R., & Zweier, J. L. (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation Research*, *114*(3), 524–537. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300559>
- Cheng, M., Guo, Z., Li, H., Li, Z., Li, C., & Geng, C. (2014). Identification of sequence polymorphisms in the mitochondrial displacement loop as risk factors for sporadic and familial breast cancer. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *35*(5), 4773–4777. <https://doi.org/10.1007/S13277-014-1626-5>
- Chinnery, P. F., Elliott, H. R., Syed, A., & Rothwell, P. M. (2010). Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. *The Lancet. Neurology*, *9*(5), 498–503. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70083-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70083-1)

- Chinnery, P. F., & Gomez-Duran, A. (2018). Oldies but Goldies mtDNA Population Variants and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 12(OCT). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00682>
- Chinnery, P. F., & Turnbull, D. M. (1999). Mitochondrial DNA and disease. *Lancet*, 354(SUPPL.1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)90244-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)90244-1)
- Chinnery, P. F., Mowbray, C., Patel, S., Elson, J., Sampson, M., Hitman, G., McCarthy, M., Hattersley, A., & Walker, M. (2007). Mitochondrial DNA haplogroups and type 2 diabetes: a study of 897 cases and 1010 controls. *Journal of Medical Genetics*, 44(6). <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.048876>
- Cinza Sanjurjo, S., Prieto Díaz, M. Á., Llisterri Caro, J. L., Pallarés Carratalá, V., Barquilla García, A., Rodríguez Padial, L., Díaz Rodríguez, Á., Polo García, J., Vergara Martín, J., Vidal Pérez, R., & Rodríguez Roca, G. C. (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*, 43(7), 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2016.07.006>
- Clark, K. M., Taylor, R. W., Johnson, M. A., Chinnery, P. F., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Andrews, R. M., Nelson, I. P., Wood, N. W., Lamont, P. J., Hanna, M. G., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. (1999). An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, 64(5), 1330–1339. <https://doi.org/10.1086/302361>
- Cock, P. J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1767. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP1137>
- Coudray, C., Olivieri, A., Achilli, A., Pala, M., Melhaoui, M., Cherkaoui, M., El-chennawi, F., Kossmann, M., Torroni, A., & Dugoujon, J. M. (2009). The complex and diversified mitochondrial gene pool of Berber populations. *Annals of Human Genetics*, 73(2), 196–214. <https://doi.org/10.1111/J.1469-1809.2008.00493.X>
- Coughlin, S. S. (2011). Post-traumatic Stress Disorder and Cardiovascular Disease. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 5(1), 164–170. <https://doi.org/10.2174/1874192401105010164>
- Cui, H., Li, F., Chen, D., Wang, G., Truong, C. K., Enns, G. M., Graham, B., Milone, M., Landsverk, M. L., Wang, J., Zhang, W., & Wong, L.-J. C. (2013). Comprehensive next-generation sequence analyses of the entire mitochondrial genome reveal new insights into the molecular diagnosis of mitochondrial DNA disorders. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 15(5), 388–394. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.144>
- Dabravolski, S. A., Khotina, V. A., Sukhorukov, V. N., Kalmykov, V. A., Mikhaleva, L. M., & Orekhov, A. N. (2022). The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 952, 23(2), 952. <https://doi.org/10.3390/IJMS23020952>



- Dai, D. F., Rabinovitch, P. S., & Ungvari, Z. (2012). Mitochondria and cardiovascular aging. In *Circulation Research* (Vol. 110, Issue 8, pp. 1109–1124). Circ Res. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246140>
- Dai, X. (2016). Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World Journal of Cardiology*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.4330/wjc.v8.i1.1>
- Dainis, A. M., & Ashley, E. A. (2018). Cardiovascular Precision Medicine in the Genomics Era. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(2), 313. <https://doi.org/10.1016/J.JACBTS.2018.01.003>
- D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Lin, M. T., Mauck, W. M., Shao, L. Z., Lenaz, G., Moraes, C. T., & Manfredi, G. (2004). Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Human Molecular Genetics*, 13(24), 3171–3179. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh326>
- de Gonzalo-Calvo, D., Iglesias-Gutiérrez, E., & Llorente-Cortés, V. (2017). Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Revista Espanola de Cardiologia (English Ed.)*, 70(9), 763–769. <https://doi.org/10.1016/J.REC.2017.05.013>
- Ding, J., Sidore, C., Butler, T. J., Wing, M. K., Qian, Y., Meirelles, O., Busonero, F., Tsoi, L. C., Maschio, A., Angius, A., Kang, H. M., Nagaraja, R., Cucca, F., Abecasis, G. çR, & Schlessinger, D. (2015). Assessing Mitochondrial DNA Variation and Copy Number in Lymphocytes of ~2,000 Sardinians Using Tailored Sequencing Analysis Tools. *PLoS Genetics*, 11(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005306>
- Do, R., Stitzel, N. O., Won, H. H., Jørgensen, A. B., Duga, S., Merlini, P. A., Kiezun, A., Farrall, M., Goel, A., Zuk, O., Guella, I., Asselta, R., Lange, L. A., Peloso, G. M., Auer, P. L., Girelli, D., Martinelli, N., Farlow, D. N., DePristo, M. A., ... Kathiresan, S. (2015). Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature*, 518(7537), 102–106. <https://doi.org/10.1038/nature13917>
- Domínguez-de-la-Cruz, E., Muñoz, M. de L., Pérez-Muñoz, A., García-Hernández, N., Moctezuma-Meza, C., & Hinojosa-Cruz, J. C. (2020). Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients. *Gene*, 761. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.145047>
- Dorn, G. W. (2019). Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 81, pp. 1–17). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114358>
- Douglas, S. E. (1998). Plastid evolution: Origins, diversity, trends. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8(6), 655–661. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80033-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80033-6)
- D'Souza, A. R., & Minczuk, M. (2018). Mitochondrial transcription and translation: Overview. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 309–320. <https://doi.org/10.1042/EBC20170102>
- Duan, M., Tu, J., & Lu, Z. (2018). Recent advances in detecting mitochondrial DNA heteroplasmic variations. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 2, p. 323). <https://doi.org/10.3390/molecules23020323>
- Eaaswarkhanth, M., Melhem, M., Sharma, P., Nizam, R., al Madhoun, A., Chaubey, G., Alsmadi, O., Al-Ozairi, E., & Al-Mulla, F. (2019). Mitochondrial DNA D-loop sequencing reveals obesity variants in an Arab population. *The Application of Clinical Genetics*, 12, 63. <https://doi.org/10.2147/TACG.S198593>

- Ebner, S., Mangge, H., Langhof, H., Halle, M., Siegrist, M., Aigner, E., Paulmichl, K., Paulweber, B., Datz, C., Sperl, W., Kofler, B., & Weghuber, D. (2015). Mitochondrial haplogroup T is associated with obesity in Austrian juveniles and adults. *PLoS ONE*, *10*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135622>
- Economou, E. K., Oikonomou, E., Siasos, G., Papageorgiou, N., Tsalamandris, S., Mourouzis, K., Papaioanou, S., & Tousoulis, D. (2015). The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*, *241*(2), 624–633. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2015.06.037>
- El-Fishawy, P. (2013). Common Disease-Common Variant Hypothesis. *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders*, 719–720. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1698-3\\_1998](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1698-3_1998)
- Elorza, A. A., & Soffia, J. P. (2021). mtDNA Heteroplasmy at the Core of Aging-Associated Heart Failure. An Integrative View of OXPHOS and Mitochondrial Life Cycle in Cardiac Mitochondrial Physiology. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.625020>
- Elosua, R., Lluís, C., & Lucas, G. (2009). Estudio del componente genético de la cardiopatía isquémica: de los estudios de ligamiento al genotipado integral del genoma. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, *9*(2), 24–38. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(09\)71502-X](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(09)71502-X)
- Elson, J. L., Herrstadt, C., Preston, G., Thal, L., Morris, C. M., Edwardson, J. A., Beal, M. F., Turnbull, D. M., & Howell, N. (2006). Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease? *Human Genetics*, *119*(3), 241–254. <https://doi.org/10.1007/S00439-005-0123-8>
- Erdmann, J., Kessler, T., Muñoz Venegas, L., & Schunkert, H. (2018). A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. *Cardiovascular Research*, *114*(9), 1241–1257. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVY084>
- Falkenberg, M. (2018). Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: Overview of the pathway. *Essays in Biochemistry*, *62*(3), 287–296. <https://doi.org/10.1042/EBC20170100>
- Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2020). Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1818684>, *55*(6), 509–524. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1818684>
- Farge, G., Mehmedovic, M., Baclayon, M., vandenWildenberg, S. M. J. L., Roos, W. H., Gustafsson, C. M., Wuite, G. J. L., & Falkenberg, M. (2014). In Vitro-reconstituted nucleoids can block mitochondrial DNA replication and transcription. *Cell Reports*, *8*(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.046>
- Fernández-Caggiano, M., Barallobre-Barreiro, J., Rego-Pérez, I., Crespo-Leiro, M. G., Paniagua, M. J., Grillé, Z., Blanco, F. J., & Doménech, N. (2012). Mitochondrial haplogroups H and J: risk and protective factors for ischemic cardiomyopathy. *PLoS One*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0044128>
- Fernández-Caggiano, M., Barallobre-Barreiro, J., Rego-Pérez, I., Crespo-Leiro, M. G., Paniagua, M. J., Grille, Z., Blanco, F. J., & Doménech, N. (2013). Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion*, *13*(4), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.03.005>

- 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. *Mutation Research*, *458*(1–2), 31–39. [https://doi.org/10.1016/S1383-5726\(01\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5726(01)00012-7)
- Floros, V. I., Pyle, A., Dletmann, S., Wei, W., Tang, W. W. C., Irie, N., Payne, B., Capalbo, A., Noli, L., Coxhead, J., Hudson, G., Crosier, M., Strahl, H., Khalaf, Y., Saitou, M., Ilic, D., Surani, M. A., & Chinnery, P. F. (2018). Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. *Nature Cell Biology*, *20*(2), 144–151. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0017-8>
- Fregel, R., Cabrera, V., Larruga, J. M., Abu-Amero, K. K., & González, A. M. (2015). Carriers of Mitochondrial DNA Macrohaplogroup N Lineages Reached Australia around 50,000 Years Ago following a Northern Asian Route. *PLoS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0129839>
- Fusté, J. M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C. E., Cluett, T. J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I. J., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2010). Mitochondrial RNA Polymerase Is Needed for Activation of the Origin of Light-Strand DNA Replication. *Molecular Cell*, *37*(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.021>
- Gallego-Fabrega, C., Muiño, E., Cárcel-Márquez, J., Llucà-Carol, L., Lledós, M., Martín-Campos, J. M., Cullèll, N., & Fernández-Cadenas, I. (2022). Genome-Wide Studies in Ischaemic Stroke: Are Genetics Only Useful for Finding Genes? *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS23126840>
- Gaweł, B., Głogowska-Ligus, J., & Mazurek, U. (2008). The G16319A substitution frequency in a hemorrhagic stroke. *Annals of Indian Academy of Neurology*, *11*(3), 154–158. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.42934>
- Gazzola, K., Reeskamp, L., & van den Born, B. J. (2017). Ethnicity, lipids and cardiovascular disease. In *Current Opinion in Lipidology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 225–230). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000412>
- Ghosh, S., Vivar, J., Nelson, C. P., Willenborg, C., Segrè, A. v., Mäkinen, V. P., Nikpay, M., Erdmann, J., Blankenberg, S., O'Donnell, C., März, W., Laaksonen, R., Stewart, A. F. R., Epstein, S. E., Shah, S. H., Granger, C. B., Hazen, S. L., Kathiresan, S., Reilly, M. P., ... McPherson, R. (2015). Systems genetics analysis of genome-wide association study reveals novel associations between key biological processes and coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(7), 1712–1722. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305513>
- Gilkerson, R. W., Bravo, Liliana., Garcia, Iraselia., Gaytan, Norma., Herrera, Alan., Maldonado, Alicia., & Quintanilla, Brandi. (2013). The mitochondrial nucleoid: Integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011080>
- Gilkerson, R. W., Schon, E. A., Hernandez, E., & Davidson, M. M. (2008). Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. *Journal of Cell Biology*, *181*(7), 1117–1128. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712101>

- Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study (2019). Results. Instituto de Sanimetría y Evaluación Sanitaria, 2020 (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>).
- Goldin, E., Stahl, S., Cooney, A. M., Kaneski, C. R., Gupta, S., Brady, R. O., Ellis, J. R., & Schiffmann, R. (2004). Transfer of a mitochondrial DNA fragment to MCOLN1 causes an inherited case of mucopolipidosis IV. *Human Mutation*, 24(6), 460–465. <https://doi.org/10.1002/humu.20094>
- Golubenko, M. v., Nazarenko, M. S., Frolov, A. v., Sleptsov, A. A., Markov, A. v., Glushkova, M. E., Barbarash, O. L., & Puzyrev, V. P. (2016). Analysis of heteroplasmy in the major noncoding region of mitochondrial DNA in the blood and atherosclerotic plaques of carotid arteries. *Russian Journal of Genetics*, 52(4), 436–440. <https://doi.org/10.1134/S1022795416040049>
- Gómez-Durán, A., Pacheu-Grau, D., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., López-Pérez, M. J., & Ruiz-Pesini, E. (2010). Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Human Molecular Genetics*, 19(17), 3343–3353. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq246>
- González, A. M., MacEira, B. M., Pérez, E., Cabrera, V. M., López, A. J., & Larruga, J. M. (2012). Genetics, environment, and diabetes-related end-stage renal disease in the Canary Islands. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(8), 859–864. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0207>
- González, M. (2019). Tesis Doctoral: Análisis de la variabilidad del DNA mitocondrial mediante la secuenciación masiva: aplicación al estudio del glioma.
- Govindaraj, P., Khan, N. A., Rani, B., Rani, D. S., Selvaraj, P., Jyothi, V., Bahl, A., Narasimhan, C., Rakshak, D., Premkumar, K., Khullar, M., & Thangaraj, K. (2014). Mitochondrial DNA variations associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Mitochondrion*, 16, 65–72. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2013.10.006>
- Gray, M. W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends in Genetics*, 5(C), 294–299. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90111-X](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90111-X)
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN188>
- Guo, Y., Li, J., Li, C. I., Shyr, Y., & Samuels, D. C. (2013). MitoSeek: extracting mitochondria information and performing high-throughput mitochondria sequencing analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(9), 1210–1211. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT118>
- Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., & Popov, V. N. (2019). Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: Interaction between the Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  signaling pathways. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10, Issue May). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00435>
- Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, N. G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 133–160. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014402>
- Guyatt, A. L., Burrows, K., Guthrie, P. A. I., Ring, S., McArdle, W., Day, I. N. M., Ascione, R., Lawlor, D. A., Gaunt, T. R., & Rodriguez, S. (2018). Cardiometabolic phenotypes and mitochondrial DNA

- copy number in two cohorts of UK women. *Mitochondrion*, 39, 9.  
<https://doi.org/10.1016/J.MITO.2017.08.007>
- Habib, S. H., & Saha, S. (2010). Burden of non-communicable disease: Global overview. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 4(1), 41–47.  
<https://doi.org/10.1016/J.DSX.2008.04.005>
- Hagelberg, E. (2003). Recombination or mutation rate heterogeneity? Implications for mitochondrial eve. *Trends in Genetics*, 19(2), 84–90. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00048-3)
- Hagen, C. M., Aidt, F. H., Hedley, P. L., Jensen, M. K., Havndrup, O., Kanters, J. K., Moolman-Smook, J. C., Larsen, S. O., Bundgaard, H., & Christiansen, M. (2013). Mitochondrial Haplogroups Modify the Risk of Developing Hypertrophic Cardiomyopathy in a Danish Population. *PLoS ONE*, 8(8), 71904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071904>
- Hefti, E., Bard, J., & Blanco, J. G. (2017). Analysis of Heteroplasmic Variants in the Cardiac Mitochondrial Genome of Individuals with Down Syndrome. *Human Mutation*, 38(1), 48.  
<https://doi.org/10.1002/HUMU.23071>
- Heidari, M. M., Derakhshani, M., Sedighi, F., & Foruzan-Nia, S. K. (2017). Mutation Analysis of the Mitochondrial tRNA Genes in Iranian Coronary Atherosclerosis Patients. *Iranian Journal of Public Health*, 46(10), 1379. [/pmc/articles/PMC5750350/](https://doi.org/10.1007/S12010-020-03275-0)
- Heidari, M. M., Mirfakhradini, F. S., Tayefi, F., Ghorbani, S., Khatami, M., & Hadadzadeh, M. (2020). Novel Point Mutations in Mitochondrial MT-CO2 Gene May Be Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(3), 1326–1339.  
<https://doi.org/10.1007/S12010-020-03275-0>
- Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Magnusson, K. P., Grétarsdóttir, S., Steinthorsdóttir, V., Manolescu, A., Jones, G. T., Rinkel, G. J. E., Blankensteijn, J. D., Ronkainen, A., Jäskeläinen, J. E., Kyo, Y., Lenk, G. M., Sakalihasan, N., Kostulas, K., Gottsäter, A., Flex, A., Stefansson, H., Hansen, T., ... Stefansson, K. (2008). The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nature Genetics*, 40(2), 217–224. <https://doi.org/10.1038/ng.72>
- Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Gretarsdottir, S., Blondal, T., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Baker, A., Palsson, A., Masson, G., Gudbjartsson, D. F., Magnusson, K. P., Andersen, K., Levey, A. I., Backman, V. M., Matthiasdottir, S., Jonsdottir, T., Palsson, S., ... Stefansson, K. (2007). A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*, 316(5830), 1491–1493.  
<https://doi.org/10.1126/science.1142842>
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J. M., & Spelbrink, J. N. (2014). To be or not to be a nucleoid protein: A comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie*, 100(1), 219–226.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.017>
- Herrnstadt, C., & Howell, N. (2004). An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders. *Mitochondrion*, 4(5–6), 791–798.  
<https://doi.org/10.1016/J.MITO.2004.07.041>

- Holt, I. J., & Jacobs, H. T. (2014). Unique features of DNA replication in mitochondria: A functional and evolutionary perspective. *BioEssays*, *36*(11), 1024–1031. <https://doi.org/10.1002/bies.201400052>
- Holt, I. J., Lorimer, H. E., & Jacobs, H. T. (2000). Coupled Leading-and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA eubacteria. Replication of the H strand on this model is proposed to initiate at a single site (O H ), and to proceed unidirectionally until two-thirds of the way around the These. *Cell*, *100*, 515–524.
- Hong, X. yu, Lin, J., & Gu, W. wei. (2019). Risk factors and therapies in vascular diseases: An umbrella review of updated systematic reviews and meta-analyses. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 6, pp. 8221–8232). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.27633>
- Hopkin, K. (1999). Death to sperm mitochondria. *Scientific American*, *280*(3), 21. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0399-21a>
- Howell, N., Kubacka, I., Xu, M., & McCullough, D. A. (1991). Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial ND1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *American Journal of Human Genetics*, *48*(5), 935. [/pmc/articles/PMC1683051/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1683051/)
- Howell, N., & Smejkal, C. B. (2000). Persistent heteroplasmy of a mutation in the human mtDNA control region: hypermutation as an apparent consequence of simple-repeat expansion/contraction. *American Journal of Human Genetics*, *66*(5), 1589–1598. <https://doi.org/10.1086/302910>
- Howson, J. M. M., Zhao, W., Barnes, D. R., Ho, W. K., Young, R., Paul, D. S., Waite, L. L., Freitag, D. F., Fauman, E. B., Salfati, E. L., Sun, B. B., Eicher, J. D., Johnson, A. D., Sheu, W. H. H., Nielsen, S. F., Lin, W. Y., Surendran, P., Malarstig, A., Wilk, J. B., ... Saleheen, D. (2017). Fifteen new risk loci for coronary artery disease highlight arterial-wall-specific mechanisms. *Nature Genetics*, *49*(7), 1113–1119. <https://doi.org/10.1038/ng.3874>
- 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 Genetics*, *10*(5), e1004369. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004369>
- Humphries, S. E., Drenos, F., Ken-Dror, G., & Talmud, P. J. (2010). Coronary heart disease risk prediction in the era of genome-wide association studies current status and what the future holds. In *Circulation* (Vol. 121, Issue 20, pp. 2235–2248). Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.914192>
- Ikeda, M., Ide, T., Fujino, T., Arai, S., Saku, K., Kakino, T., Tynismaa, H., Yamasaki, T., Yamada, K. I., Kang, D., Suomalainen, A., & Sunagawa, K. (2015). Overexpression of TFAM or Twinkle Increases mtDNA Copy Number and Facilitates Cardioprotection Associated with Limited Mitochondrial Oxidative Stress. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0119687>
- Ingman, M., & Gyllensten, U. (2007). A recent genetic link between Sami and the Volga-Ural region of Russia. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *15*(1), 115–120. <https://doi.org/10.1038/SJ.EJHG.5201712>
- Jemt, E., Persson, Ö., Shi, Y., Mehmedovic, M., Uhler, J. P., López, M. D., Freyer, C., Gustafsson, C. M., Samuelsson, T., & Falkenberg, M. (2015). Regulation of DNA replication at the end of the

- mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE and a conserved sequence element. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9262–9275. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv804>
- Jeng, J. Y., Yeh, T. S., Lee, J. W., Lin, S. H., Fong, T. H., & Hsieh, R. H. (2008). Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(2), 347–357. <https://doi.org/10.1002/JCB.21625>
- Jia, Q., Xu, L., Shen, J., Wei, Y., Xu, H., Shi, J., Jia, Z., Zhao, X., Liu, C., Zhong, Q., Tian, Y., & He, K. (2020). Detecting Rare Variants and Heteroplasmy of Mitochondrial DNA from High-Throughput Sequencing in Patients with Coronary Artery Disease. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e925401-1. <https://doi.org/10.12659/MSM.925401>
- Jones, M. B., Highlander, S. K., Anderson, E. L., Li, W., Dayrit, M., Klitgord, N., Fabani, M. M., Seguritan, V., Green, J., Pride, D. T., Yooseph, S., Biggs, W., Nelson, K. E., & Craig Venter, J. (2015). Library preparation methodology can influence genomic and functional predictions in human microbiome research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(45), 14024–14029. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1519288112/SUPPL\\_FILE/PNAS.1519288112.SD01.XLSX](https://doi.org/10.1073/PNAS.1519288112/SUPPL_FILE/PNAS.1519288112.SD01.XLSX)
- Jordan, J., Kurschat, C., & Reuter, H. (2018). Arterial Hypertension: Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 115(33–34), 557. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2018.0557>
- Juárez-Rojas, J. G., Posadas-Romero, C., Martínez-Alvarado, R., Jorge-Galarza, E., Reyes-Barrera, J., Sánchez-Lozada, L. G., Torres-Tamayo, M., & Medina-Urrutia, A. X. (2018). Type 2 diabetes mellitus is associated with carotid artery plaques in patients with premature coronary heart disease. *Revista de Investigacion Clinica*, 70(6), 301–309. <https://doi.org/10.24875/RIC.18002591>
- Just, R. S., Irwin, J. A., & Parson, W. (2015). Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Science International. Genetics*, 18, 131–139. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2015.05.003>
- Kaneda, H., Hayashi, J. I., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K. F., & Yonekawa, H. (1995). Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4542–4546. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4542>
- Kanzi, A. M., San, J. E., Chimukangara, B., Wilkinson, E., Fish, M., Ramsuran, V., & de Oliveira, T. (2020). Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Frontiers in Genetics*, 11, 1250. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.544162/BIBTEX>
- Kaul, P., McAlister, F. A., Ezekowitz, J. A., Grover, V. K., & Quan, H. (2011). Ethnic differences in 1-year mortality among patients hospitalised with heart failure. *Heart*, 97(13), 1048–1053. <https://doi.org/10.1136/hrt.2010.217869>
- Kazdal, D., Harms, A., Endris, V., Penzel, R., Kriegsmann, M., Eichhorn, F., Muley, T., Stenzinger, A., Pfarr, N., Weichert, W., & Warth, A. (2017). Prevalence of somatic mitochondrial mutations and spatial distribution of mitochondria in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2017 117:2, 117(2), 220–226. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.155>

- Kessler, T., & Schunkert, H. (2021). Coronary Artery Disease Genetics Enlightened by Genome-Wide Association Studies. *JACC. Basic to Translational Science*, 6(7), 610–623. <https://doi.org/10.1016/J.JACBTS.2021.04.001>
- Kessler, T., & Schunkert, H. (2022). Genomic Strategies Toward Identification of Novel Therapeutic Targets. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 270, 429–462. [https://doi.org/10.1007/164\\_2020\\_360](https://doi.org/10.1007/164_2020_360)
- Khan, S. S., Ning, H., Wilkins, J. T., Allen, N., Carnethon, M., Berry, J. D., Sweis, R. N., & Lloyd-Jones, D. M. (2018). Association of body mass index with lifetime risk of cardiovascular disease and compression of morbidity. *JAMA Cardiology*, 3(4), 280–287. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.0022>
- Khera, A. v., & Kathiresan, S. (2017). Genetics of coronary artery disease: Discovery, biology and clinical translation. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 18, Issue 6, pp. 331–344). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.160>
- Kietzmann, T., Petry, A., Shvetsova, A., Gerhold, J. M., & Görlach, A. (2017). The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1533. <https://doi.org/10.1111/BPH.13792>
- Kivisild, T. (2015). Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investigative Genetics*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/S13323-015-0022-2>
- Kofler, B., Mueller, E. E., Eder, W., Stanger, O., Maier, R., Weger, M., Haas, A., Winker, R., Schmut, O., Paulweber, B., Iglseder, B., Renner, W., Wiesbauer, M., Aigner, I., Santic, D., Zimmermann, F. A., Mayr, J. A., & Sperl, W. (2009). Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Medical Genetics*, 10, 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-35>
- Kopin, L., & Lowenstein, C. (2017). In the Clinic® dyslipidemia. *Annals of Internal Medicine*, 167(11), ITC81–ITC95. <https://doi.org/10.7326/AITC201712050>
- Koripella, R. K., Sharma, M. R., Haque, M. E., Risteff, P., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2019). Structure of Human Mitochondrial Translation Initiation Factor 3 Bound to the Small Ribosomal Subunit. *iScience*, 12, 76–86. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2018.12.030>
- Kozarewa, I., Ning, Z., Quail, M. A., Sanders, M. J., Berriman, M., & Turner, D. J. (2009). Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nature Methods* 2009 6:4, 6(4), 291–295. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1311>
- Krzywanski, D. M., Moellering, D. R., Westbrook, D. G., Dunham-Snary, K. J., Brown, J., Bray, A. W., Feeley, K. P., Sammy, M. J., Smith, M. R., Schurr, T. G., Vita, J. A., Ambalavanan, N., Calhoun, D., Dell’Italia, L., & Ballinger, S. W. (2016). Endothelial Cell Bioenergetics and Mitochondrial DNA Damage Differ in Humans Having African or West Eurasian Maternal Ancestry. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 9(1), 26–36. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.115.001308>
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spähr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., & Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13534–13539. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109263108>



- Kytövuori, L., Junntila, J., Huikuri, H., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Majamaa, K., & Martikainen, M. H. (2020). Mitochondrial DNA variation in sudden cardiac death: a population-based study. *International Journal of Legal Medicine*, *134*(1), 39. <https://doi.org/10.1007/S00414-019-02091-4>
- Lacey, B., Herrington, W. G., Preiss, D., Lewington, S., & Armitage, J. (2017). The Role of Emerging Risk Factors in Cardiovascular Outcomes. In *Current Atherosclerosis Reports* (Vol. 19, Issue 6). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0661-2>
- Laggerbauer, B., & Engelhardt, S. (2022). MicroRNAs as therapeutic targets in cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *132*(11). <https://doi.org/10.1172/JCI159179>
- Landsverk, M., Wang, J., Boué, D., Sahenk, Z., Schmitt, E., & Wong, L.-J. (2011). A novel mitochondrial tRNA lysine variant, m.8358A>G, associated with exercise intolerance, muscle weakness, and fatigue. *Mitochondrion*, *11*(4), 663. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2011.03.083>
- Lane, N. (2017). Serial endosymbiosis or singular event at the origin of eukaryotes? *Journal of Theoretical Biology*, *434*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.04.031>
- Lee, S. R., & Han, J. (2017). Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/8060949>
- Lehtonen, M. S., Moilanen, J. S., & Majamaa, K. (2003). Increased variation in mtDNA in patients with familial sensorineural hearing impairment. *Human Genetics*, *113*(3), 220–227. <https://doi.org/10.1007/S00439-003-0966-9>
- Lei, L., Guo, J., Shi, X., Zhang, G., Kang, H., Sun, C., Huang, J., & Wang, T. (2017). Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cell and hypertension risk among mining workers: a case-control study in Chinese coal miners. *Journal of Human Hypertension*, *31*(9), 585–590. <https://doi.org/10.1038/JHH.2017.30>
- Levitsky, S., Laurikka, J., Stewart, R. D., Campos, C. T., Lahey, S. J., & McCully, J. D. (2003). Mitochondrial DNA deletions in coronary artery bypass grafting patients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, *24*(5), 777–784. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(03\)00501-3](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(03)00501-3)
- Liesa, M., Palacín, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. In *Physiological Reviews* (Vol. 89, Issue 3, pp. 799–845). *Physiol Rev*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>
- Lind, L., Sundström, J., Ärnlov, J., & Lampa, E. (2018). Impact of aging on the strength of cardiovascular risk factors: A longitudinal study over 40 years. *Journal of the American Heart Association*, *7*(1). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007061>
- Liou, C. Wei., Lin, T. Kung., Huang, F. Mei., Chen, T. Ling., Lee, C. Feng., Chuang, Y. Chung., Tan, T. Yeow., Chang, K. Chou., & Wei, Y. Huei. (2004). Association of the Mitochondrial DNA 16189 T to C Variant with Lacunar Cerebral Infarction. In *Mitochondrial Pathogenesis* (Vol. 1011, pp. 317–324). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2_31)
- Litonin, D., Sologub, M., Shi, Y., Savkina, M., Anikin, M., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M., & Temiakov, D. (2010). Human mitochondrial transcription revisited: Only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(24), 18129–18133. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.128918>

- Liu, E., Kaidonis, G., Gillies, M. C., Abhary, S., Essex, R. W., Chang, J. H., Pal, B., Daniell, M., Lake, S., Gilhotra, J., Petrovsky, N., Hewitt, A. W., Jenkins, A., Lamoureux, E. L., Gleadle, J. M., Burdon, K. P., & Craig, J. E. (2019). Mitochondrial haplogroups are not associated with diabetic retinopathy in a large Australian and British Caucasian sample. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-37388-8>
- Lopez, J. v., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W., & O'Brien, S. J. (1994). Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*, *39*(2), 174–190. <https://doi.org/10.1007/BF00163806>
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(5), 659–667. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>
- Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Michael Xie, H., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., & Wallace, D. C. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics*, *44*(123). <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI0123S44>
- Luan, Y., Yang, D., Zhang, Z., Bie, X., Zhao, H., Wang, Y., Liu, Y., Yang, S., Zhou, B., Xu, Y., Zheng, H., & He, Y. (2021). Association Study Between Genetic Variation in Whole Mitochondrial Genome and Ischemic Stroke. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, *71*(10), 2152–2162. <https://doi.org/10.1007/S12031-020-01778-3>
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S. M., Chien, Y. H., Hwu, W. L., Fan, P. C., Wong, L. J., Atwal, P. S., & Huang, T. (2018). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(51), 13039–13044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>
- Lutz-Bonengel, S., & Parson, W. (2019). No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 116, Issue 6, pp. 1821–1822). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820533116>
- MacArthur, J., Bowler, E., Cerezo, M., Gil, L., Hall, P., Hastings, E., Junkins, H., McMahon, A., Milano, A., Morales, J., MayPendlington, Z., Welter, D., Burdett, T., Hindorff, L., Flicek, P., Cunningham, F., & Parkinson, H. (2017). The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D896–D901. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1133>
- Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., Vega, E., Cruciani, F., Guida, V., Scozzari, R., Bonn -Tamir, B., Sykes, B., & Torroni, A. (1999). The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *American Journal of Human Genetics*, *64*(1), 232. <https://doi.org/10.1086/302204>
- Maier, P. A., Runfeldt, G., Estes, R. J., & Vilar, M. G. (2022). African mitochondrial haplogroup L7: a 100,000-year-old maternal human lineage discovered through reassessment and new sequencing. *Scientific Reports*, *12*(1), 10747. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-13856-0>
- Majamaa, K., Finnilä, S., Turkka, J., & Hassinen, I. E. (1998). Mitochondrial DNA haplogroup U as a risk factor for occipital stroke in migraine. *Lancet (London, England)*, *352*(9126), 455–456. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79190-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79190-X)

- Marine, R., Polson, S. W., Ravel, J., Hatfull, G., Russell, D., Sullivan, M., Syed, F., Dumas, M., & Wommack, K. E. (2011). Evaluation of a Transposase Protocol for Rapid Generation of Shotgun High-Throughput Sequencing Libraries from Nanogram Quantities of DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8071. <https://doi.org/10.1128/AEM.05610-11>
- Marrero, P., Abu-Amero, K. K., Larruga, J. M., & Cabrera, V. M. (2016). Carriers of human mitochondrial DNA macrohaplogroup M colonized India from southeastern Asia. *BMC Evolutionary Biology* 2016 16:1, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12862-016-0816-8>
- Martikainen, M. H., & Majamaa, K. (2010). Epidemiology and characteristics of occipital brain infarcts in young adults in southwestern Finland. *Journal of Neurology*, 257(2), 259–263. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5305-1>
- Martínez-Redondo, D., Marcuello, A., Casajús, J. A., Ara, I., Dahmani, Y., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., López-Pérez, M. J., & Díez-Sánchez, C. (2010). Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO<sub>2</sub>max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion*, 10(2), 102–107. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2009.11.005>
- Masuike, Y., Tanaka, K., Makino, T., Yamasaki, M., Miyazaki, Y., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Nakajima, K., Mori, M., & Doki, Y. (2018). Esophageal squamous cell carcinoma with low mitochondrial copy number has mesenchymal and stem-like characteristics, and contributes to poor prognosis. *PLoS One*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0193159>
- McBride, H. M. (2018). Mitochondria and endomembrane origins. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. R367–R372). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.052>
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. In *Current Biology* (Vol. 16, Issue 14). Curr Biol. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>
- McPherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., Stewart, A., Roberts, R., Cox, D. R., Hinds, D. A., Pennacchio, L. A., Tybjaerg-Hansen, A., Folsom, A. R., Boerwinkle, E., Hobbs, H. H., & Cohen, J. C. (2007). A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*, 316(5830), 1488–1491. <https://doi.org/10.1126/science.1142447>
- Meeks, K. A. C., Freitas-Da-Silva, D., Adeyemo, A., Beune, E. J. A. J., Modesti, P. A., Stronks, K., Zafarmand, M. H., & Agyemang, C. (2016). Disparities in type 2 diabetes prevalence among ethnic minority groups resident in Europe: a systematic review and meta-analysis. In *Internal and Emergency Medicine* (Vol. 11, Issue 3, pp. 327–340). Springer-Verlag Italia s.r.l. <https://doi.org/10.1007/s11739-015-1302-9>
- Melvin, R. G., & Ballard, J. W. O. (2017). Cellular and population level processes influence the rate, accumulation and observed frequency of inherited and somatic mtDNA mutations. In *Mutagenesis* (Vol. 32, Issue 3, pp. 323–334). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex004>
- Mikkelsen, M., Rockenbauer, E., Wächter, A., Fendt, L., Zimmermann, B., Parson, W., Nielsen, S. A., Gilbert, T., Willerslev, E., & Morling, N. (2009). Application of full mitochondrial genome sequencing using 454 GS FLX pyrosequencing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 518–519. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGSS.2009.09.028>
- Minczuk, M., He, J., Duch, A. M., Ettema, T. J., Chlebowski, A., Dzionek, K., Nijtmans, L. G. J., Huynen, M. A., & Holt, I. J. (2011). TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Research*, 39(10), 4284–4299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1224>

- Mishra, A., Malik, R., Hachiya, T., Jürgenson, T., Namba, S., Posner, D. C., Kamanu, F. K., Koido, M., le Grand, Q., Shi, M., He, Y., Georgakis, M. K., Caro, I., Krebs, K., Liaw, Y.-C., Vaura, F. C., Lin, K., Winsvold, B. S., Srinivasasainagendra, V., ... Consortium, T. M. (2022). Stroke genetics informs drug discovery and risk prediction across ancestries. *Nature*, *611*(7934), 115–123. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05165-3>
- Mitchell, S. L., Neiningner, A. C., Bruce, C. N., Chocron, I. M., Bregman, J. A., Estopinal, C. B., Muhammad, A., Umfress, A. C., Jarrell, K. L., Warden, C., Harlow, P. A., Wellons, M., Samuels, D. C., & Brantley, M. A. (2017). Mitochondrial haplogroups modify the effect of diabetes duration and HbA1c on proliferative diabetic retinopathy risk in patients with type 2 diabetes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *58*(14), 6481–6488. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22804>
- Mitrofanov, K. Y., Zhelankin, A. v., Shiganova, G. M., Sazonova, M. A., Bobryshev, Y. v., Postnov, A. Y., Igor, I. A., & Orekhov, A. N. (2016). Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmic mutations A1555G, C3256T, T3336C, s5178A, G12315A, G13513A, G14459A, G14846A and G15059A in CHD patients with the history of myocardial infarction. *Experimental and Molecular Pathology*, *100*(1), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.12.003>
- Mohlke, K. L., Jackson, A. U., Scott, L. J., Peck, E. C., Suh, Y. D., Chines, P. S., Watanabe, R. M., Buchanan, T. A., Conneely, K. N., Erdos, M. R., Narisu, N., Enloe, S., Valle, T. T., Tuomilehto, J., Bergman, R. N., Boehnke, M., & Collins, F. S. (2005). Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Human Genetics*, *118*(2), 245–254. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-0046-4>
- Montiel-Sosa, F., Ruiz-Pesini, E., Enríquez, J. A., Marcuello, A., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., Wallace, D. C., & López-Pérez, M. J. (2006). Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene*, *368*(1–2), 21–27. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2005.09.015>
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., & Attardi, G. (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(23 I), 7195–7199. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.23.7195>
- Moreno-Loshuertos, R., & Fernández-Silva, P. (2021). Tissue specificity of energy metabolism in mitochondria. *Clinical Bioenergetics: From Pathophysiology to Clinical Translation*, 3–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819621-2.00001-2>
- Movassaghi, S., Jafari, S., Falahati, K., Ataei, M., Sanati, M. H., & Jadali, Z. (2020). Quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood of patients with systemic sclerosis by a qPCR-based assay. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *95*(3), 314–319. <https://doi.org/10.1016/J.ABD.2019.11.003>
- Mueller, E. E., Eder, W., Ebner, S., Schwaiger, E., Santic, D., Kreindl, T., Stanger, O., Paulweber, B., Iglseder, B., Oberkofler, H., Maier, R., Mayr, J. A., Krempler, F., Weitgasser, R., Patsch, W., Sperl, W., & Kofler, B. (2011). The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations. *PLoS ONE*, *6*(1), e16455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016455>
- Nadar, S., & Lip, G. (2015). *Hypertension / edited by Sunil Nadar, Gregory YH Lip*. (Second edition.). Oxford University Press.

- Nardelli, C., Labruna, G., Liguori, R., Mazzaccara, C., Ferrigno, M., Capobianco, V., Pezzuti, M., Castaldo, G., Farinaro, E., Contaldo, F., Buono, P., Sacchetti, L., & Pasanisi, F. (2013). Haplogroup T is an obesity risk factor: Mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/631082>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). ClinVar; (accedido Nov. 21, 2022). [VCV000522716.4], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000522716.4>
- Nelson, C. P., Goel, A., Butterworth, A. S., Kanoni, S., Webb, T. R., Marouli, E., Zeng, L., Ntalla, I., Lai, F. Y., Hopewell, J. C., Giannakopoulou, O., Jiang, T., Hamby, S. E., di Angelantonio, E., Assimes, T. L., Bottinger, E. P., Chambers, J. C., Clarke, R., Palmer, C. N. A., ... Deloukas, P. (2017). Association analyses based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. *Nature Genetics*, 49(9), 1385–1391. <https://doi.org/10.1038/ng.3913>
- Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2014). In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental Gerontology*, 56, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.027>
- Nicoll, R., Zhao, Y., Ibrahim, P., Olivecrona, G., & Henein, M. (2016). Diabetes and hypertension consistently predict the presence and extent of coronary artery calcification in symptomatic patients: A systematic review and meta-analysis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17091481>
- Nishigaki, Y., Yamada, Y., Fuku, N., Matsuo, H., Segawa, T., Watanabe, S., Kato, K., Yokoi, K., Yamaguchi, S., Nozawa, Y., & Tanaka, M. (2007a). Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. *Human Genetics*, 120(6), 827–836. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0269-z>
- Nishigaki, Y., Yamada, Y., Fuku, N., Matsuo, H., Segawa, T., Watanabe, S., Kato, K., Yokoi, K., Yamaguchi, S., Nozawa, Y., & Tanaka, M. (2007b). Mitochondrial haplogroup A is a genetic risk factor for atherothrombotic cerebral infarction in Japanese females. *Mitochondrion*, 7(1–2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.002>
- Nyberg, P., Memon, A. A., Sundquist, J., Sundquist, K., & Zöller, B. (2021). Mitochondria-DNA copy-number and incident venous thromboembolism among middle-aged women: a population-based cohort study. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 52(1), 148. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02446-y>
- O'Brien, K. M. (2011). Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes. *Journal of Experimental Biology*, 214(2), 275–285. <https://doi.org/10.1242/jeb.046854>
- Öğütlü, H., Esin, İ. S., Erdem, H. B., Tatar, A., & Dursun, O. B. (2020). Mitochondrial DNA Copy Number is Associated with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatria Danubina*, 32(2), 168–175. <https://doi.org/10.24869/PSYD.2020.168>
- Otten, A. B. C., Kamps, R., Lindsey, P., Gerards, M., Pendeville-Samain, H., Muller, M., van Tienen, F. H. J., & Smeets, H. J. M. (2020). Tfam Knockdown Results in Reduction of mtDNA Copy Number, OXPHOS Deficiency and Abnormalities in Zebrafish Embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00381>
- Owolabi, M., Sarfo, F., Howard, V. J., Irvin, M. R., Gebregziabher, M., Akinyemi, R., Bennett, A., Armstrong, K., Tiwari, H. K., Akpalu, A., Wahab, K. W., Owolabi, L., Fawale, B., Komolafe, M., Obiako, R., Adebayo, P., Manly, J. M., Ogbole, G., Melikam, E., ... Howard, G. (2017). Stroke in

- Indigenous Africans, African Americans, and European Americans: Interplay of Racial and Geographic Factors. *Stroke*, 48(5), 1169–1175.  
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015937>
- Palacín, M., Alvarez, V., Martín, M., Díaz, M., Corao, A. I., Alonso, B., Díaz-Molina, B., Lozano, I., Avanzas, P., Morís, C., Reguero, J. R., Rodríguez, I., López-Larrea, C., Cannata-Andía, J., Batalla, A., Ruiz-Ortega, M., Martínez-Cambor, P., & Coto, E. (2011). Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion*, 11(1), 176–181. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2010.09.004>
- Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2015). Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 22, Issue 9, pp. 1399–1401). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.86>
- Pastukh, V. M., Gorodnya, O. M., Gillespie, M. N., & Ruchko, M. v. (2016). Regulation of mitochondrial genome replication by hypoxia: The role of DNA oxidation in D-loop region. *Free Radical Biology and Medicine*, 96, 78–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.011>
- Pejaver, V., Urresti, J., Lugo-Martinez, J., Pagel, K. A., Lin, G. N., Nam, H. J., Mort, M., Cooper, D. N., Sebat, J., Iakoucheva, L. M., Mooney, S. D., & Radivojac, P. (2020). Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nature Communications*, 11(1).  
<https://doi.org/10.1038/S41467-020-19669-X>
- Pereira, L., Soares, P., Radivojac, P., Li, B., & Samuels, D. C. (2011). Comparing phylogeny and the predicted pathogenicity of protein variations reveals equal purifying selection across the global human mtDNA diversity. *American Journal of Human Genetics*, 88(4), 433–439.  
<https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2011.03.006>
- Pérez-Amado, C. J., Tovar, H., Gómez-Romero, L., Beltrán-Anaya, F. O., Bautista-Piña, V., Dominguez-Reyes, C., Villegas-Carlos, F., Tenorio-Torres, A., Alfaro-Ruíz, L. A., Hidalgo-Miranda, A., & Jiménez-Morales, S. (2020). Mitochondrial DNA Mutation Analysis in Breast Cancer: Shifting From Germline Heteroplasmy Toward Homoplasmy in Tumors. *Frontiers in Oncology*, 10, 2208.  
<https://doi.org/10.3389/FONC.2020.572954/BIBTEX>
- Perini, W., Snijder, M. B., Peters, R. J. G., & Kunst, A. E. (2018). Ethnic disparities in estimated cardiovascular disease risk in Amsterdam, the Netherlands. *Netherlands Heart Journal*, 26(5), 252–262. <https://doi.org/10.1007/s12471-018-1107-3>
- Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 4, pp. R170–R185). Cell Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>
- Pienaar, I. S., Howell, N., & Elson, J. L. (2017). MutPred mutational load analysis shows mildly deleterious mitochondrial DNA variants are not more prevalent in Alzheimer’s patients, but may be under-represented in healthy older individuals. *Mitochondrion*, 34, 141–146.  
<https://doi.org/10.1016/J.MITO.2017.04.002>
- Piotrowska-Nowak, A., Elson, J. L., Sobczyk-Kopciol, A., Piwonska, A., Puch-Walczak, A., Drygas, W., Ploski, R., Bartnik, E., & Tonska, K. (2019a). New mtDNA Association Model, MutPred Variant Load, Suggests Individuals With Multiple Mildly Deleterious mtDNA Variants Are More Likely to

- Suffer From Atherosclerosis. *Frontiers in Genetics*, 9(JAN).  
<https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00702>
- Piotrowska-Nowak, A., Kosior-Jarecka, E., Schab, A., Wrobel-Dudzinska, D., Bartnik, E., Zarnowski, T., & Tonska, K. (2019b). Investigation of whole mitochondrial genome variation in normal tension glaucoma. *Experimental Eye Research*, 178, 186–197.  
<https://doi.org/10.1016/J.EXER.2018.10.004>
- Podlesniy, P., Puigròs, M., Serra, N., Fernández-Santiago, R., Ezquerra, M., Tolosa, E., & Trullas, R. (2019). Accumulation of mitochondrial 7S DNA in idiopathic and LRRK2 associated Parkinson's disease. *EBioMedicine*, 48, 554. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.09.015>
- Posse, V., & Gustafsson, C. M. (2017). Human mitochondrial transcription factor B2 is required for promoter melting during initiation of transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 292(7), 2637–2645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751008>
- Posse, V., Shahzad, S., Falkenberg, M., Hällberg, B. M., & Gustafsson, C. M. (2015). TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro. *Nucleic Acids Research*, 43(5), 2615–2624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv105>
- Poulton, J., Luan, J. N. A., 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. *Human Molecular Genetics*, 11(13), 1581–1583.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/11.13.1581>
- Prasher, D., Greenway, S. C., & Singh, R. B. (2020). The impact of epigenetics on cardiovascular disease. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 98(1), 12–22.  
<https://doi.org/10.1139/BCB-2019-0045>
- Pua, H. H., Guo, J., Komatsu, M., & He, Y.-W. (2009). Autophagy Is Essential for Mitochondrial Clearance in Mature T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 182(7), 4046–4055.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801143>
- Qin, Y., Xue, L., Jiang, P., Xu, M., He, Y., Shi, S., Huang, Y., He, J., Mo, J. Q., & Guan, M. X. (2014). Mitochondrial tRNA variants in Chinese subjects with coronary heart disease. *Journal of the American Heart Association*, 3(1). <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000437>
- Ramos, A., Barbena, E., Mateiu, L., del Mar González, M., Mairal, Q., Lima, M., Montiel, R., Aluja, M. P., & Santos, C. (2011). Nuclear insertions of mitochondrial origin: Database updating and usefulness in cancer studies. *Mitochondrion*, 11(6), 946–953.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.08.009>
- Ramos, A., Santos, C., Alvarez, L., Noguès, R., & Aluja, M. P. (2009). Human mitochondrial DNA complete amplification and sequencing: A new validated primer set that prevents nuclear DNA sequences of mitochondrial origin co-amplification. *Electrophoresis*, 30(9), 1587–1593.  
<https://doi.org/10.1002/elps.200800601>
- Ramos, A., Santos, C., Mateiu, L., Gonzalez, M. del M., Alvarez, L., Azevedo, L., Amorim, A., & Aluja, M. P. (2013). Frequency and Pattern of Heteroplasmy in the Complete Human Mitochondrial Genome. *PLoS ONE*, 8(10), 19–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074636>
- Rea, I. M., McNerlan, S. E., Archbold, G. P., Middleton, D., Curran, M. D., Young, I. S., & Ross, O. A. (2013). Mitochondrial J haplogroup is associated with lower blood pressure and anti-oxidant

- status: Findings in octononagenarians from the BELFAST Study. *Age*, 35(4), 1445–1456.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-012-9444-4>
- Restrepo, N. A., Mitchell, S. L., Goodloe, R. J., Murdock, D. G., Haines, J. L., & Crawford, D. C. (2015). Mitochondrial variation and the risk of age-related macular degeneration across diverse populations. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 243–254.  
[https://doi.org/10.1142/9789814644730\\_0024](https://doi.org/10.1142/9789814644730_0024)
- Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), 6465–6467. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y. I., Litonin, D., Cramer, P., & Temiakov, D. (2011). Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature*, 478(7368), 269–273.  
<https://doi.org/10.1038/nature10435>
- Rishishwar, L., & Jordan, I. K. (2017). Implications of human evolution and admixture for mitochondrial replacement therapy. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-017-3539-3>
- Robberson, D. L., & Clayton, D. A. (1972). Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase - derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(12), 3810–3814. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.12.3810>
- Rodriguez-Alvarez, E., Lanborena, N., & Borrell, L. N. (2020). Cardiovascular disease risk factors in Spain: A comparison of native and immigrant populations. *PLoS ONE*, 15(11).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0242740>
- Roostalu, U., Kutuev, I., Loogväli, E. L., Metspalu, E., Tambets, K., Reidla, M., Khusnutdinova, E. K., Usanga, E., Kivisild, T., & Villems, R. (2007). Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Molecular Biology and Evolution*, 24(2), 436–448.  
<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSL173>
- Rosa, A., Fonseca, B. v., Krug, T., Manso, H., Gouveia, L., Albergaria, I., Gaspar, G., Correia, M., Viana-Baptista, M., Simões, R. M., Pinto, A. N., Taipa, R., Ferreira, C., Fontes, J. R., Silva, M. R., Gabriel, J. P., Matos, I., Lopes, G., Ferro, J. M., ... Oliveira, S. A. (2008). Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients. *BMC Medical Genetics*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-57>
- Rose, G., Passarino, G., Scornaienchi, V., Romeo, G., Dato, S., Bellizzi, D., Mari, V., Feraco, E., Maletta, R., Bruni, A., Franceschi, C., & de Benedictis, G. (2007). The mitochondrial DNA control region shows genetically correlated levels of heteroplasmy in leukocytes of centenarians and their offspring. *BMC Genomics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-293>
- Roselló-Díez, E., Hove-Madsen, L., Pérez-Grijalba, V., Muñoz-Guijosa, C., Artigas, V., Maria Padró, J., & Domínguez-Garrido, E. (2021). Mitochondrial genetic effect on atrial fibrillation: A case-control study. *Mitochondrion*, 56, 15–24. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2020.11.007>
- Ruiz-García, A., Arranz-Martínez, E., García-Álvarez, J. C., Morales-Cobos, L. E., García-Fernández, M. E., de la Peña-Antón, N., Martín Calle, M. C., Díez Pérez, M. C., Montero Costa, A., Palacios Martínez, D., García Villasar, M. P., García Granado, M. a. D., Lorenzo Borda, M. S., Cique



- Herráinz, J. A., Marañón Henrich, N., Zarzuelo Martín, N., Baltuille Aller, M. del C., Casaseca Calvo, T. F., Arribas Álvaro, P., ... Rivera Teijido, M. (2018). Population and methodology of the SIMETAP study: Prevalence of cardiovascular risk factors, cardiovascular diseases, and related metabolic diseases. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 30(5), 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.04.006>
- 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 (New York, N.Y.)*, 303(5655), 223–226. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1088434>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3). [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R. J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.-E., Barrett, J. H., König, I. R., Stevens, S. E., Szymczak, S., Tregouet, D.-A., Iles, M. M., Pahlke, F., Pollard, H., Lieb, W., ... Schunkert, H. (2007). Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 357(5), 443–453. <https://doi.org/10.1056/nejmoa072366>
- SanGiovanni, J. P., Arking, D. E., Iyengar, S. K., Elashoff, M., Clemons, T. E., Reed, G. F., Henning, A. K., Sivakumaran, T. A., Xu, X., DeWan, A., Agrón, E., Rochtchina, E., Sue, C. M., Wang, J. J., Mitchell, P., Hoh, J., Francis, P. J., Klein, M. L., Chew, E. Y., & Chakravarti, A. (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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005508>
- Santos, C., Montiel, R., Anglé, N. L., Lima, M., Francalacci, P., Malgosa, A., Abade, A., & Pilar Aluja, A. M. (2004). Determination of Human Caucasian Mitochondrial DNA Haplogroups by Means of a Hierarchical Approach. *Human Biology Copyright*, 76(3), 431–453. <https://doi.org/10.1353/hub.2004.0049>
- Sato, M. P., Ogura, Y., Nakamura, K., Nishida, R., Gotoh, Y., Hayashi, M., Hisatsune, J., Sugai, M., Takehiko, I., & Hayashi, T. (2019). Comparison of the sequencing bias of currently available library preparation kits for Illumina sequencing of bacterial genomes and metagenomes. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 26(5), 391. <https://doi.org/10.1093/DNARES/DSZ017>
- Sawabe, M., Tanaka, M., Chida, K., Arai, T., Nishigaki, Y., Fuku, N., Mieno, M. N., Kuchiba, A., & Tanaka, 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. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(2), 166–175. <https://doi.org/10.5551/jat.6742>
- Sazonova, M. A., Shkurat, T. P., Demakova, N. A., Zhelankin, A. v., Barinova, V. A., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2016). Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next? *Current Pharmaceutical Design*, 22(3), 390–396. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151112152335>
- Sazonova, M. A., Sinyov, V. v., Barinova, V. A., Ryzhkova, A. I., Bobryshev, Y. v., Orekhov, A. N., & Sobenin, I. A. (2015). Association of mitochondrial mutations with the age of patients having atherosclerotic lesions. *Experimental and Molecular Pathology*, 99(3), 717–719. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.019>

- Schirmer, M., D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Hall, N., & Quince, C. (2016). Illumina error profiles: resolving fine-scale variation in metagenomic sequencing data. *BMC Bioinformatics*, *17*(1), 125. <https://doi.org/10.1186/S12859-016-0976-Y>
- Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T., & Quince, C. (2015). Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research*, *43*(6). <https://doi.org/10.1093/nar/gku1341>
- Schwartz, M., & Vissing, J. (2002). Paternal Inheritance Of Mitochondrial DNA. *New England Journal Of Medicine*, *347*(8), 576–580. <https://doi.org/10.1056/nejm200212193472519>
- Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L., & Ney, P. A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19500–19505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708818104>
- Sepuri, N. B. v., Tammineni, P., Mohammed, F., & Paripati, A. (2017). Nuclear transcription factors in the mitochondria: A new paradigm in fine-tuning mitochondrial metabolism. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 240). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_3](https://doi.org/10.1007/164_2016_3)
- Serrano-Teruel, M. E., Garcia-Vieites, M., Rego-Perez, I., Domenech-Garcia, N., Blanco-Garcia, F., Cuenca-Castillo, J. J., & Bautista-Hernandez, V. (2019). Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of aortic stenosis. *Asian Cardiovascular & Thoracic Annals*, *27*(1), 5–10. <https://doi.org/10.1177/0218492318813220>
- Shaikh, K., Nakanishi, R., Kim, N., & Budoff, M. J. (2019). Coronary artery calcification and ethnicity. In *Journal of Cardiovascular Computed Tomography* (Vol. 13, Issue 6, pp. 353–359). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcct.2018.10.002>
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Sharopov, F., Docea, A. O., Karaca, A. C., Sharifi-Rad, M., Karıncaoglu, D. K., Gülseren, G., Şenol, E., Demircan, E., Taheri, Y., Suleria, H. A. R., Özçelik, B., Kasapoğlu, K. N., Gültekin-Özgüven, M., Daşkaya-Dikmen, C., Cho, W. C., Martins, N., & Calina, D. (2020). Diet, lifestyle and cardiovascular diseases: Linking pathophysiology to cardioprotective effects of natural bioactive compounds. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 7, p. 2326). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072326>
- Sharrief, A. Z., Johnson, B., Abada, S., & Urrutia, V. C. (2016). Stroke knowledge in African Americans: A narrative review. In *Ethnicity and Disease* (Vol. 26, Issue 2, pp. 255–262). ISHIB. <https://doi.org/10.18865/ed.26.2.255>
- Sheridan, C., & Martin, S. J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. In *Mitochondrion* (Vol. 10, Issue 6, pp. 640–648). Mitochondrion. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.005>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *122*(1), e59. <https://doi.org/10.1002/CPMB.59>
- Smith, J. G., Melander, O., Lövkvist, H., Hedblad, B., Engström, G., Nilsson, P., Carlson, J., Berglund, G., Norrving, B., & Lindgren, A. (2009). Common genetic variants on chromosome 9p21 confers

- risk of ischemic stroke a large-scale genetic association study. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(2), 159–164. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.835173>
- Soares, P., Ermini, L., Thomson, N., Mormina, M., Rito, T., Röhl, A., Salas, A., Oppenheimer, S., Macaulay, V., & Richards, M. B. (2009). Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *American Journal of Human Genetics*, 84(6), 740–759. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2009.05.001>
- Sobenin, I. A., Sazonova, M. A., Postnov, A. Y., Salonen, J. T., Bobryshev, Y. v., & Orekhov, A. N. (2013). Association of Mitochondrial Genetic Variation with Carotid Atherosclerosis. *PLoS ONE*, 8(7), 68070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068070>
- Sobenin, I. A., Zhelankin, A. v., Khasanova, Z. B., Sinyov, V. v., Medvedeva, L. v., Sagaidak, M. O., Makeev, V. J., Kolmychkova, K. I., Smirnova, A. S., Sukhorukov, V. N., Postnov, A. Y., Grechko, A. v., & Orekhov, A. N. (2019). Heteroplasmic Variants of Mitochondrial DNA in Atherosclerotic Lesions of Human Aortic Intima. *Biomolecules*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/BIOM9090455>
- Soini, H. K., Moilanen, J. S., Finnila, S., & Majamaa, K. (2012). Mitochondrial DNA sequence variation in Finnish patients with matrilineal diabetes mellitus. *BMC Research Notes*, 5, 350. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-350>
- Sonney, S., Leipzig, J., Lott, M. T., Zhang, S., Procaccio, V., Wallace, D. C., & Sondheimer, N. (2017). Predicting the pathogenicity of novel variants in mitochondrial tRNA with MitoTIP. *PLoS Computational Biology*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005867>
- Stevens, S. L., Wood, S., Koshiaris, C., Law, K., Glasziou, P., Stevens, R. J., & McManus, R. J. (2016). Blood pressure variability and cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. In *BMJ (Online)* (Vol. 354). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.i4098>
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16(9), 530–542. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3966>
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2021). Extreme heterogeneity of human mitochondrial DNA from organelles to populations. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 22, Issue 2, pp. 106–118). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00284-x>
- Stawski, H., B. J. Bintz, E. S. Burnside, and M. Wilson. (2013). Preparing Whole Genome Human Mitochondrial DNA Libraries for Next Generation Sequencing (NGS) Using Illumina Nextera XT. Poster presentation at the 65th Annual American Academy of Forensic Sciences Conference. In: Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences. Washington, D.C. [www.aafs.org/sites/default/files/pdf/ProceedingsWashingtonDC2013.pdf](http://www.aafs.org/sites/default/files/pdf/ProceedingsWashingtonDC2013.pdf)
- Stoler, N., & Nekrutenko, A. (2021). Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/NARGAB/LQAB019>
- Suárez, Y., Wang, C., Manes, T. D., & Pober, J. S. (2010). Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(1), 21–25. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902369>
- Sundquist, K., Sundquist, J., Palmer, K., & Memon, A. A. (2022). Role of mitochondrial DNA copy number in incident cardiovascular diseases and the association between cardiovascular

- disease and type 2 diabetes: A follow-up study on middle-aged women. *Atherosclerosis*, 341, 58–62. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2021.11.020>
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402(6760), 371–372. <https://doi.org/10.1038/46466>
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction*, 63(2), 582–590. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.582>
- Terzioglu, M., Ruzzenente, B., Harmel, J., Mourier, A., Jemt, E., López, M. D., Kukat, C., Stewart, J. B., Wibom, R., Meharg, C., Habermann, B., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M., Park, C. B., & Larsson, N. G. (2013). MTERF1 Binds mtDNA to prevent transcriptional interference at the light-strand promoter but is dispensable for rRNA gene transcription regulation. *Cell Metabolism*, 17(4), 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.006>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/NAR/22.22.4673>
- Tibazarwa, K. B., & Damasceno, A. A. (2014). Hypertension in developing countries. In *Canadian Journal of Cardiology* (Vol. 30, Issue 5, pp. 527–533). Pulsus Group Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.02.020>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 62, Issue 3, pp. 341–360). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Timmis, J. N., Ayliff, M. A., Huang, C. Y., & Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 5, Issue 2, pp. 123–135). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg1271>
- Toncheva, D., Serbezov, D., Karachanak-Yankova, S., & Nesheva, D. (2020). Ancient mitochondrial DNA pathogenic variants putatively associated with mitochondrial disease. *PLoS ONE*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0233666>
- Torrioni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M. L., & Wallace, D. C. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, 144(4), 1835–1850. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/144.4.1835>
- Torrioni, A., Richards, M., Macaulay, V., Forster, P., Villems, R., Nørby, S., Savontaus, M. L., Huoponen, K., Scozzari, R., & Bandelt, H. J. (2000). mtDNA Haplogroups and Frequency Patterns in Europe. *American Journal of Human Genetics*, 66(3), 1173. <https://doi.org/10.1086/302789>
- Torrioni, A., Schurr, T. G., Yang, C. C., Szathmary, E. J. E., Williams, R. C., Schanfield, M. S., Troup, G. A., Knowler, W. C., Lawrence, D. N., Weiss, K. M., & Wallace, D. C. (1992). Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were

- founded by two independent migrations. *Genetics*, *130*(1), 153–162.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/130.1.153>
- Tsai, M. H., Kuo, C. W., Lin, T. K., Ho, C. J., Wang, P. W., Chuang, J. H., & Liou, C. W. (2020). Ischemic Stroke Risk Associated with Mitochondrial Haplogroup F in the Asian Population. *Cells*, *9*(8).  
<https://doi.org/10.3390/CELLS9081885>
- Tsatsakis, A., Docea, A., Calina, D., Tsarouhas, K., Zamfira, L.-M., Mitrut, R., Sharifi-Rad, J., Kovatsi, L., Siokas, V., Dardiotis, E., Drakoulis, N., Lazopoulos, G., Tsitsimpikou, C., Mitsias, P., & Neagu, M. (2019). A Mechanistic and Pathophysiological Approach for Stroke Associated with Drugs of Abuse. *J Clin Med*, *8*(9). [https://scholarlycommons.henryford.com/neurology\\_articles/154](https://scholarlycommons.henryford.com/neurology_articles/154)
- Tun, N. N., Arunagirinathan, G., Munshi, S. K., & Pappachan, J. M. (2017). Diabetes mellitus and stroke: A clinical update. *World Journal of Diabetes*, *8*(6), 235.  
<https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i6.235>
- Turnbull, D. M., Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA - Nature Genetics. *Nature Genetics*, *23*(2), 147.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., & Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO Journal*, *27*(2), 433–446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
- Ueshima, H., Sekikawa, A., Miura, K., Turin, T. C., Takashima, N., Kita, Y., Watanabe, M., Kadota, A., Okuda, N., Kadowaki, T., Nakamura, Y., & Okamura, T. (2008). Cardiovascular Disease and Risk Factors in Asia. *Circulation*, *118*(25), 2702–2709.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.790048>
- Umbria M (2019c) Tesis Doctoral: ADN mitocondrial i risc cardiovascular.
- Umbria M, Ortega I, Santos C, Castillo S, Salas E, Aluja MP. Under Review (January 2019a). New mitochondrial genetic risk score improve discrimination capacity of cardiovascular events. *Atherosclerosis*.
- Umbria, M., Rafel Ribera, J., Aluja, M. P., & Santos, C. (2014). Enfermedad cardiovascular en España: estudio epidemiológico descriptivo 1999-2010. *Antropo, ISSN-e 1578-2603, Vol. 32, 2014, Págs. 1-13, 32, 1–13*.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4896610&info=resumen&idioma=SPA>
- Umbria, M., Ramos, A., Aluja, M. P., & Santos, C. (2020). The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: stroke and myocardial infarction. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-59631-X>
- Umbria, M., Ramos, A., Caner, J., Vega, T., Lozano, J. E., Santos, C., & Aluja, M. P. (2019b). Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: A case-control study in Castile and Leon (Spain) population. *Mitochondrion*, *44*, 1–6.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.004>
- van Blerkom, J. (2011). Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, *11*(5), 797–813.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.012>

- van Gisbergen, M. W., Voets, A. M., Starmans, M. H. W., de Coo, I. F. M., Yadak, R., Hoffmann, R. F., Boutros, P. C., Smeets, H. J. M., Dubois, L., & Lambin, P. (2015). How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 764, 16–30. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2015.01.001>
- van Oven, M., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), 386–394. <https://doi.org/10.1002/humu.20921>
- Vartak, T., Kumaresan, S., & Brennan, E. (2022). Decoding microRNA drivers in atherosclerosis. *Bioscience Reports*, 20212355. <https://doi.org/10.1042/BSR20212355>
- Vasileva, L. v., Marchev, A. S., & Georgiev, M. I. (2018). Causes and solutions to “globesity”: The new fa(s)t alarming global epidemic. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 173–193. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.071>
- Vecoli, C., Borghini, A., Pulignani, S., Mercuri, A., Turchi, S., Carpeggiani, C., Picano, E., & Andreassi, M. G. (2018). Prognostic value of mitochondrial DNA4977 deletion and mitochondrial DNA copy number in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 276, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2018.07.015>
- Vecoli, C., Borghini, A., Pulignani, S., Mercuri, A., Turchi, S., Picano, E., & Andreassi, M. G. (2019). Independent and Combined Effects of Telomere Shortening and mtDNA4977 Deletion on Long-term Outcomes of Patients with Coronary Artery Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS20215508>
- Vega Alonso, A. T., Lozano Alonso, J. E., Álamo Sanz, R., Llera Muñoz, S., Escribano 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. *Gaceta Sanitaria*, 21(1), 84–87. [https://doi.org/10.1016/S0213-9111\(07\)71976-3](https://doi.org/10.1016/S0213-9111(07)71976-3)
- Vellarikkal, S. K., Dhiman, H., Joshi, K., Hasija, Y., Sivasubbu, S., & Scaria, V. (2015). mit-o-matic: a comprehensive computational pipeline for clinical evaluation of mitochondrial variations from next-generation sequencing datasets. *Human Mutation*, 36(4), 419–424. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22767>
- Venter, M., Malan, L., Elson, J. L., & van der Westhuizen, F. H. (2019). Implementing a new variant load model to investigate the role of mtDNA in oxidative stress and inflammation in a bi-ethnic cohort: the SABPA study. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1544248>, 30(3), 440–447. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1544248>
- Venter, M., Malan, L., van Dyk, E., Elson, J. L., & van der Westhuizen, F. H. (2017). Using MutPred derived mtDNA load scores to evaluate mtDNA variation in hypertension and diabetes in a two-population cohort: The SABPA study. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 44(3), 139–149. <https://doi.org/10.1016/J.JGG.2016.12.003>
- Vissing, J. (2019). Paternal comeback in mitochondrial DNA inheritance. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 116, Issue 5, pp. 1475–1476). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821192116>
- Vrablik, M., Dlouha, D., Todorovova, V., Stefler, D., & Hubacek, J. A. (2021). Genetics of Cardiovascular Disease: How Far Are We from Personalized CVD Risk Prediction and

- Management? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8).  
<https://doi.org/10.3390/IJMS22084182>
- Vyas, C. M., Ogata, S., Reynolds, C. F., Mischoulon, D., Chang, G., Cook, N. R., Manson, J. A. E., Crous-Bou, M., de Vivo, I., & Okereke, O. I. (2020). Lifestyle and behavioral factors and mitochondrial DNA copy number in a diverse cohort of mid-life and older adults. *PLoS One*, 15(8).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0237235>
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. In *Science* (Vol. 283, Issue 5407, pp. 1482–1488). Science. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1482>
- Wallace, D. C. (2005). A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annual Review of Genetics*, 39, 359–407.  
<https://doi.org/10.1146/>
- Wallace, D. C. (2015). Mitochondrial DNA Variation in Human Radiation and Disease. *Cell*, 163(1), 33.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.08.067>
- Wallace, D. C., & Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11).  
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A021220>
- Wallace, D. C., Fan, W., & Procaccio, V. (2010). Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology*, 5, 297. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PATHOL.4.110807.092314>
- Wang, F., Zhang, D., Zhang, D., Li, P., & Gao, Y. (2021). Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1737.  
<https://doi.org/10.3389/FCCELL.2021.675465/BIBTEX>
- Wang, J., Lin, F., Guo, L. L., Xiong, X. J., & Fan, X. (2015). Cardiovascular disease, mitochondria, and traditional chinese medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.  
<https://doi.org/10.1155/2015/143145>
- Wang, W., Sun, Y., Lin, Y., Xu, X., Zhao, D., Ji, K., Li, W., Zhao, Y., & Yan, C. (2021). A novel nonsense variant in MT-CO3 causes MELAS syndrome. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 31(6), 558–565.  
<https://doi.org/10.1016/J.NMD.2021.02.020>
- Wang, Y., Zhao, X., Liu, L., Soo, Y. O. Y., Pu, Y., Pan, Y., Wang, Y., Zou, X., Leung, T. W. H., Cai, Y., Bai, Q., Wu, Y., Wang, C., Pan, X., Luo, B., & Wong, K. S. L. (2014). Prevalence and outcomes of symptomatic intracranial large artery stenoses and occlusions in China: The Chinese intracranial atherosclerosis (CICAS) study. *Stroke*, 45(3), 663–669.  
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.003508>
- Wang, Z., Chen, H., Qin, M., Liu, C., Ma, Q., Chen, X., Zhang, Y., Lai, W., Zhang, X., & Zhong, S. (2021). Associations of Mitochondrial Variants With Lipidomic Traits in a Chinese Cohort With Coronary Artery Disease. *Frontiers in Genetics*, 12, 630359.  
<https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.630359/FULL>
- Wang, Z., Luo, X., Lu, Y., & Yang, B. (2008). miRNAs at the heart of the matter. *Journal of Molecular Medicine*, 86(7), 771–783. <https://doi.org/10.1007/S00109-008-0341-3/TABLES/2>
- Wanrooij, P. H., Uhler, J. P., Simonsson, T., Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2010). G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer

- formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16072–16077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006026107>
- Warren, T. Y., Barry, V., Hooker, S. P., Sui, X., Church, T. S., & Blair, S. N. (2010). Sedentary behaviors increase risk of cardiovascular disease mortality in men. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 42(5), 879–885. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181c3aa7e>
- Watson, B., Khan, M. A., Desmond, R. A., & Bergman, S. (2001). Mitochondrial DNA mutations in black Americans with hypertension-associated end-stage renal disease. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 38(3), 529–536. <https://doi.org/10.1053/AJKD.2001.26848>
- Weerts, M. J. A., Timmermans, E. C., Vossen, R. H. A. M., van Strijp, D., van den Hout-Van Vroonhoven, M. C. G. N., van Ijcken, W. F. J., van der Zaag, P. J., Anvar, S. Y., Sleijfer, S., & Martens, J. W. M. (2018). Sensitive detection of mitochondrial DNA variants for analysis of mitochondrial DNA-enriched extracts from frozen tumor tissue. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20623-7>
- Wei, R., Ni, Y., Bazeley, P., Grandhi, S., Wang, J., Li, S. T., Hazen, S. L., Wilson Tang, W. H., & LaFramboise, T. (2021). Mitochondrial DNA Content Is Linked to Cardiovascular Disease Patient Phenotypes. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 10(4), 1–720. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018776>
- Wei, W., Schon, K. R., Elgar, G., Orioli, A., Tanguy, M., Giess, A., Tischkowitz, M., Caulfield, M. J., & Chinnery, P. F. (2022). Nuclear-embedded mitochondrial DNA sequences in 66,083 human genomes. *Nature*, 611(7934), 105. <https://doi.org/10.1038/S41586-022-05288-7>
- Weissensteiner, H., Forer, L., Fuchsberger, C., Schöpf, B., Kloss-Brandstätter, A., Specht, G., Kronenberg, F., & Schönherr, S. (2016). mtDNA-Server: next-generation sequencing data analysis of human mitochondrial DNA in the cloud. *Nucleic Acids Research*, 44(April), gkw247. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw247>
- Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(10), 1833–1838. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.033>
- Wong, L. J. C., Chen, T., Wang, J., Tang, S., Schmitt, E. S., Landsverk, M., Li, F., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, V. W., & Craigen, W. J. (2020). Interpretation of mitochondrial tRNA variants. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 22(5), 917–926. <https://doi.org/10.1038/S41436-019-0746-0>
- Wright, E. N., Hanlon, A., Lozano, A., & Teitelman, A. M. (2019). The impact of intimate partner violence, depressive symptoms, alcohol dependence, and perceived stress on 30-year cardiovascular disease risk among young adult women: A multiple mediation analysis. *Preventive Medicine*, 121, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2019.01.016>
- Xiao, F., Li, M., Wang, J., Liu, J., Li, J., Fang, H., Lyu, J., & Shen, L. (2020). Association between mitochondrial DNA haplogroup variation and coronary artery disease. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 30(6), 960–966. <https://doi.org/10.1016/J.NUMECD.2020.03.006>
- Xiao, T., & Zhou, W. (2020). The third generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. *Translational Pediatrics*, 9(2), 163. <https://doi.org/10.21037/TP.2020.03.06>



- Yakubovskaya, E., Mejia, E., Byrnes, J., Hambardjueva, E., & Garcia-Diaz, M. (2010). Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription. *Cell*, *141*(6), 982–993. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.018>
- Yang, D., Wang, Q., Shi, Y., Fan, Y., Zheng, H. X., Song, G., Feng, Q., Zheng, H., & He, Y. (2014). Mitochondrial DNA haplogroup D4b is a protective factor for ischemic stroke in Chinese Han population. *Molecular Genetics and Genomics*, *289*(6), 1241–1246. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0884-7>
- Yang, M. Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H. T., & Holt, I. J. (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell*, *111*(4), 495–505. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01075-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01075-9)
- Yang, X., Yang, Z., Wu, Z., He, Y., Shan, C., Chai, P., Ma, C., Tian, M., Teng, J., Jin, D., Yan, W., Das, P., Qu, J., & Xi, P. (2020). Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe. *Nature Communications* *2020 11:1*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17546-1>
- Yano, Y., Reis, J. P., Colangelo, L. A., Shimbo, D., Viera, A. J., Allen, N. B., Gidding, S. S., Bress, A. P., Greenland, P., Muntner, P., & Lloyd-Jones, D. M. (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 - Journal of the American Medical Association*, *320*(17), 1774–1782. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.13551>
- Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T. J., Yang, M. Y., Bowmaker, M., Jacobs, H. T., & Holt, I. J. (2006). Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO Journal*, *25*(22), 5358–5371. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601392>
- Ye, K., Lu, J., Ma, F., Keinan, A., & Gu, Z. (2014). Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(29), 10654–10659. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1403521111>
- Ye, S., Willeit, J., Kronenberg, F., Xu, Q., & Kiechl, S. (2008). Association of Genetic Variation on Chromosome 9p21 With Susceptibility and Progression of Atherosclerosis. A Population-Based, Prospective Study. *Journal of the American College of Cardiology*, *52*(5), 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.11.087>
- Yen, K., Wan, J., Mehta, H. H., Miller, B., Christensen, A., Levine, M. E., Salomon, M. P., Brandhorst, S., Xiao, J., Kim, S. J., Navarrete, G., Campo, D., Harry, G. J., Longo, V., Pike, C. J., Mack, W. J., Hodis, H. N., Crimmins, E. M., & Cohen, P. (2018). Humanin Prevents Age-Related Cognitive Decline in Mice and is Associated with Improved Cognitive Age in Humans. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-32616-7>
- Youle, R. J. (2019). Mitochondria—Striking a balance between host and endosymbiont. *Science*, *365*(6454). <https://doi.org/10.1126/science.aaw9855>
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>

- Young, D. R., Reynolds, K., Sidell, M., Brar, S., Ghai, N. R., Sternfeld, B., Jacobsen, S. J., Slezak, J. M., Caan, B., & Quinn, V. P. (2014). Effects of physical activity and sedentary time on the risk of heart failure. *Circulation: Heart Failure*, 7(1), 21–27. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000529>
- Yue, P., Jing, S., Liu, L., Ma, F., Zhang, Y., Wang, C., Duan, H., Zhou, K., Hua, Y., Wu, G., & Li, Y. (2018). Association between mitochondrial DNA copy number and cardiovascular disease: Current evidence based on a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206003>
- Yusoff, A. A. M., Ahmad, F., Idris, Z., Jaafar, H., & Abdullah, J. M. (2015). Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis. *Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor*. <https://doi.org/10.5772/58965>
- Yu-Wai-Man, P., & Chinnery, P. F. (2021). Leber Hereditary Optic Neuropathy. *GeneReviews*®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1174/>
- Zakirova, E. G., Muzyka, V. v., Mazunin, I. O., & Orishchenko, K. E. (2021). Natural and Artificial Mechanisms of Mitochondrial Genome Elimination. *Life*, 11(2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/LIFE11020076>
- Zárate, A., Manuel-Apolinar, L., Saucedo, R., Hernández-Valencia, M., & Basurto, L. (2016). Hypercholesterolemia As a Risk Factor for Cardiovascular Disease: Current Controversial Therapeutic Management. In *Archives of Medical Research* (Vol. 47, Issue 7, pp. 491–495). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.11.009>
- Zhang, H., Chen, P., Zeng, H., Zhang, Y., Peng, H., Chen, Y., & He, Z. (2013). Protective effect of demethylation treatment on cigarette smoke extract-induced mouse emphysema model. *Journal of Pharmacological Sciences*, 123(2), 159–166. <https://doi.org/10.1254/JPHS.13072FP>
- Zhang, Z., Liu, M., He, J., Zhang, X., Chen, Y., & Li, H. (2019). Maternally inherited coronary heart disease is associated with a novel mitochondrial tRNA mutation. *BMC Cardiovascular Disorders*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12872-019-01284-4>
- Zhou, W., Zhu, M., Gui, M., Huang, L., Long, Z., Wang, L., Chen, H., Yin, Y., Jiang, X., Dai, Y., Tang, Y., He, L., & Zhong, K. (2014). Peripheral blood mitochondrial DNA copy number is associated with prostate cancer risk and tumor burden. *PLoS One*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0109470>
- Zhu, H. Y., Wang, S. W., Martin, L. J., Liu, L., Li, Y. H., Chen, R., Wang, L., Zhang, M. L., & Benson, D. W. (2009). The role of mitochondrial genome in essential hypertension in a Chinese Han population. *European Journal of Human Genetics*, 17(11), 1501–1506. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.63>
- Zinovkina, L. A. (2019). DNA Replication in Human Mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, 84(8), 884–895. <https://doi.org/10.1134/S0006297919080042>

# Anexo





*Tabla suplementaria 1. Lista de las abreviaciones utilizadas durante le exposición de esta Tesis Doctoral.*

| <b>Abreviación</b> | <b>Definición</b>   |
|--------------------|---|
| aa                 | Aminoácido  |
| ACV                | Accidente cerebrovascular                                   |
| ATAD3              | Proteína 3 que contiene el dominio AAA de la familia ATPasa |
| ATP                | Adenosina trifosfato  |
| ATP6               | Subunidad 6 de la ATP sintasa FO                            |
| ATP8               | Subunidad 8 de la ATP sintasa FO                            |
| ATT                | Sitio de unión a la membrana                                |
| BMt                | Biogénesis mitocondrial                                     |
| bp                 | Pares de bases  |
| CAD                | Enfermedad de las arterias coronarias                       |
| CHD                | Enfermedad coronaria  |
| CI                 | Cardiopatía isquémica                                       |
| CO1                | Subunidad 1 del citocromo c oxidasa                         |
| CO2                | Subunidad 2 del citocromo c oxidasa                         |
| CO3                | Subunidad 3 del citocromo c oxidasa                         |
| CR                 | Región codificante  |
| CSB                | Bloques de secuencia conservados                            |
| CYB                | Citocromo B   |
| CyL                | Castilla y León.  |
| ddNTPs             | Didesoxinucleótidos trifosfato                              |
| DMt                | Dinámica mitocondrial                                       |
| DRP1               | Proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1)               |
| ds                 | Desviación estándar   |
| ECV                | Enfermedad cardiovascular                                   |
| EF-G2mt            | Factor liberador de ribosomas mitocondrial 2                |
| EF-TS              | Factor de elongación mitocondrial Ts                        |
| EFTU               | Factor de elongación mitocondrial Tu                        |
| ETC                | Cadena de transporte ded electrones                         |
| FIS1               | Proteína 1 de fisión mitocondrial                           |
| FUNDC1             | Proteína 1 que continiene el dominio FUN14                  |
| Hg                 | Haplogrupo  |
| Ht                 | Haplotipo   |
| HVR1               | Región hipervariable 1                                      |
| HVR2               | Región hipervariable 2                                      |
| HVR3               | Region hipervariable 3                                      |
| Kb                 | Kilobase  |
| MFF                | Factor de fisión mitocondrial                               |
| MFN1               | Mitofusina 1  |
| MFN2               | Mitofusina 2  |
| MI                 | Infarto de miocardio  |

|                              |   |
|------------------------------|---|
| MICOS                        | Sitio de contacto mitocondrial y sistema organizador de crestas |
| MiD49                        | Proteína de dinámica mitocondrial de 49 kDa                     |
| MiD51                        | Proteína de dinámica mitocondrial de 51 kDa                     |
| MRRF                         | Factor de reciclaje de ribosomas mitocondrial                   |
| mtDNA                        | DNA mitocondrial  |
| mtDNA-CN                     | Número de copias de DNA mitocondrial                            |
| mtEF-G1                      | Factor de elongación mitocondrial 1-gamma                       |
| MTERF1                       | Factor de terminación mitocondrial 1                            |
| MTIF2                        | Factor de iniciación de la traducción mitocondrial IF-2         |
| MTIF3                        | Factor de iniciación de la traducción mitocondrial IF-3         |
| mtPT                         | Poro de permeabilidad transitoria                               |
| MTRF1L                       | Factor de liberación glutamina metiltransferasa                 |
| mtSSB                        | Proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial         |
| mtSSB                        | Proteína mitocondrial de unión a DNA de hebra única             |
| mtTFA                        | Factor de transcripción mitocondrial A                          |
| NCR                          | Región no codificante   |
| ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 | Subunidades 1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6 de la NADH deshidrogenasa     |
| nDNA                         | DNA nuclear   |
| NGS                          | Secuenciación de segunda generación                             |
| NUMTs                        | Inserciones de DNA mitocondrial en el genoma nuclear            |
| OHR                          | Origen de replicación de la cadena pesada                       |
| OLR                          | Origen de replicación de la cadena L                            |
| OPA1                         | Dinamina mitocondrial similar a una GTPasa                      |
| OXPHOS                       | Fosforilación oxidativa   |
| PCR                          | Reacción en cadena de la polimerasa                             |
| PH                           | Promotor de transcripción de la cadena pesada (heavy, H).       |
| PL                           | Promotor de transcripción de la cadena ligera (light, L).       |
| POLG                         | DNA polimerasa $\gamma$   |
| POLRMT                       | RNA polimerasa mitocondrial                                     |
| QC                           | Control de calidad  |
| rCRS                         | Secuencia de Referencia de Cambridge revisada                   |
| RNR1                         | RNA ribosomal 12S   |
| RNR2                         | RNA ribosomal 16S   |
| ROS                          | Especies reactivas de oxígeno                                   |
| rRNA                         | RNA ribosómico  |
| TA                           | tRNA alanina  |
| TAS                          | Secuencia asociada a la terminación                             |
| TC                           | tRNA cisteína   |
| TD                           | tRNA ácido aspártico  |
| TF                           | tRNA fenilalanina   |
| TFAM                         | Factor de transcripción mitocondrial A                          |
| TFB1M/TFB2M                  | Factores de transcripción mitocondriales 1 y 2                  |

|      |   |
|------|---|
| TFEM | Factor de elongación de la transcripción mitocondrial |
| TFX  | Sitio de unión de mtTF1                               |
| TFY  | Sitio de unión de mtTF1                               |
| TG   | tRNA glicina  |
| TH   | tRNA hisidina   |
| TK   | tRNA lisina   |
| TL1  | tRNA leucina 1  |
| TL2  | tRNA leucina 2  |
| TM   | tRNA metionina  |
| TN   | tRNA asparagine                                       |
| TP   | tRNA prolina  |
| TQ   | tRNA glutamina  |
| TR   | tRNA arginina   |
| tRNA | RNA de transferencia                                  |
| TS1  | tRNA serina 1   |
| TS2  | tRNA serina 2   |
| TT   | tRNA treonina   |
| TV   | tRNA valina   |
| TW   | tRNA triptófano                                       |
| Ala  | Alanina   |
| Arg  | Arginina  |
| Asn  | Asparagina  |
| Asp  | Ácido aspártico                                       |
| Cys  | Cisteína  |
| Gln  | Glutamina   |
| Glu  | Ácido glutámico                                       |
| Gly  | Glicina   |
| His  | Histidina   |
| Ile  | Isoleucina  |
| Leu  | Leucina   |
| Lys  | Lisina  |
| Met  | Metionina   |
| Phe  | Fenilalanina  |
| Pro  | Prolina   |
| Ser  | Serina  |
| Thr  | Treonina  |
| Trp  | Triptófano  |
| Tyr  | Tirosina  |
| Val  | Valina  |

*Tabla suplementaria 2. Descripción de las distintas regiones del genoma mitocondrial.*

| <b>Región mitocondrial</b> | <b>Subregión</b> | <b>Inicio</b> | <b>Final</b> | <b>Total (pb)</b> |
|----------------------------|------------------|---------------|--------------|-------------------|
| Región no codificante      | Completa         | 16024         | 575          | 1120              |
|                            | MT-HV1           | 16024         | 16383        | 360               |
|                            | MT-HV2           | 57            | 372          | 316               |
|                            | MT-HV3           | 438           | 574          | 137               |
|                            | Otras            | -             | -            | 307               |
| Región codificante         | Completa         | 16024         | 576          | 15449             |
|                            | Complejo I       | -             | -            | 6356              |
|                            | MT-ND1           | 3307          | 4262         | 956               |
|                            | MT-ND2           | 4470          | 5511         | 1042              |
|                            | MT-ND3           | 10059         | 10404        | 346               |
|                            | MT-ND4           | 10760         | 12137        | 1378              |
|                            | MT-ND4L          | 10470         | 10766        | 297               |
|                            | MT-ND5           | 12337         | 14148        | 1812              |
|                            | MT-ND6           | 14149         | 14673        | 525               |
|                            | Complejo III     |               |              |                   |
|                            | MT-CYB           | 14747         | 15887        | 1141              |
|                            | Complejo IV      |               |              | 3010              |
|                            | MT-CO1           | 5904          | 7445         | 1542              |
|                            | MT-CO2           | 7586          | 8269         | 684               |
|                            | MT-CO3           | 9207          | 9990         | 784               |
|                            | Complejo V       | -             | -            | 888               |
|                            | MT-ATP6          | 8527          | 9207         | 681               |
|                            | MT-ATP6/ATP8     | 8366          | 9207         | 842               |
|                            | MT-ATP8          | 8366          | 8572         | 207               |
|                            | rRNA             | -             | -            | 2537              |
|                            | MT-RNR1          | 648           | 1601         | 954               |
|                            | MT-RNR2          | 1671          | 3229         | 1559              |
|                            | tRNA             | -             | -            | 1508              |
|                            | MT-TF            | 577           | 647          | 71                |
|                            | MT-TV            | 1602          | 1670         | 69                |
|                            | MT-TL1           | 3230          | 3304         | 75                |
|                            | MT-TI            | 4263          | 4331         | 69                |
| MT-TQ                      | 4329             | 4400          | 72           |                   |
| MT-TM                      | 4402             | 4469          | 68           |                   |
| MT-TW                      | 5512             | 5579          | 68           |                   |
| MT-TA                      | 5587             | 5655          | 69           |                   |
| MT-TN                      | 5657             | 5729          | 73           |                   |



|        |       |       |    |
|--------|-------|-------|----|
| MT-TC  | 5761  | 5826  | 66 |
| MT-TY  | 5826  | 5891  | 66 |
| MT-TS1 | 7446  | 7514  | 69 |
| MT-TD  | 7518  | 7585  | 68 |
| MT-TK  | 8295  | 8364  | 70 |
| MT-TG  | 9991  | 10058 | 68 |
| MT-TR  | 10405 | 10469 | 65 |
| MT-TH  | 12138 | 12206 | 69 |
| MT-TS2 | 12207 | 12265 | 59 |
| MT-TL2 | 12266 | 12336 | 71 |
| MT-TE  | 14674 | 14742 | 69 |
| MT-TT  | 15888 | 15953 | 66 |
| MT-TP  | 15956 | 16023 | 68 |

**Tabla suplementaria 3.** Lista de números de acceso (AN) de las secuencias mitocondriales (y la especie de primate a la que pertenecen) utilizadas para calcular el índice de conservación nucleotídica en variantes de la región no codificante del genoma mitocondrial. Con un \* se marcan las 12 especies empleadas en el cálculo de dicho índice en variantes de la región codificante.

| AN        | Especie                             | AN        | Especie                              |
|-----------|-------------------------------------|-----------|--------------------------------------|
| NC_001643 | <i>Pan troglodytes</i> *            | NC_011053 | <i>Propithecus coquereli</i>         |
| NC_001644 | <i>Pan paniscus</i> *               | NC_011120 | <i>Gorilla gorilla gorilla</i>       |
| NC_001645 | <i>Gorilla gorilla</i> *            | NC_011137 | <i>Homo sapiens neanderthalensis</i> |
| NC_001646 | <i>Pongo pygmaeus</i> *             | NC_011519 | <i>Macaca thibetana</i>              |
| NC_001992 | <i>Papio hamadryas</i> *            | NC_012670 | <i>Macaca fascicularis</i>           |
| NC_002082 | <i>Hylobates lar</i> *              | NC_012761 | <i>Galago senegalensis</i>           |
| NC_002083 | <i>Pongo abelii</i> *               | NC_012762 | <i>Otolemur crassicaudatus</i>       |
| NC_002763 | <i>Cebus albifrons</i> *            | NC_012763 | <i>Loris tardigradus</i>             |
| NC_002764 | <i>Macaca sylvanus</i> *            | NC_012764 | <i>Perodicticus potto</i>            |
| NC_002765 | <i>Nycticebus coucang</i> *         | NC_012766 | <i>Eulemur fulvus fulvus</i>         |
| NC_004025 | <i>Lemur catta</i>                  | NC_012769 | <i>Eulemur fulvus mayottensis</i>    |
| NC_005943 | <i>Macaca mulatta</i>               | NC_012771 | <i>Eulemur macaco macaco</i>         |
| NC_006900 | <i>Trachypithecus obscurus</i>      | NC_012773 | <i>Varecia variegata variegata</i>   |
| NC_006901 | <i>Colobus guereza</i>              | NC_012774 | <i>Tarsius syrichta</i> *            |
| NC_007009 | <i>Chlorocebus aethiops</i>         | NC_012775 | <i>Saimiri sciureus</i>              |
| NC_008215 | <i>Semnopithecus entellus</i>       | NC_012920 | <i>Homo sapiens</i> *                |
| NC_008216 | <i>Nasalis larvatus</i>             | NC_013993 | <i>Homo sp. Altai</i>                |
| NC_008217 | <i>Presbytis melalophos</i>         | NC_014042 | <i>Hylobates agilis</i>              |
| NC_008218 | <i>Rhinopithecus roxellana</i>      | NC_014045 | <i>Hylobates pileatus</i>            |
| NC_008219 | <i>Ptilocolobus badius</i>          | NC_014047 | <i>Symphalangus syndactylus</i>      |
| NC_009747 | <i>Chlorocebus pygerythrus</i>      | NC_014051 | <i>Nomascus siki</i>                 |
| NC_009748 | <i>Chlorocebus tantalus</i>         | NC_014453 | <i>Lepilemur hubbardorum</i>         |
| NC_010299 | <i>Daubentonia madagascariensis</i> | NC_015485 | <i>Rhinopithecus avunculus</i>       |
| NC_010300 | <i>Eulemur mongoz</i>               | NC_015486 | <i>Rhinopithecus bieti</i>           |

Tabla suplementaria 4. Variables sociodemográficas utilizadas para emparejar los casos con sus respectivos controles.

|                          | <b>ACV</b><br>N = 110 (%) | <b>MI</b><br>N = 167 (%) | <b>AMBAS</b><br>N = 67 (%) |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>Edad</b>              |                           |                          |                            |
| ≤ 44                     | 1 (0,9)                   | 5 (3)                    | 0 (0)                      |
| 45-49                    | 3 (2,7)                   | 9 (5,4)                  | 0 (0)                      |
| 50-54                    | 4 (3,6)                   | 7 (4,2)                  | 1 (1,5)                    |
| 55-59                    | 7 (6,4)                   | 10 (6)                   | 3 (4,5)                    |
| 60-64                    | 10 (9,1)                  | 22 (13,2)                | 5 (7,5)                    |
| ≥65                      | 85 (77,3)                 | 114 (68,3)               | 58 (86,6)                  |
| <b>Sexo</b>              |                           |                          |                            |
| Hombre                   | 67 (60,9)                 | 104 (62,3)               | 43 (64,2)                  |
| Mujer                    | 43 (39,1)                 | 663 (37,7)               | 24 (35,8)                  |
| <b>Origen geográfico</b> |                           |                          |                            |
| Norte                    | 35 (31,8)                 | 47 (28,1)                | 13 (19,4)                  |
| Centro                   | 45 (40,9)                 | 60 (35,9)                | 36 (53,7)                  |
| Sud                      | 30 (27,3)                 | 60 (35,9)                | 18 (26,9)                  |

**Tabla suplementaria 5.1.** Resumen de la calidad de la secuenciación en el que se describe el número de archivos Fastq categorizados en función de la valoración de calidad (verde = valores adecuados; naranja = valores ligeramente alterados; rojo = valores alterados) obtenida mediante el programa FASTQC para cada parámetro analizado.

|                  |                | Estadística básica |     | Calidad de la secuencia por base |     | Calidad por cuadrante de la flowcell |     | Valores promedio de calidad por secuencia |     | Proporción de base por posición |     | Contenido de GC por secuencia en comparación con una distribución normal teórica |     | Contenido de N (veces que no se ha realizado o una lectura) por base |     | Distribución de la longitud de las secuencias |     | Niveles de duplicados por secuencia |     | Secuencias sobrerrepresentadas |     | Contenido de adaptadores |     | Contenido K-mer |     |      |
|------------------|----------------|--------------------|-----|----------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|---|-----|---------------------------------|-----|--|-----|--|-----|---|-----|-------------------------------------|-----|--------------------------------|-----|--------------------------|-----|-----------------|-----|------|
|                  |                | n                  | (%) | n                                | (%) | n                                    | (%) | n   | (%) | n                               | (%) | n  | (%) | n  | (%) | n   | (%) | n                                   | (%) | n                              | (%) | n                        | (%) | n               | (%) |      |
| <b>CASOS</b>     | <b>VERDE</b>   | R1                 | 110 | 100                              | 109 | 99,1                                 | 95  | 86,4                                      | 110 | 100                             | 0   | 0  | 4   | 3,6  | 110 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 110 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | R2                 | 110 | 100                              | 40  | 36,4                                 | 52  | 47,3                                      | 110 | 100                             | 0   | 0  | 4   | 3,6  | 110 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 110 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | Total              | 220 | 100                              | 149 | 67,7                                 | 147 | 66,8                                      | 220 | 100                             | 0   | 0  | 8   | 3,6  | 220 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 220 | 100             | 0   | 0    |
|                  | <b>NARANJA</b> | R1                 | 0   | 0                                | 1   | 0,9                                  | 15  | 13,6                                      | 0   | 0                               | 3   | 2,7  | 53  | 48,2   | 0   | 0   | 110 | 100                                 | 6   | 5,5                            | 92  | 83,6                     | 0   | 0               | 104 | 94,5 |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 32  | 29,1                                 | 57  | 51,8                                      | 0   | 0                               | 0   | 0  | 59  | 53,6   | 0   | 0   | 110 | 100                                 | 25  | 22,7                           | 93  | 84,5                     | 0   | 0               | 100 | 90,9 |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 33  | 15                                   | 72  | 32,7                                      | 0   | 0                               | 3   | 1,4  | 112 | 50,9   | 0   | 0   | 220 | 100                                 | 31  | 14,1                           | 185 | 84,1                     | 0   | 0               | 204 | 92,7 |
|                  | <b>ROJO</b>    | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 0   | 0   | 0   | 0                               | 107 | 97,3   | 53  | 48,2   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 104 | 94,5                           | 18  | 16,4                     | 0   | 0               | 6   | 5,5  |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 38  | 64,5                                 | 1   | 0,9                                       | 0   | 0                               | 110 | 100  | 47  | 42,7   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 85  | 77,3                           | 17  | 15,5                     | 0   | 0               | 10  | 9,1  |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 38  | 17,3                                 | 1   | 0,5                                       | 0   | 0                               | 217 | 98,6   | 100 | 45,5   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 189 | 85,9                           | 35  | 15,9                     | 0   | 0               | 16  | 7,3  |
| <b>CONTROLES</b> | <b>VERDE</b>   | R1                 | 110 | 100                              | 110 | 100                                  | 93  | 84,5                                      | 110 | 100                             | 0   | 0  | 6   | 5,5  | 110 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 110 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | R2                 | 110 | 100                              | 31  | 28,2                                 | 51  | 46,4                                      | 110 | 100                             | 0   | 0  | 5   | 4,5  | 110 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 110 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | Total              | 220 | 100                              | 141 | 64,1                                 | 144 | 65,5                                      | 220 | 100                             | 0   | 0  | 11  | 5  | 220 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 220 | 100             | 0   | 0    |
|                  | <b>NARANJA</b> | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 16  | 14,5                                      | 0   | 0                               | 3   | 2,7  | 66  | 60   | 0   | 0   | 110 | 100                                 | 10  | 9,1                            | 97  | 88,2                     | 0   | 0               | 100 | 90,9 |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 34  | 30,9                                 | 53  | 48,2                                      | 0   | 0                               | 0   | 0  | 71  | 64,5   | 0   | 0   | 110 | 100                                 | 24  | 21,8                           | 98  | 89,1                     | 0   | 0               | 104 | 94,5 |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 34  | 15,5                                 | 69  | 31,4                                      | 0   | 0                               | 3   | 1,4  | 137 | 62,3   | 0   | 0   | 220 | 100                                 | 34  | 15,5                           | 195 | 88,6                     | 0   | 0               | 204 | 92,7 |
|                  | <b>ROJO</b>    | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 1   | 0,9                                       | 0   | 0                               | 107 | 97,3   | 28  | 34,5   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 100 | 90,9                           | 13  | 11,8                     | 0   | 0               | 10  | 9,1  |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 45  | 40,9                                 | 6   | 5,5                                       | 0   | 0                               | 110 | 100  | 34  | 30,9   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 86  | 78,2                           | 12  | 10,9                     | 0   | 0               | 6   | 5,5  |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 45  | 20,5                                 | 7   | 3,2                                       | 0   | 0                               | 217 | 98,6   | 62  | 28,2   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 186 | 84,5                           | 25  | 11,4                     | 0   | 0               | 16  | 7,3  |

**Tabla suplementaria 5.2.** Resumen de la calidad de la secuenciación en el que se describe el número de archivos Fastq categorizados en función de la valoración de calidad (verde = valores adecuados; naranja = valores ligeramente alterados; rojo = valores alterados) obtenida mediante el programa FASTQC para cada parámetro analizado.

|                  |                | Estadística básica |     | Calidad de la secuencia por bases |     | Calidad por cuadrante de la flowcell |     | Valores promedio de calidad por secuencia |     | Proporción de bases por posición |     | Contenido de GC   secuencia en comparación con una distribución normal teórica |     | Contenido de N (veces que no se   realizado una lectura) por base |     | Distribución de la longitud de las secuencias |     | Niveles de duplicados por secuencia |     | Secuencias sobrerrepresentadas |     | Contenido de adaptadores |     | Contenido K-mer |     |      |
|------------------|----------------|--------------------|-----|-----------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|---|-----|----------------------------------|-----|--|-----|---|-----|---|-----|-------------------------------------|-----|--------------------------------|-----|--------------------------|-----|-----------------|-----|------|
|                  |                | n                  | (%) | n                                 | (%) | n                                    | (%) | n   | (%) | n                                | (%) | n  | (%) | n   | (%) | n   | (%) | n                                   | (%) | n                              | (%) | n                        | (%) | n               | (%) |      |
| <b>CASOS</b>     | <b>VERDE</b>   | R1                 | 167 | 100                               | 166 | 99,4                                 | 160 | 95,8                                      | 167 | 100                              | 0   | 0  | 10  | 6   | 167 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 167 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | R2                 | 167 | 100                               | 73  | 43,7                                 | 131 | 78,4                                      | 167 | 100                              | 0   | 0  | 15  | 9   | 167 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 4   | 2,4                      | 167 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | Total              | 334 | 100                               | 239 | 71,6                                 | 291 | 87,1                                      | 334 | 100                              | 0   | 0  | 25  | 7,5   | 334 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 4   | 1,2                      | 334 | 100             | 0   | 0    |
|                  | <b>NARANJA</b> | R1                 | 0   | 0                                 | 1   | 0,6                                  | 7   | 4,2                                       | 0   | 0                                | 8   | 4,8  | 133 | 79,6  | 0   | 0   | 167 | 100                                 | 10  | 6                              | 161 | 96,4                     | 0   | 0               | 149 | 89,2 |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                 | 51  | 30,5                                 | 36  | 21,6                                      | 0   | 0                                | 1   | 0,6  | 135 | 80,8  | 0   | 0   | 167 | 100                                 | 22  | 13,2                           | 157 | 94                       | 0   | 0               | 147 | 88   |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                 | 52  | 15,6                                 | 43  | 12,9                                      | 0   | 0                                | 9   | 2,7  | 268 | 80,2  | 0   | 0   | 334 | 100                                 | 32  | 9,6                            | 318 | 95,2                     | 0   | 0               | 296 | 88,6 |
|                  | <b>ROJO</b>    | R1                 | 0   | 0                                 | 0   | 0                                    | 0   | 0   | 0   | 0                                | 159 | 95,2   | 24  | 14,4  | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 157 | 94                             | 6   | 3,6                      | 0   | 0               | 18  | 10,8 |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                 | 43  | 25,7                                 | 0   | 0   | 0   | 0                                | 166 | 99,4   | 17  | 10,2  | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 145 | 86,8                           | 6   | 3,6                      | 0   | 0               | 20  | 12   |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                 | 43  | 12,9                                 | 0   | 0   | 0   | 0                                | 325 | 97,3   | 41  | 12,3  | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 302 | 90,4                           | 12  | 3,6                      | 0   | 0               | 38  | 11,4 |
| <b>CONTROLES</b> | <b>VERDE</b>   | R1                 | 167 | 100                               | 167 | 100                                  | 78  | 46,7                                      | 167 | 100                              | 0   | 0  | 86  | 51,5  | 167 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 167 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | R2                 | 167 | 100                               | 108 | 64,7                                 | 148 | 88,6                                      | 167 | 100                              | 0   | 0  | 87  | 52,1  | 167 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 3   | 1,8                      | 167 | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | Total              | 334 | 100                               | 275 | 82,3                                 | 226 | 67,7                                      | 334 | 100                              | 0   | 0  | 173 | 51,796  | 334 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 3   | 0,9                      | 334 | 100             | 0   | 0    |
|                  | <b>NARANJA</b> | R1                 | 0   | 0                                 | 0   | 0                                    | 89  | 53,3                                      | 0   | 0                                | 3   | 1,8  | 67  | 40,1  | 0   | 0   | 167 | 100                                 | 10  | 6                              | 159 | 95,2                     | 0   | 0               | 145 | 86,8 |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                 | 34  | 20,4                                 | 18  | 10,8                                      | 0   | 0                                | 0   | 0  | 69  | 41,3  | 0   | 0   | 167 | 100                                 | 21  | 12,6                           | 157 | 94                       | 0   | 0               | 154 | 92,2 |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                 | 34  | 10,2                                 | 107 | 32  | 0   | 0                                | 3   | 0,9  | 136 | 40,7  | 0   | 0   | 334 | 100                                 | 31  | 9,3                            | 316 | 94,6                     | 0   | 0               | 299 | 89,5 |
|                  | <b>ROJO</b>    | R1                 | 0   | 0                                 | 0   | 0                                    | 0   | 0   | 0   | 0                                | 164 | 98,2   | 14  | 8,4   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 157 | 94                             | 8   | 4,8                      | 0   | 0               | 22  | 13,2 |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                 | 25  | 15                                   | 1   | 0,6                                       | 0   | 0                                | 167 | 100  | 11  | 6,6   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 146 | 87,4                           | 7   | 4,2                      | 0   | 0               | 13  | 7,8  |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                 | 25  | 7,5                                  | 1   | 0,3                                       | 0   | 0                                | 331 | 99,102   | 25  | 7,5   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 303 | 90,7                           | 15  | 4,5                      | 0   | 0               | 35  | 10,5 |

**Tabla suplementaria 5.3.** Resumen de la calidad de la secuenciación en el que se describe el número de archivos Fastq categorizados en función de la valoración de calidad (verde = valores adecuados; naranja = valores ligeramente alterados; rojo = valores alterados) obtenida mediante el programa FASTQC para cada parámetro analizado.

|                  |                | Estadística básica |     | Calidad de la secuencia por base |     | Calidad por cuadrante de la flowcell |     | Valores promedio de calidad por secuencia |     | Proporción de base por posición |     | Contenido de GC por secuencia en comparación con una distribución normal teórica |     | Contenido de N (veces que no se ha realizado una lectura) por base |     | Distribución de la longitud de las secuencias |     | Niveles de duplicados por secuencia |     | Secuencias sobrerrepresentadas |     | Contenido de adaptadores |     | Contenido K-mer |     |      |
|------------------|----------------|--------------------|-----|----------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|---|-----|---------------------------------|-----|--|-----|--|-----|---|-----|-------------------------------------|-----|--------------------------------|-----|--------------------------|-----|-----------------|-----|------|
|                  |                | n                  | (%) | n                                | (%) | n                                    | (%) | n   | (%) | n                               | (%) | n  | (%) | n  | (%) | n   | (%) | n                                   | (%) | n                              | (%) | n                        | (%) | n               | (%) |      |
| <b>CASOS</b>     | <b>VERDE</b>   | R1                 | 67  | 100                              | 67  | 100                                  | 62  | 92,5                                      | 67  | 100                             | 0   | 0  | 0   | 0  | 67  | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 67  | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | R2                 | 67  | 100                              | 20  | 29,9                                 | 39  | 58,2                                      | 67  | 100                             | 0   | 0  | 0   | 0  | 67  | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 67  | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | Total              | 134 | 100                              | 87  | 64,9                                 | 101 | 75,4                                      | 134 | 100                             | 0   | 0  | 0   | 0  | 134 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 134 | 100             | 0   | 0    |
|                  | <b>NARANJA</b> | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 5   | 7,5                                       | 0   | 0                               | 5   | 7,5  | 50  | 74,6   | 0   | 0   | 67  | 100                                 | 13  | 19,4                           | 60  | 89,6                     | 0   | 0               | 63  | 94   |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 18  | 26,9                                 | 28  | 41,8                                      | 0   | 0                               | 0   | 0  | 54  | 80,6   | 0   | 0   | 67  | 100                                 | 19  | 28,4                           | 62  | 92,5                     | 0   | 0               | 59  | 88,1 |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 18  | 13,4                                 | 33  | 24,6                                      | 0   | 0                               | 5   | 3,7  | 104 | 77,6   | 0   | 0   | 134 | 100                                 | 32  | 23,9                           | 122 | 91                       | 0   | 0               | 122 | 91   |
|                  | <b>ROJO</b>    | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 0   | 0   | 0   | 0                               | 62  | 92,5   | 17  | 25,4   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 54  | 80,6                           | 7   | 10,4                     | 0   | 0               | 4   | 6    |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 29  | 43,3                                 | 0   | 0   | 0   | 0                               | 67  | 100  | 13  | 19,4   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 48  | 71,6                           | 5   | 7,5                      | 0   | 0               | 8   | 11,9 |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 29  | 21,6                                 | 0   | 0   | 0   | 0                               | 129 | 96,3   | 30  | 22,4   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 102 | 76,1                           | 12  | 9                        | 0   | 0               | 12  | 9    |
| <b>CONTROLES</b> | <b>VERDE</b>   | R1                 | 67  | 100                              | 67  | 100                                  | 61  | 91  | 67  | 100                             | 0   | 0  | 6   | 9  | 67  | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 67  | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | R2                 | 67  | 100                              | 28  | 41,8                                 | 43  | 64,2                                      | 67  | 100                             | 0   | 0  | 10  | 14,9   | 67  | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 67  | 100             | 0   | 0    |
|                  |                | Total              | 134 | 100                              | 95  | 70,9                                 | 104 | 77,6                                      | 134 | 100                             | 0   | 0  | 16  | 11,9   | 134 | 100   | 0   | 0                                   | 0   | 0                              | 0   | 0                        | 134 | 100             | 0   | 0    |
|                  | <b>NARANJA</b> | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 6   | 9   | 0   | 0                               | 3   | 4,5  | 42  | 62,7   | 0   | 0   | 67  | 100                                 | 2   | 3                              | 59  | 88,1                     | 0   | 0               | 61  | 91   |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 21  | 31,3                                 | 24  | 35,8                                      | 0   | 0                               | 0   | 0  | 41  | 61,2   | 0   | 0   | 67  | 100                                 | 3   | 4,5                            | 59  | 88,1                     | 0   | 0               | 62  | 92,5 |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 21  | 15,7                                 | 30  | 22,4                                      | 0   | 0                               | 3   | 2,2  | 83  | 61,9   | 0   | 0   | 134 | 100                                 | 5   | 3,7                            | 118 | 88,1                     | 0   | 0               | 123 | 91,8 |
|                  | <b>ROJO</b>    | R1                 | 0   | 0                                | 0   | 0                                    | 0   | 0   | 0   | 0                               | 64  | 95,5   | 19  | 28,4   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 65  | 97                             | 8   | 11,9                     | 0   | 0               | 6   | 9    |
|                  |                | R2                 | 0   | 0                                | 18  | 26,9                                 | 0   | 0   | 0   | 0                               | 67  | 100  | 16  | 23,9   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 64  | 95,5                           | 8   | 11,9                     | 0   | 0               | 5   | 7,5  |
|                  |                | Total              | 0   | 0                                | 18  | 13,4                                 | 0   | 0   | 0   | 0                               | 131 | 97,8   | 35  | 26,1   | 0   | 0   | 0   | 0                                   | 129 | 96,3                           | 16  | 11,9                     | 0   | 0               | 11  | 8,2  |

**Tabla suplementaria 6.1.** Visión general de los resultados obtenidos de cada módulo de calidad analizado con el programa FastQC para cada uno de los dos archivos generados para cada uno de los casos analizados en esta tesis. El color verde indica que la calidad es correcta; el color naranja advierte de que la calidad de ese módulo no es del todo correcta y el color rojo indica que la calidad de ese módulo es incorrecta.

| Enfermedad | Muestra | Número de ciclo | Estadística básica | Calidad de la secuencia por base | Calidad por cuadrante de la <i>flowcell</i> | Valores promedio de calidad por secuencia | Proporción de base por posición | Contenido de GC por secuencia en comparación con una distribución normal teórica | Contenido de N (veces que no se ha realizado una lectura) por base | Distribución de la longitud de las secuencias | Niveles de duplicados por secuencia | Secuencias sobrerepresentadas | Contenido de adaptadores | Contenido <i>K-mer</i> |
|------------|---------|-----------------|--------------------|----------------------------------|---|---|---------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|
| ACV        | C101    | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Naranja                |
|            |         | 2               | Verde              | Verde                            | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Naranja                |
| ACV        | C108    | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Rojo                   |
|            |         | 2               | Verde              | Verde                            | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Verde                  |
| ACV        | C109    | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Naranja                |
|            |         | 2               | Verde              | Naranja                          | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Naranja                |
| ACV        | C111    | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Naranja                |
|            |         | 2               | Verde              | Verde                            | Verde                                       | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Naranja                |
| ACV        | C121    | 1               | Verde              | Verde                            | Naranja                                     | Verde                                     | Rojo                            | Rojo   | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                       | Verde                    | Naranja                |

|     |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C122 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C124 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C126 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C131 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Yellow | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C132 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C136 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C139 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C142 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C149 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C15  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C151 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C156 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C161 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C163 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |

|     |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C17  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C173 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C176 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C186 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C187 | 1 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C199 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C2   | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C20  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| ACV | C202 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C208 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C21  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C214 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C217 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C219 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |



|     |      |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C220 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C221 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C223 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C225 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C229 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C232 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C235 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C236 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C238 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C239 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C243 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C244 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C245 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C246 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|     |      |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C247 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C250 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C253 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C254 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C256 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C257 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C258 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C262 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C272 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C273 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C274 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C279 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C281 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C282 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|     |      |   |       |        |        |       |     |        |       |        |     |        |       |        |
|-----|------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|-----|--------|-------|--------|
|     |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
| ACV | C283 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C285 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C286 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C287 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C290 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C292 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Red    |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C293 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C294 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C295 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C30  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C300 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C302 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C303 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C307 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |

|     |      |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C308 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C309 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C311 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C312 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C313 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C319 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C321 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C323 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C331 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C334 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C335 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C338 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C339 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | C34  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|     |      |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C347 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C348 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C349 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| ACV | C350 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C42  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Red    |
| ACV | C45  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C46  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C48  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C5   | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C53  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C56  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C6   | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C60  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C63  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|     |      |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | C65  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Red    | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Red    |
| ACV | C66  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C71  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C79  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C8   | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C86  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | C91  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI  | C1   | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI  | C10  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI  | C100 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Red    |
|     |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Red    |
| MI  | C102 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Red    |
|     |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI  | C106 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Red    |
|     |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI  | C11  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI  | C110 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |

|    |      |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C112 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C114 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C115 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C116 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C12  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C120 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C123 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C125 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C127 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C133 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C134 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C138 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C14  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C140 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|    |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |        |        |
|----|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| MI | C143 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
| MI | C145 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green  | Yellow |
| MI | C146 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| MI | C147 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| MI | C152 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| MI | C153 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
|    |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
| MI | C154 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |        |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |        |
| MI | C158 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| MI | C159 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
| MI | C16  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
| MI | C164 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| MI | C165 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
|    |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Red    |
| MI | C166 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green  | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green  | Yellow |
| MI | C168 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green  | Yellow |



|    |      |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|----|------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| MI | C169 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| MI | C171 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| MI | C172 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C174 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C175 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C177 | 1 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | C178 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C179 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C18  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C180 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C181 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C182 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| MI | C188 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C189 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|    |      |   |       |        |        |       |        |        |        |        |        |        |       |        |
|----|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C190 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C191 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C192 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Green  | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C193 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Yellow | Red    | Green  | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C194 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C195 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C196 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C197 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C198 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C200 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C201 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C203 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C204 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Green  | Green  | Yellow | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C205 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green  | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |



|    |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|----|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C24  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C240 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C241 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C242 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C248 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| MI | C249 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C25  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C251 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | C255 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | C259 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | C26  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C261 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | C264 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | C265 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|    |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|----|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C266 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C268 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C269 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C27  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C270 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C275 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C276 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C277 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C278 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C284 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C288 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C289 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C291 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C296 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|    |      |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|----|------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C299 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C3   | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C301 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C304 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| MI | C305 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C310 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C314 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C315 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C318 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C32  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C322 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C324 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C325 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C326 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|    |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|----|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C327 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C328 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C329 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C33  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C330 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C332 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C333 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C337 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C343 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C344 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C345 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| MI | C35  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C36  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | C37  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|    |     |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|-----|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C38 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C4  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C40 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C41 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C43 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C44 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C47 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C51 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C52 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C54 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C55 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C57 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C58 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | C59 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |





|       |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-------|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI    | C9   | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI    | C90  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI    | C92  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI    | C94  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI    | C95  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI    | C97  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C103 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C104 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C105 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C107 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C113 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C117 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C118 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C119 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|       |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |        |        |
|-------|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C128 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green  | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |        |
| AMBAS | C129 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |        |
| AMBAS | C13  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C130 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C135 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C137 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C141 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C144 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C148 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C150 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C155 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C157 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C160 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |
| AMBAS | C162 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green  | Yellow |

|       |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-------|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C167 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C170 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C183 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C184 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Red   | Green  |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C185 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C19  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C209 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C211 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C212 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | C216 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C218 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C224 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C227 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C237 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |

|       |      |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|-------|------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | C267 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | C271 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | C28  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C280 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C29  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C297 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C306 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C31  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | C316 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C320 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | C336 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C340 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C341 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C342 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|       |      |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-------|------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | C346 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | C39  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Red    |
| AMBAS | C49  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C50  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C61  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | C62  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C75  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | C78  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C80  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C81  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C82  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C83  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C87  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | C89  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|       |     |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|-----|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|       |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | C93 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | C98 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | C99 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |     | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Tabla suplementaria 6.2.** Visión general de los resultados obtenidos de cada módulo de calidad analizado con el programa FastQC para cada uno de los dos archivos generados para cada uno de los controles analizados en esta tesis. El color verde indica que la calidad es correcta; el color naranja advierte de que la calidad de ese módulo no es del todo correcta y el color rojo indica que la calidad de ese módulo es incorrecta.

| Enfermedad | Muestra | Número de ciclo | Estadística básica | Calidad de la secuencia por base | Calidad por cuadrante de la flowcell | Valores promedio de calidad por secuencia | Proporcion de base por posición | Contenido de GC por secuencia en comparación con una distribución normal teórica | Contenido de N (veces que no se ha realizado una lectura) por base | Distribución de la longitud de las secuencias | Niveles de duplicados por secuencia | Secuencias sobrerrepresentadas | Contenido de adaptadores | Contenido K-mer |
|------------|---------|-----------------|--------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------|
| ACV        | CL101   | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                        | Verde                    | Naranja         |
|            |         | 2               | Verde              | Rojo                             | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                        | Verde                    | Naranja         |
| ACV        | CL108   | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                        | Verde                    | Naranja         |
|            |         | 2               | Verde              | Naranja                          | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                        | Verde                    | Naranja         |
| ACV        | CL109   | 1               | Verde              | Verde                            | Naranja                              | Verde                                     | Rojo                            | Verde  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                        | Verde                    | Naranja         |
|            |         | 2               | Verde              | Verde                            | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Verde  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                        | Verde                    | Rojo            |
| ACV        | CL111   | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Rojo                           | Verde                    | Naranja         |
|            |         | 2               | Verde              | Verde                            | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Rojo                           | Verde                    | Naranja         |
| ACV        | CL121   | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Rojo   | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Rojo                           | Verde                    | Naranja         |
|            |         | 2               | Verde              | Naranja                          | Naranja                              | Verde                                     | Rojo                            | Rojo   | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Rojo                           | Verde                    | Naranja         |
| ACV        | CL122   | 1               | Verde              | Verde                            | Verde                                | Verde                                     | Rojo                            | Naranja  | Verde  | Naranja                                       | Rojo                                | Naranja                        | Verde                    | Naranja         |



|     |       |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL124 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL126 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL131 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL132 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL136 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL139 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL142 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL149 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL15  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL151 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL156 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL161 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL163 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL17  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|     |       |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|-------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL173 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL176 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL186 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| ACV | CL187 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL199 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL2   | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL20  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL202 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL208 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL21  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL214 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL217 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL219 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL220 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|     |       |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|-------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL221 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL223 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL225 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL229 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL232 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL235 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL236 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL238 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| ACV | CL239 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL243 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL244 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL245 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL246 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|     |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL247 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |

|     |       |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|-------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| ACV | CL250 | 1 | Green | Green  | Red    | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Red    | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL253 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Red    | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL254 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL256 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL257 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL258 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL262 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL272 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL273 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL274 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL279 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL281 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL282 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Red    | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL283 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|     |       |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|-------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL285 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL286 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL287 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL290 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL292 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL293 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL294 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL295 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL30  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL300 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL302 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL303 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL307 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL308 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Red    |

|     |       |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL309 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL311 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL312 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL313 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL319 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL321 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL323 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL331 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL334 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL335 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL338 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL339 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL34  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL347 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|     |       |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL348 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL349 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL350 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL42  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL45  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL46  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL48  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL5   | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL53  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL56  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL6   | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL60  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL63  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACV | CL65  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|     |       |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|-----|-------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL66  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL71  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL79  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL8   | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| ACV | CL86  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| ACV | CL91  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI  | CL1   | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI  | CL10  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Red    |
|     |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Red    |
| MI  | CL100 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI  | CL102 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI  | CL106 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI  | CL11  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI  | CL110 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|     |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI  | CL112 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |





|    |       |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|-------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL145 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL146 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL147 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL152 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL153 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL154 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL158 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL159 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL16  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL164 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL165 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL166 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL168 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL169 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|    |       |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|-------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL171 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL172 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL174 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL175 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL177 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL178 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL179 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL18  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL180 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL181 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL182 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL188 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL189 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL190 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|    |       |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|----|-------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL191 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL192 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL193 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL194 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL195 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL196 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL197 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL198 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL200 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL201 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL203 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL204 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL205 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL206 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|    |       |   |       |        |        |       |     |        |       |        |     |        |       |        |
|----|-------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|-----|--------|-------|--------|
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL207 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL210 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL213 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL215 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL22  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL222 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL226 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL228 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL23  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL230 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL231 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
| MI | CL233 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL234 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL24  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |

|    |       |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|-------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL240 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL241 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL242 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL248 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL249 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL25  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL251 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL255 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL259 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL26  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL261 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL264 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL265 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL266 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|    |       |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|----|-------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL268 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL269 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL27  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL270 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL275 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL276 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL277 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL278 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL284 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL288 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL289 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL291 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL296 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL299 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |

|    |       |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|----|-------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| MI | CL3   | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL301 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL304 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL305 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL310 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL314 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL315 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL318 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL32  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL322 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL324 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL325 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | CL326 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL327 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |



|    |       |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|----|-------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL328 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| MI | CL329 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL33  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL330 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL332 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL333 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Red    |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| MI | CL337 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL343 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL344 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL345 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL35  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL36  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL37  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|    |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| MI | CL38  | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|    |      |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----|------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL4  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL40 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL41 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL43 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL44 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL47 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL51 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL52 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL54 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL55 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL57 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL58 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL59 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|    |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI | CL64 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |



|       |       |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|-------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI    | CL90  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI    | CL92  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI    | CL94  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI    | CL95  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MI    | CL97  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL103 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL104 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL105 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL107 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL113 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL117 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL118 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL119 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |       | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL128 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|       |       |   |       |        |        |       |        |        |       |        |        |        |       |        |
|-------|-------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL129 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | CL13  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL130 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL135 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green  | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green  | Green | Yellow |
| AMBAS | CL137 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL141 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | CL144 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL148 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL150 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL155 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL157 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL160 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL162 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL167 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |

|       |       |   |       |        |        |       |        |        |       |        |     |        |       |        |
|-------|-------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-----|--------|-------|--------|
|       |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL170 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL183 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL184 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL185 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL19  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | CL209 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL211 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL212 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
|       |       | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | CL216 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL218 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL224 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL227 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL237 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL267 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |

|       |       |   |       |        |        |       |        |        |       |        |     |        |       |        |
|-------|-------|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-----|--------|-------|--------|
|       |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL271 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
|       |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL28  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL280 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL29  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | CL297 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | CL306 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL31  | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | CL316 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Red    |
|       |       | 2 | Green | Red    | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | CL320 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL336 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL340 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red    | Red    | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL341 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Green  | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL342 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
|       |       | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL346 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red    | Yellow | Green | Yellow | Red | Yellow | Green | Yellow |

|       |      |   |       |        |        |       |     |        |       |        |        |        |       |        |
|-------|------|---|-------|--------|--------|-------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Red    |
| AMBAS | CL39 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL49 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL50 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL61 | 1 | Green | Green  | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Yellow | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Yellow | Red    | Green | Yellow |
| AMBAS | CL62 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL75 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Red    | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL78 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL80 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL81 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL82 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL83 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Yellow | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL87 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL89 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
|       |      | 2 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Yellow | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |
| AMBAS | CL93 | 1 | Green | Green  | Green  | Green | Red | Red    | Green | Yellow | Red    | Yellow | Green | Yellow |



|       |      |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|       |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL98 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| AMBAS | CL99 | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       |      | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Tabla suplementaria 7. Haplotipo y haplogrupo de todos los individuos analizados.

| ECV | ID  | Hg  | Homoplasmas   | Heteroplasmas          |
|-----|-----|-----|---|------------------------|
| ACV | C2  | U6  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3348G 4769G<br>7028T 8860G 8888C 10397G 11719A 11947G<br>12308G 12372A 12501A 12530G 14518G<br>14766T 15326G 16172C 16172T 16188T<br>16219G 16311C  | 4336C 11467G<br>12418d |
| ACV | C5  | U5  | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3197C<br>4769G 5656G 7028T 7768G 8435G 9477A<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13617C<br>14182C 15326G 16189C 16261T 16270T<br>16291T 16311C  | 9948A 16192T           |
| ACV | C6  | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 4733C 4769G 8860G<br>12879C 15326G 15924G 16519C  | 1040C                  |
| ACV | C8  | U5  | 53A 55A 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G<br>3197C 4769G 5656G 7028T 7768G 8860G<br>9477A 11467G 11719A 11914A 12308G<br>12372A 13617C 14071G 14182C 14766T<br>15191C 15326G 16183C 16189C 16270T<br>16311C 16336A                                 |                        |
| ACV | C15 | H24 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16293G 16519C   |                        |
| ACV | C17 | H1  | 263G 750G 1438G 2861G 3010A 3107C 4216C<br>4769G 8860G 12013G 13878G 15326G<br>16519C   |                        |
| ACV | C20 | T1  | 73G 152C 195C 263G 709A 750G 1438G<br>1888A 2706G 4216C 4769G 4917G 7028T<br>8697A 8860G 9899C 10463C 11251G 11719A<br>12633A 13359A 13368A 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16163G 16186T 16189C 16261T 16294T<br>16519C | 204C 8948C             |
| ACV | C21 | HV0 | 195C 263G 750G 1438G 2652A 2706G 4769G<br>7028T 8860G 9293T 10609C 15326G 15454C<br>16298C  | 146C                   |
| ACV | C30 | J1  | 73G 185A 188G 228A 263G 295T 462T 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 3107C 3290C<br>4216C 4769G 7028T 7941G 8860G 9615C<br>10398G 11251G 11719A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 15947G<br>16069T 16126C                                | 16129A                 |

|     |     |     |   |
|-----|-----|-----|---|
| ACV | C34 | R0a | 64T 263G 451G 750G 1438G 3107C 3275A<br>4769G 7028T 8860G 9620T 11969A 13188T<br>14668T 14766T 14905A 15326G 16126C<br>16362C   |
| ACV | C42 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3394C 4209C 4733C<br>4769G 5426C 8860G 15326G 16129A 16519C   |
| ACV | C45 | H3  | 263G 750G 1438G 2581G 4769G 6776C 8860G<br>15326G 16129A 16519C   |
| ACV | C46 | H1  | 263G 750G 1438G 1780C 3010A 3107C 4769G<br>5460A 8512G 8860G 9438A 13326C 14902T 2534A 7245G<br>15326G 16124C 16519C  |
| ACV | C48 | H2  | 93G 263G 8860G 14037G 15326G 16235GG 10003C 12418d<br>16291T  |
| ACV | C53 | H3  | 263G 709A 750G 1438G 3107C 3970T 4769G<br>6776C 8860G 9254G 10128T 14662G 15326G<br>16519C  |
| ACV | C56 | K1  | 73G 152C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4769G 7028T<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 11299C 16359C<br>11467G 11719A 12308G 12372A 14167T<br>14696G 14766T 14798C 15326G 15928A<br>16184T 16224C 16311C 16519C                                    |
| ACV | C60 | M1  | 73G 195C 263G 489C 750G 1438G 2706G<br>3107C 4769G 6446A 6680C 7028T 8701G<br>8860G 9540C 10398G 10400T 10873C 10895A<br>11719A 12403T 12705T 12950C 13111C<br>14110CC 14766T 14783C 15043AA 15301A<br>15326G 16129A 16183C 16189C 16223T<br>16249C 16311C 16399GG 16519C |
| ACV | C63 | H1  | 146C 263G 750G 1438G 3010A 4769G 7870C<br>8860G 10454C 15326G 16519C  |
| ACV | C65 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 4733C 4769G 8860G<br>15326G 16129A 16519C   |

|     |      |     |   |        |
|-----|------|-----|---|--------|
| ACV | C66  | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 5231A 5773A<br>7028T 8860G 9055A 9698C 9725C 10398G<br>10550G 11025C 11299C 11467G 11719A<br>12308G 12372A 14167T 14766T 14798C<br>15326G 16215G 16224C 16311C 16519C             |        |
| ACV | C71  | H1  | 150T 263G 711C 750G 1438G 3010A 4769G<br>5460A 8512G 8860G 14902T 15326G 16519C   |        |
| ACV | C79  | H1  | 93G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 9210G 14869A 15326G 16169T 16519C  |        |
| ACV | C86  | J1  | 73G 242T 263G 295T 462T 489C 750G 801G<br>1438G 2158C 2706G 3010A 4216C 4769G<br>5460A 7028T 8269A 8557A 8860G 10398G<br>11251G 11719A 12007A 12612A 13708A<br>13879C 14022G 14766T 15326G 15452A<br>16069T 16126C 16145A 16172C 16222T<br>16261T | 15777A |
| ACV | C91  | J2  | 73G 150T 152C 263G 295T 489C 750G 1438G<br>2706G 3107C 4216C 4769G 5633T 7028T<br>7476T 8860G 10172A 10398G 11251G 11719A<br>12612A 13708A 14766T 15257A 15326G<br>15452A 15519C 15812A 16069T 16126C<br>16193T 16278T                            | 15596A |
| ACV | C101 | J1  | 73G 263G 295T 462T 482C 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 3394C 4216C 4769G 7028T<br>8860G 10398G 11251G 11719A 12612A<br>13194A 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 15670C 16069T 16126C  | 9575A  |
| ACV | C108 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3197C 4769G<br>5108C 7028T 8860G 9469T 9477A 10619T<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13617C<br>14766T 14793G G 15326G 16256T 16270T<br>16320T 16526A  |        |
| ACV | C109 | J1  | 73G 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 4216C 4769G 7028T 8860G<br>9632G 10398G 11251G 11719A 12083G<br>12612A 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C  |        |
| ACV | C111 | H13 | 263G 750G 1438G 2222C 2259T 3921T 4745G<br>4769G 6570T 7337A 8860G 13326C 13680T<br>14221C 14872T 15326G  | 13009A |

|     |      |     |  |  |
|-----|------|-----|--|--|
| ACV | C121 | T1  | 73G 263T 709A 750G 1438G 1888A 2706G<br>3106d 4216C 4769G 4917G 7028T 8697A<br>8860G 10463CC 11719A 12633AA 13368AA<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607GG<br>15928AA 16126C 16163GG 16189C 16243C<br>16294TT 16519C | 10861C 10867T<br>10873C 10885C<br>10891G 10993A<br>11251G 16180d<br>16183C |
| ACV | C122 | V1  | 263G 750G 1438G 3543T 4580A 4639C 4769G<br>7028T 8860G 8869G 15301A 15326G 15904TT<br>16111TT 16298CC 16519C   | 12418d   |
| ACV | C124 | T2  | 709A 930A 1438G 1888A 2706G 4216C 4769G<br>4917G 5147A 7028T 8697A 8860G 10750GG<br>11251G 11719A 13368AA 14766T 15326G<br>15452A 15928AA 16126C 16294TT 16296TT<br>16304CC  | 73G 750G 15607G  |
| ACV | C126 | HV0 | 263G 750G 1438G 2706G 3010A 4216C 4769G<br>4805T 7028T 8860G 12007A 15326G 16293G<br>16519C  | 73G 185A 189G<br>228A 462T 489C<br>553T 789C 4157T<br>9010A 13780G         |
| ACV | C131 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 9007G<br>15133G 15326G 15928AA   | 3106d 8860G  |
| ACV | C132 | H3  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C 8860G<br>15326G 16519C   | 4157T 4823G  |
| ACV | C136 | H3  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C 8860G<br>10915C 11770C 15326G 16519C   |  |
| ACV | C139 | H3  | 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>15326G 15777A 15885T 16111T 16189C<br>16299G 16519C   |  |
| ACV | C142 | X2  | 73G 153G 195C 225A 226C 263G 750G 813G<br>1438G 1719A 2706G 3107C 4044G 4769G<br>6221C 6371T 7028T 8393T 8860G 11719A<br>12705T 13708A 13966G 14470C 14766T<br>15326G 15927A 16183C 16189C 16223T<br>16278T 16519C   |  |
| ACV | C149 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4029T 4769G<br>5460A 8269A 8512G 8860G 11203T 13135A<br>13179T 14902T 15326G 15514C 16162G<br>16519C   | 10535C   |

|     |      |     |   |   |
|-----|------|-----|---|---|
| ACV | C151 | H3  | 263G 293C 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>12346T 15326G 15530C 16519C   | 12470C                                    |
| ACV | C156 | J2  | 73G 150T 152C 263G 295T 489C 750G 1438G<br>2706G 4216C 4769G 5633T 7028T 7476T<br>8860G 10172A 10398G 11251G 11719A<br>12612A 13708A 14766T 15257A 15326G<br>15452A 15812A 16069T 16126C 16193T<br>16278T   | 204C 8948C                                |
| ACV | C161 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3197C 4769G<br>8860G 9477A 11719A 12308G 12346T 12372A<br>13105G 13617C 14766T 14793G G 14801G<br>15218G 15326G 16256T 16270T 16399G  | 4157T 15546G                              |
| ACV | C163 | H20 | 263G 292C 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>11353C 15172A 15326G 16218T 16328A<br>16362C  | 8269A                                     |
| ACV | C173 | V3  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 12810G 12840T 15326G<br>15431A 15904T 16240G 16298C  | 1205C 3244A                               |
| ACV | C176 | H5  | 263G 456T 750G 1438G 3107C 4336C 4769G<br>8860G 9531G 12864C 15326G 15833T 16193T<br>16304C   | 13437C                                    |
| ACV | C186 | H5  | 93G 263G 456T 513A 750G 1438G 4336C<br>4769G 8860G 9123A 10915C 15326G 15884A<br>16304C 16311C 16519C   | 12541A                                    |
| ACV | C187 | H5  | 263G 456T 750G 1438G 4336C 4769G 8860G<br>9531G 12864C 15326G 15769G 15833T<br>16193T 16304C  |   |
| ACV | C199 | J2  | 73G 150T 152C 195C 215G 263G 295T 319C<br>489C 750G 1438G 2392C 3106d 4216C 4769G<br>7028T 7476T 8860G 10398GG 10499GG<br>11251GG 11377AA 11719A 12612AG 13708A<br>13722G 14133G 14766T 15257A 15326G<br>15452A 16069T 16126C 16145A 16231C<br>16261T | 295T 513A 514d<br>7789A 12418d            |
| ACV | C202 | K1  | 73G 152C 263G 497T 568d 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4769G 6260A<br>7028T 8860G 9698C 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11485CC 11719A 11840TT 12308G<br>12372A 13740CC 14167T 14766T 15326G<br>16224C 16311C 16519C                      | 568d 7912A<br>9055A 9168T<br>9325C 14798C |

|     |      |     |  |                             |
|-----|------|-----|--|-----------------------------|
| ACV | C208 | T2  | 73G 263G 709A 750G 1438G 1888A 2706G<br>4216C 4769G 4917G 5147A 6890G 7028T<br>8697A 8860G 10003C 10463C 11251G 11719A<br>11812G 13368A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16294T 16296T 16304C 16519C  |                             |
| ACV | C214 | H11 | 195C 263G 750G 961G 1438G 4769G 8448C<br>8541A 8860G 13759A 15326G 16293G 16311C   | 1398C                       |
| ACV | C217 | H1  | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 11864C 15326G 16519C   | 460A 463T 4157T             |
| ACV | C219 | H1  | 152C 263G 750G 789C 1438G 3010A 3107C<br>4769G 5460A 7080C 8227C 8251A 8512G<br>8860G 10583G 15326G 16185T 16519C  |                             |
| ACV | C220 | H4  | 263G 750G 1438G 3992T 4024G 4769G 5004C<br>8860G 9123A 14365 14582 15326G 16311C<br>16319  | 4948C 8654C                 |
| ACV | C221 | H6  | 93G 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A<br>4727G 4769G 8860G 9380A 11253C 15326G<br>16147T 16362C 16482G  |                             |
| ACV | C223 | H3  | 152C 263G 537T 750G 1438G 3106d 4769G<br>6776C 8817G 8860G 14687G 15326G 16124C<br>16519C  | 2968G 3010A<br>3030G        |
| ACV | C225 | U2  | 73G 152C 189G 217C 263G 340T 508G 750G<br>1438G 1811G 2524C 2706G 3107C 3720G<br>3736A 4769G 5390G 5426C 6045T 6152C<br>7028T 7151T 10876G 11176A 11467G 11719A<br>12308G 12346T 12372A 13020C 13734C<br>14766T 14974A 15326G 15907G 16051G<br>16129C 16189C 16362C 16519C | 515d 3010A<br>15099C 16189C |
| ACV | C229 | H1  | 150T 263G 750G 1438G 2220 3010A 3107C<br>4769G 5460A 8512G 8860G 14902T 15326G<br>16519C   | 64T                         |
| ACV | C232 | U5  | 73G 150T 195C 263G 636G 750G 1438G<br>2706G 3107C 3144G 3197C 4769G 5656G<br>7028T 7768G 8860G 9477A 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13617C 14182C 14766T<br>15326G 16270T 16519C   |                             |

|     |      |    |  |                           |
|-----|------|----|--|---------------------------|
| ACV | C235 | H2 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16519C   | 150T 152C 8225G<br>13277C |
| ACV | C236 | U6 | 73G 152C 263G 750G 1438G 2706G 3348G<br>4769G 6620C 7028T 7805A 8407A 8557A<br>8860G 9779T 10685A 10700G 11467G 11719A<br>11734G 12308G 12372A 13440T 14179G<br>14766T 15326G 15355A 16172C 16219G<br>16271C 16278T  | 11839C 16129A             |
| ACV | C238 | T1 | 73G 152C 195C 263G 709A 750G 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4769G 4917G<br>7028T 8697A 8860G 9899C 10463C 11251G<br>11719A 12633A 13368A 14110C 14198A<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16163G 16186T 16189C<br>16294T 16362C 16519C |                           |
| ACV | C239 | J1 | 73G 185A 188G 228A 263G 295T 462T 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 4216C 4769G<br>7028T 8860G 10398G 11251G 11719A 12612A<br>12841G 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C 16148T 16235G<br>16519C  | 689C                      |
| ACV | C243 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>6365C 8860G 15326G 16162G 16209C<br>16293G 16519C   |                           |
| ACV | C244 | K1 | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 7028T 7559G<br>8440G 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G<br>11299C 11467G 11719A 12308G 12372A<br>13117G 14167T 14766T 14798C 15326G<br>15577T 16224C 16311C 16519C                              | 16093C                    |
| ACV | C245 | U5 | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3197C 3498T 4769G 5656G 6674C 7028T<br>7768G 8860G 9477A 10547T 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13617C 13713A 14182C<br>14766T 15326G 15777A 15916C 15924G<br>16167T 16192T 16270T 16311C 16318G<br>16356C 16399G     |                           |
| ACV | C246 | I2 | 73G 152C 199C 204C 207A 250C 263G 750G<br>1438G 1719A 2706G 3107C 4529T 4769G<br>7028T 8251A 8860G 9266A 10034C 10238C<br>10398G 11065G 11719A 12501A 12705T<br>13780G 14766T 15043A 15326G 15758G<br>15924G 16129A 16145A 16223T 16391A<br>16519C           |                           |



|     |      |     |   |               |
|-----|------|-----|---|---------------|
| ACV | C247 | T2  | 73G 207A 263G 709A 750G 930A 1438G<br>1888A 2706G 3398C 4216C 4769G 4917G<br>5147A 7028T 8697A 8740T 8860G 10463C<br>10739G 11251G 11719A 11812G 13368A<br>14233G 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16126C 16294T 16519C   | 14127G 14463C |
| ACV | C250 | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 6260A 7028T<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11485C 11719A 11840T 11944C<br>12308G 12372A 13740C 14167T 14766T<br>14798C 15326G 16176T 16224C 16311C<br>16519C                             | 2960C         |
| ACV | C253 | H1  | 152C 199C 263G 268T 750G 1438G 3010A<br>3107C 4769G 8860G 11864C 15326G 15498A<br>16519C  |               |
| ACV | C254 | H44 | 195C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 5048C<br>5442C 8860G 13662T 15326G 16343T 16519C   | 16357C        |
| ACV | C256 | H7  | 263G 750G 1438G 2833G 4769G 4793G<br>8860G 11881T 14002G 15326G 16335G  |               |
| ACV | C257 | U5  | 73G 150T 194T 263G 750G 1438G 2706G<br>3197C 4769G 5656G 6216C 7028T 7080C<br>7768G 8860G 9477A 10398G 10586A 11467G<br>11719A 12308G 12372A 13617C 14182C<br>14766T 15191C 15326G 16172C 16189C<br>16270T 16311C 16519C  |               |
| ACV | C258 | U2  | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3116T 3720G 4769G<br>5390G 5426C 6045T 6152C 7028T 8860G<br>10876G 11197T 11467G 11719A 11732C<br>12308G 12372A 13020C 13734C 14016A<br>14766T 15326G 15907G 16051G 16129A<br>16183C 16189C 16264T 16362C 16519C |               |
| ACV | C262 | H6  | 239C 263G 750G 1005C 1438G 2581G 3107C<br>3915A 4727G 4769G 6261A 7805A 8860G<br>9380A 11253C 15326G 16291T 16362C  | 150T          |
| ACV | C272 | T1  | 73G 152C 195C 263G 709A 750G 1438G<br>1453G 1888A 2706G 3107C 4216C 4769G<br>4917G 7028T 8697A 8860G 9899C 10463C<br>11251G 11719A 12633A 13368A 14766T<br>14905A 15326G 15452A 15607G 15928A<br>16126C 16163G 16189C 16294T 16519C   | 15447C        |

|     |      |     |  |              |
|-----|------|-----|--|--------------|
| ACV | C273 | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 5153G 6260A<br>7028T 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G<br>11299C 11467G 11485C 11719A 11840T<br>12308G 12372A 13740C 14053G 14167T<br>14577 14766T 14798C 15326G 15777A<br>16186T 16224C 16311C 16519C |              |
| ACV | C274 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>10007C 15326G 16172C 16519C   | 11087C       |
| ACV | C279 | J1  | 73G 199C 263G 295T 462T 489C 574T 750G<br>1438G 2706G 3010A 3107C 4216C 4769G<br>7028T 8269A 8860G 10398G 10589A 11251G<br>11719A 12612A 13105G 13626T 13708A<br>14569A 14766T 15326G 15452A 15712G<br>16069T 16126C 16145A 16222T 16256T<br>16261T 16278T           |              |
| ACV | C281 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>8865A 14004T 15326G 16519C  | 7224C 16093C |
| ACV | C282 | H17 | 263G 750G 1438G 2438G 3107C 3915A 4769G<br>8860G 15326G 16129A 16400T 16519C   |              |
| ACV | C283 | I2  | 73G 146C 152C 199C 204C 207A 250C 263G<br>750G 1438G 1719A 2706G 2835 3107C 4529T<br>4769G 7028T 8251A 8860G 10034C 10238C<br>10398G 11065G 11719A 12501A 12705T<br>13780G 14766T 15043A 15326G 15924G<br>16074G 16129A 16145A 16223T 16391A<br>16519C               | 9369C        |
| ACV | C285 | J2  | 73G 150T 195C 263G 295T 489C 750G 1438G<br>2706G 3107C 4216C 4769G 5493C 6671C<br>7028T 7076G 7476T 8860G 8958G 10398G<br>10499G 11002G 11016A 11251G 11377A<br>11719A 12570G 12612A 13708A 14766T<br>15148A 15257A 15326G 15452A 15679G<br>16069T 16126C            |              |
| ACV | C286 | H5  | 93G 263G 456T 513A 750G 1438G 4336C<br>4769G 8860G 9123A 10915C 15326G 15884A<br>16304C 16519C   | 204C 14173C  |

|     |      |     |  |                      |
|-----|------|-----|--|----------------------|
| ACV | C287 | K1  | 73G 146C 195C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4655A 4769G<br>6150A 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G<br>11299C 11467G 11479A 11719A 12308G<br>12372A 12984T 14167T 14766T 14798C<br>14968C 15326G 16224C 16266T 16311C                             |                      |
| ACV | C290 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3197C<br>4769G 7028T 8860G 9477A 9667A 11467G<br>11719A 12308G 12372A 13617C 14766T<br>14793G 15218G 15326G 16192T 16256T<br>16270T 16399G 16465T  | 9608G 16131C         |
| ACV | C292 | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 6260A 7028T<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 10632C<br>10810C 11299C 11467G 11485C 11719A<br>11840T 11882T 12308G 12372A 13740C<br>14167T 14766T 14798C 15314A 15326G<br>15930A 16224C 16311C 16519C | 152C 2831A           |
| ACV | C293 | H1  | 263G 750G 1438G 4769G 8860G 9804A<br>15326G 16356C 16519C  | 9948A 16192A         |
| ACV | C294 | W1  | 73G 150T 189G 195C 204C 207A 263G 709A<br>750G 1243C 1438G 2706G 3107C 3505G<br>4769G 5046A 5460A 6365C 7028T 7864T<br>8251A 8860G 8994A 11674T 11719A 11947G<br>12414C 12705T 14766T 15326G 15884A<br>16126C 16223T 16292T 16320T 16519C                              |                      |
| ACV | C295 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3744G 4769G<br>5460A 8512G 8860G 11914A 13938T 15043A<br>15326G 16519C   | 204C 6915A           |
| ACV | C300 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 5460A<br>8860G 15326G 16309G 16519C  |                      |
| ACV | C302 | T2  | 73G 146C 151T 263G 709A 750G 930A 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4769G 4917G<br>5147A 7028T 8697A 8860G 10463C 10750G<br>11251G 11593G 11719A 11812G 12375C<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16294T<br>16296T 16304C 16519C      | 2581G                |
| ACV | C303 | HV0 | 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4047C<br>4769G 7028T 8723A 8860G 14200C 15110A<br>15172A 15326G 16129A 16298C   | 2695G 3866C<br>5505G |

|     |      |    |  |        |
|-----|------|----|--|--------|
| ACV | C307 | U5 | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3197C<br>4769G 7028T 7792T 8860G 9477A 11017C<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13224C<br>13617C 14766T 14793G 15218G 15299C<br>15326G 15924G 16256T 16270T 16399G  |        |
| ACV | C308 | U3 | 73G 150T 152C 263G 750G 1438G 1811G<br>2294G 2706G 3010A 3107C 4703C 4769G<br>6518T 7028T 8860G 9266A 10506G 11467G<br>11719A 12308G 12372A 3251T 13934T<br>14139G 14766T 15326G 15454C 16256T<br>16265T 16343T 16390A 16519C                  |        |
| ACV | C309 | U5 | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3197C 4769G 5656G 5823G 7028T 7768G<br>8860G 9477A 11447A 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13617C 14182C 14766T<br>15226G 15326G 16182C 16183C 16189C<br>16256T 16270T 16519C                            | 11297G |
| ACV | C311 | U5 | 73G 150T 263G 709A 750G 1438G 1721T<br>1864G 2416C 2706G 2757G 3197C 3212T<br>4732G 4769G 7028T 7768G 8860G 9477A<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13617C<br>13637G 14182C 14766T 14956C 15326G<br>16189C 16270T 16398A                          |        |
| ACV | C312 | U5 | 73G 152C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3197C 4769G 7028T 8860G 9477A 11467G<br>11719A 12308G 12372A 13617C 14766T<br>14793G 15218G 15326G 16227G 16256T<br>16270T 16316G 16320T 16399G  |        |
| ACV | C313 | K1 | 73G 152C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4769G 6260A<br>7028T 8860G 9055A 9266A 9698C 10398G<br>10550G 11299C 11467G 11485C 11719A<br>11840T 12308G 12372A 13740C 14167T<br>14766T 14798C 15326G 16224C 16311C<br>16519C | 338T   |
| ACV | C319 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16162G 16519C  |        |
| ACV | C321 | U5 | 73G 93G 150T 263G 750G 1438G 2706G<br>3107C 3197C 4769G 5656G 7028T 7768G<br>8860G 9477A 11233C 11467G 11719A 12308G<br>12358G 12372A 13617C 14182C 14766T<br>15326G 15607G 15928A 16183C 16189C<br>16270T 16362C 16519C                       | 4157T  |

|     |      |    |   |   |
|-----|------|----|---|---|
| ACV | C323 | W5 | 73G 189G 194T 195C 204C 207A 263G 709A<br>750G 1243C 1438G 2706G 3107C 3505G<br>4769G 5046A 5460A 5957G 6528T 7028T<br>8251A 8860G 8994A 9464C 9909C 11674T<br>11696A 11719A 11947G 12414C 12705T<br>13161C 14766T 15326G 15775G 15884A<br>16223T 16292T 16519C | 185C 7137G<br>8872A 15803A<br>16093C 16129A |
| ACV | C331 | J1 | 73G 199C 263G 295T 462T 489C 574T 750G<br>1438G 2706G 3010A 3107C 4216C 4769G<br>7028T 8269A 8860G 10398G 10589A 11251G<br>11719A 12612A 13105G 13626T 13708A<br>14569A 14766T 15326G 15452A 15712G<br>16069T 16126C 16145A 16209C 16256T<br>16261T 16278T      | 11110G                                      |
| ACV | C334 | U3 | 73G 150T 263G 292C 750G 1438G 1811G<br>2706G 2833G 3107C 3546A 4188G 4639C<br>4640A 4769G 7028T 8860G 8895C 9656C<br>11467G 11719A 12308G 12372A 12738C<br>13743C 14139G 14766T 15326G 15454C<br>16189C 16343T  |   |
| ACV | C335 | H3 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 5774C 6776C<br>8860G 15326G 15889C  | 152C 14326C<br>16129A 16221T                |
| ACV | C338 | H1 | 150T 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>5460A 8512G 8860G 14902T 15326G 16519C  | 1128T                                       |
| ACV | C339 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3746T<br>3897A 4769G 8860G 14130T 15326G 16051G<br>16162G 16519C  | 3137A 16286T                                |
| ACV | C347 | W3 | 73G 152C 189G 194T 195C 204C 207A 263G<br>709A 750G 1243C 1406C 1438G 2706G 3107C<br>3505G 4769G 5046A 5460A 7028T 8251A<br>8860G 8994A 9932A 11674T 11719A 11947G<br>12414C 12678C 12705T 13263G 14766T<br>15326G 15784C 15884A 16223T 16292T<br>16519C        | 2623G 6810A                                 |
| ACV | C348 | J1 | 73G 146C 185A 188G 263G 295T 462T 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 3107C 3918A<br>4216C 4769G 7028T 8860G 10398G 10685A<br>11084G 11251G 11719A 12397G 12612A<br>13281C 13708A 13933G 14766T 14798C<br>15326G 15452A 16069T 16126C 16519C                         |   |

|     |      |     |  |                                 |
|-----|------|-----|--|---------------------------------|
| ACV | C349 | HV0 | 72C 143A 195C 263G 750G 1438G 2706G<br>3107C 4769G 7028T 8860G 15326G 16298C   |                                 |
| ACV | C350 | H3  | 146C 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>10398G 12957C 15326G 16519C  | 13240A 16111T                   |
| ACV | CL2  | H3  | 93G 263G 750G 1438G 1555G 3107C 4769G<br>6776C 8258C 8860G 15326G 15774C 16519C  |                                 |
| ACV | CL5  | H6  | 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A 4727G<br>4769G 8860G 9254G 9380A 10589A 15326G<br>16362C 16482G   |                                 |
| ACV | CL6  | H1  | 263G 477C 750G 1438G 1824C 3010A 3107C<br>3434G 4167T 4769G 8860G 10454C 13708A<br>14290C 15326G 16519C  | 2589G                           |
| ACV | CL8  | H   | 93G 151T 263G 750G 1438G 3107C 4769G<br>8860G 8908C 15326G 15758G 16519C   | 16093C                          |
| ACV | CL15 | U5  | 73G 150T 263G 750G 1438G 1721T 1834C<br>2706G 3197C 4732G 4769G 5452T 7028T<br>7768G 8705C 8860G 9477A 11467G 11719A<br>12308G 12372C 13617C 13637G 14182C<br>14766T 15326G 15511C 15924G 16356C<br>16519C         |                                 |
| ACV | CL17 | H5  | 263G 456T 496T 533G 750G 1438G 3107C<br>4769G 5297T 6221C 8860G 11314G 12127A<br>15326G 16129A 16304C  | 146C 189G 3323A<br>4157T        |
| ACV | CL20 | H1  | 239C 263G 750G 1438G 2501T 3010A 4769G<br>8239T 8496C 8860G 9123A 9145T 15326G<br>15758G 15945T 16519C   | 460T 463A 4157T<br>9152C 11770C |
| ACV | CL21 | J1  | 73G 228A 263G 295T 462T 482C 489C 750G<br>1438G 2706G 3010A 3107C 3394C 4216C<br>4769G 7028T 7142C 7184G 8860G 10398G<br>11251G 11719A 12612G 13708A 14766T<br>14798C 15326G 15452A 16069T 16126C<br>16289G 16311C | 89C 10496G                      |

|     |      |    |  |                                |
|-----|------|----|--|--------------------------------|
| ACV | CL30 | T2 | 151T 263G 709A 750G 930A 1438G 1888A<br>4216C 4769G 4917G 5147A 7028T 8697A<br>8860G 10463C 10750G 11251G 11719A<br>11812G 13368A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15928A 16126C 16294T<br>16296T 16304C 297G 4703C 9083C 16318C<br>16519C      | 73G 204C 310C<br>14667G 15607G |
| ACV | CL34 | U1 | 73G 263G 285T 750G 1438G 2218T 2706G<br>4769G 4991A 6026A 7028T 7581C 8860G<br>11467G 11719A 12308G 12358G 12372C<br>12879C 13104G 13781C 14070G 14364A<br>14766T 15148A 15326G 15954C 16182C<br>16183C 16189C 16249C 16294T 16342C<br>16390A 16519C | 11474A 12172G                  |
| ACV | CL42 | H1 | 152C 263G 750G 1692G 3010A 4769G 8631G<br>8860G 10307T 11422A 12972G 13572C<br>15326G 15391T 15970C 16221T 16519C  | 215G 514d 515d<br>1438G 16093C |
| ACV | CL45 | H5 | 93G 263G 456T 513A 750G 1438G 4336C<br>4769G 9123A 10915C 15326G 15884CA<br>16304C 16519C  | 8860G 12418d<br>16134T         |
| ACV | CL46 | H3 | 263G 750G 1438G 2352C 3107C 4512A 4769G<br>5480G 6776C 8860G 15326G 16192T 16519C  | 2623G 6018A<br>9223G           |
| ACV | CL48 | H2 | 93G 263G 3107C 8860G   | 460A 463T 1888A                |
| ACV | CL53 | X2 | 73G 125C 153G 195C 263G 1438G 1719A<br>2706G 4023C 4769G 4884G 6221C 6371T<br>7028T 8860G 9099T 9986A 10775A 11719A<br>12705T 13827G 13966G 14470C 14766T<br>15326G 15734A 16223T 16248T 16278T<br>16519C  | 127C 471C 750G<br>16189C       |
| ACV | CL56 | T2 | 263G 750G 1438G 3010A 4216C 4769G 6293C<br>8860G 11302T 16519C   | 1693A 2943A<br>15326G          |
| ACV | CL60 | H7 | 152C 263G 750G 1438G 4769G 4793G 5348T<br>8860G 15326G 16362C 16390A 16519C  | 12702T 12972G                  |

|     |       |    |  |   |
|-----|-------|----|--|---|
| ACV | CL63  | T2 | 73G 263G 1438G 1888A 2706G 3106d 4216C<br>4769G 4917G 7028T 8697A 8860G 10463C<br>11251G 11719A 11812G 13368A 14233G<br>14484C 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 16126C 16294T 16519C  | 150T 709A 750G<br>15928A 16153A   |
| ACV | CL65  | H5 | 263G 456T 750G 4080C 4769G 8860G 15326G<br>16188T  | 1438G 14198A  |
| ACV | CL66  | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5460A 8860G<br>12115T 15300C 15326G 15817G 16294T<br>16519C  | 3010A 9815T<br>10993A 10986T<br>11009C 11013T<br>11016A 11017C<br>11023C 11045G<br>12418d |
| ACV | CL71  | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3849A 4733C 4769G<br>8860G 15326G 16129A 16519C  | 9692G   |
| ACV | CL79  | T2 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1850C 2706G<br>3447G 4216C 4688C 4769G 7028T 7476T<br>7789A 8860G 10463C 11251G 11719A 11812G<br>13368A 14233G 14484C 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16153A 16294 16519C  |   |
| ACV | CL86  | H3 | 263G 1438G 6776C 8119C 8860G 10589A<br>15326G 16311C 16519C  | 310C 750G 4769G<br>12811C   |
| ACV | CL91  | U2 | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2524C 2706G 3107C 3720G 4769G<br>5390G 5426C 6045T 6152C 7028T 7151T<br>8860G 10876G 11143T 11176A 11467G<br>11719A 12308G 12346T 12372C 13020C<br>13734C 14766T 14974A 15326G 15907G<br>16051G 16129A 16189C 16362C 16519C |   |
| ACV | CL101 | H1 | 152C 195C 263G 750G 1438G 3010A 3107C<br>4769G 4820A 8596G 8860G 9986A 11002G<br>12061T 15326G 16519C  | 9070C   |
| ACV | CL108 | H2 | 152C   | 204C 4793T<br>11093A 15630C   |



|     |       |     |  |  |
|-----|-------|-----|--|--|
| ACV | CL109 | U4  | 73G 195C 247A 263G 499A 750G 1438G<br>1811G 2706G 2792G 3107C 4646C 4769G<br>5999C 6047G 6665T 6929G 7028T 8065A<br>8818T 8860G 11332T 11467G 11719A 12308G<br>12372A 13886C 14620T 14766T 15326G<br>15693C 16265G 16356C 16362C 16519C                                      |  |
| ACV | CL111 | U2  | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3720G 4769G 5390G<br>5426C 6045T 6152C 7028T 7151T 7759C<br>8860G 10876G 11176A 11467G 11719A<br>12308G 12346T 12372C 13020C 13734C<br>14766T 15326G 15907G 16051G 16129A<br>16183C 16189C 16319A 16362C 16519C |  |
| ACV | CL121 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3197C 4769G<br>6221C 7028T 8860G 9126C 9325C 9477A<br>11337G 11467G 11719A 12308G 12372C<br>13617C 14145G 14766T 14793G 15218G<br>15326G 16256T 16270T 16399G 16519C   |  |
| ACV | CL122 | H1  | 150T 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3796G<br>4769G 8860G 15326G 16189C 16356C 16362C 2991C<br>16519C  |  |
| ACV | CL124 | H   | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G 9196A<br>15326G 16311C   | 1008G 2009A<br>2627A 5991A<br>9152C 16301T |
| ACV | CL126 | V10 | 72C 263G 750G 1438G 2308G 2706G 4580A<br>4769G 7028T 8860G 9368G 15326G 15904T<br>15936T 16298C 16519C   |  |
| ACV | CL131 | T2  | 73G 263G 709A 750G 1438G 1888A 2706G<br>4216C 4769G 4917G 5147A 7028T 8697A<br>8860G 9581C 10463C 11251G 11719A 11812G<br>13368A 14207A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16294T 16296T 16304C 16519C  |  |
| ACV | CL132 | H3  | 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>10589A 12811C 15326G 16311C 16519C  | 2984G 9957C                                |
| ACV | CL136 | H1  | 152C 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5780A<br>8410T 8843C 8860G 14560A 15326G 16182C<br>16183C 16189C 16362C 16519C  |  |

|     |       |     |   |   |
|-----|-------|-----|---|---|
| ACV | CL139 | U5  | 73G 150T 263G 750G 1438G 1721T 2706G<br>3107C 3197C 4491A 4639C 4732G 4769G<br>6329T 6366A 7028T 7768G 8838A 8860G<br>9477A 11467G 11719A 12308G 12372C<br>12957C 13617C 13637G 13677T 14182C<br>14305A 14766T 15326G 16114A 16270T | 16189C                                  |
| ACV | CL142 | R0a | 64T 93G 263G 750G 1438G 2355G 2442C<br>2706G 3107C 3847C 4769G 7028T 8860G<br>12618A 13188T 14544A 14766T 15326G<br>15674C 16126C 16362C  |   |
| ACV | CL149 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 7337A<br>8860G 15326G 15758G 16519C   |   |
| ACV | CL151 | H1  | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16519C   | 12366G                                  |
| ACV | CL156 | U5  | 73G 150T 263G 723G 750G 1438G 1721T<br>2706G 3107C 3197C 4718G 4769G 7028T<br>7768G 8860G 9477A 11467G 11719A 12308G<br>12372C 13017G 13617C 13637G 14182C<br>14766T 15001C 15326G 16270T   | 13879C                                  |
| ACV | CL161 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 1700C 2706G 3107C<br>3197C 4769G 7028T 8860G 9477A 11467G<br>11719A 12308G 12346T 12372C 13105G<br>13617C 14766T 14793G 14801G 15218G<br>15326G 16188T 16256T 16270T 16399G                                     | 914G                                    |
| ACV | CL163 | H58 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>11908G 15326G 15466A 15721C 16519C   |   |
| ACV | CL173 | J1  | 73G 185A 188G 263G 295T 462T 482C 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 3107C 3394C<br>4216C 4769G 7028T 7184G 8860G 9180G<br>10398G 11251G 11719A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C                           | 13789C                                  |
| ACV | CL176 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5460A 8512G<br>8860G 14200C 15110A 15172C 15326G<br>16129A 16298C   | 146C 150T 195C<br>1128T 8723A<br>10351C |
| ACV | CL186 | V2  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 13105G 14770T 15326G<br>15904T 16298C 16519C   | 1781G                                   |

|     |       |    |   |   |
|-----|-------|----|---|---|
| ACV | CL187 | T2 | 73G 146C 263G 279C 709A 750G 1438G<br>1836G 1888A 2706G 4216C 4769G 4917G<br>5187T 6261A 7028T 7873G 7982T 8697A<br>8860G 10463C 10822T 10954T 11251G<br>11719A 11812G 11914A 13368A 14233G<br>14544A 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16126C 16292T 16294T<br>16519C |   |
| ACV | CL199 | H5 | 263G 456T 750G 1438G 3107C 4769G 5302C<br>8860G 15326G 16304C 16311C 16391A   |   |
| ACV | CL202 | H6 | 150T 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A<br>4727G 4769G 7805A 8860G 9380A 11253C<br>15326G 16362C 16482G 16519C  |   |
| ACV | CL208 | J1 | 73G 263G 750G 1243C 1406C 1438G 2706G<br>3107C 3505G 4769G 5046A 5460A 6899A<br>7028T 8251A 8860G 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13194A 13708A 14766T 14798C<br>15326G 15452A 15670C 16069T 16126C  | 189G 204C 207A<br>295T 462T 482C<br>489C 709A 8994A |
| ACV | CL214 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 4580A 4769G<br>6773G 7028T 8440G 8860G 15326G 15904T<br>16189C 16298C   |   |
| ACV | CL217 | U5 | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3197C 4769G<br>7028T 8860G 9477A 10619T 11467G 11719A<br>12015C 12308G 12372A 13617C 14632T<br>14766T 14793G 14968C 15326G 16256T<br>16270T 16526A  |   |
| ACV | CL219 | H1 | 263G 477C 750G 1438G 2626C 3010A 3107C<br>4769G 8860G 8962G 12684A 15326G   | 2453A 8623G   |
| ACV | CL220 | W6 | 73G 189G 194T 195C 204C 263G 709A 750G<br>1243C 1429T 1438G 2706G 3107C 3505G<br>4093G 4769G 5046A 5460A 7028T 8251A<br>8610C 8614C 8860G 8994A 11674T 11719A<br>11947G 12414C 12705T 14766T 15326G<br>15884C 16192T 16223T 16292T 16325 16519C                                   |   |
| ACV | CL221 | H1 | 73G 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C<br>4769G 5780A 8410T 8860G 14374C 15326G<br>16183C 16189C 16293G 16519C  | 9466C   |
| ACV | CL223 | H  | 263G 711C 750G 1438G 3107C 4769G 8477C<br>8860G 15326G 16362C   | 14259A  |

|     |       |    |   |               |
|-----|-------|----|---|---------------|
| ACV | CL225 | H6 | 150T 239C 263G 750G 1438G 3915A 4727G<br>4769G 5294T 7805A 8860G 9380A 11253C<br>13749T 15326G 16362C   | 11018A 16355T |
| ACV | CL229 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 12372C 15326G 15904T<br>16298C   |               |
| ACV | CL232 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 3107C 4216C 4769G 7028T<br>8860G 10398G 11251G 11719A 12612G<br>13708A 13934T 14088C 14766T 14798C<br>15326G 15431A 15452A 15734A 16069T<br>16126C | 9604G 10353A  |
| ACV | CL235 | H9 | 152C 263G 513A 750G 1438G 3107C 3591A<br>4310G 4769G 8860G 13020C 15064G 15326G<br>16168T 16519C  |               |
| ACV | CL236 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4742C 4769G<br>8860G 11149A 12172C 15326G 16189C<br>16356C 16519C   | 11351A        |
| ACV | CL238 | H3 | 152C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C<br>7965A 8860G 15326G 16519C   |               |
| ACV | CL239 | H9 | 152C 263G 513A 750G 1438G 3591A 4310G<br>4769G 8860G 13020C 15064G 15326G 16168T<br>16519C  |               |
| ACV | CL243 | H3 | 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G 9966A<br>10084 15326G 16086C 16240G 16519C  | 146C 11766A   |
| ACV | CL244 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5189G 8860G<br>14605G 15326G 16519C   | 12113A        |
| ACV | CL245 | K2 | 73G 146C 152C 263G 709A 750G 2706G<br>3480G 4561C 4769G 8860G 9055A 9698C<br>10550G 11299C 11467G 11719A 12308G<br>12372A 14167T 14766T 14798C 15326G<br>16150T 16224C 16311C 16519C                      | 9716C         |
| ACV | CL246 | U4 | 263G 499A 750G 1438G 2706G 4769G 7028T<br>8860G 15326G  | 16362C        |

|     |       |     |   |
|-----|-------|-----|---|
| ACV | CL247 | L2  | 73G 143A 146C 152C 195C 263G 750G 769A<br>1018A 1438G 2416C 2706G 2789T 2887C<br>3594T 4104G 4769G 7028T 7175C 7256T<br>7274T 7521A 7771G 8206A 8544T 8701G<br>8860G 9221G 9540C 10115C 10398G 10873C 4509C 16213A<br>11719A 11914A 11944C 12693G 12705T<br>13590A 13650T 13803G 14566G 14766T<br>15301A 15326G 15784C 15955G 16189C<br>16223T 16278T 16294T 16390A |
| ACV | CL250 | H4  | 152C 263G 750G 1438G 3107C 3992T 4024G<br>4769G 5004C 8291G 8860G 9123A 13635C<br>14365T 14582G 15172C 15326G 15924G<br>16172C  |
| ACV | CL253 | H4  | 195C 263G 750G 1438G 3992T 4024G 4769G<br>5004C 8269A 8860G 9123A 9615C 14365T<br>14569A 14582G 15326G 16233G 16519C  |
| ACV | CL254 | W8  | 73G 195C 204C 207A 263G 709A 750G 1243C<br>1438G 2706G 3505G 4769G 5046A 5147A<br>5460A 7028T 8251A 8697A 8860G 8994A<br>11674T 11719A 11947G 12414C 12705T<br>14766T 15314A 15326G 15884C 16223T<br>16292T 16318G 16519C   |
| ACV | CL256 | V   | 72C 150T 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>4233C 4580A 4769G 7028T 8860G 15326G<br>15904T 16298C   |
| ACV | CL257 | H24 | 263G 750G 1438G 4769G 8860G 15326G<br>16293G 16519C   |
| ACV | CL258 | U5  | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 4769G<br>7028T 8860G 9477A 11467G 11719A 12308G<br>12372A 13617C 14182C 14766T 15191C<br>15326G 16270T 16311C 194T 3107d 3197Y 8843C<br>4580A 5656R 6216Y 7080Y 7768R 10398G<br>10586A 15904TY 16172C 16189CY 16192TY<br>16269R 16298CY 16519C   |
| ACV | CL262 | H17 | 263G 750G 1438G 2438G 3915A 4769G 8860G 263G 1169A<br>15326G 16129A 16400T 16519C 12418d  |
| ACV | CL272 | H7  | 263G 750G 1438G 4769G 4793G 5348T 6503G<br>8860G 14514C 15326G 16519C   |

|     |       |     |   |                              |
|-----|-------|-----|---|------------------------------|
| ACV | CL273 | V   | 72C 152C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3203G 4580A 4769G 7028T 7055G 8860G<br>14203G 15904T 16153A 16298C  | 16145A                       |
| ACV | CL274 | H3  | 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>15326G 15924G 16311C 16519C  | 146C                         |
| ACV | CL279 | H3  | 199C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C<br>8860G 10670T 10915C 15326G 16519C   |                              |
| ACV | CL281 | HV0 | 72C 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3618C 4125C 4769G 6266G 7028T 8860G<br>13029T 15001C 15326G 16298C  | 204C                         |
| ACV | CL282 | H3  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C 8860G<br>12372C 14016A 15326G 16519C  | 460A 463T 4157T<br>14351C    |
| ACV | CL283 | H   | 93G 151T 263G 750G 1438G 3107C 4769G<br>8860G 8908C 15326G 15758G 16519C  | 16093C                       |
| ACV | CL285 | K1  | 73G 204C 263G 408A 497T 750G 1189C<br>1438G 1811G 2706G 3107C 3480G 4769G<br>6407C 6560T 7028T 8860G 9055A 9428C<br>9698C 10398G 10550G 11017C 11299C<br>11467G 11719A 12308G 12372C 14167T<br>14766T 14798C 15326G 16224C 16311C<br>16519C | 3244A 4396C<br>15809C 16093C |
| ACV | CL286 | V3  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 4580A 4769G<br>6366A 7028T 8860G 11337G 12810G 15326G<br>15904T 16240G 16298C   | 9647C                        |
| ACV | CL287 | K1  | 73G 195C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4769G 6620C<br>7028T 8860G 9055A 9698C 9965C 10398G<br>10550G 11299C 11467G 11719A 12308G<br>12372C 14167T 14766T 14798C 15326G<br>16224C 16311C 16519C                      | 204C 460A 463T               |
| ACV | CL290 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 5189G<br>8454G 8860G 15326G 16519C  | 3179A 8440G<br>14619G        |
| ACV | CL292 | J1  | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>1709A 2706G 3010A 3107C 4216C 4769G<br>6284G 7028T 8860G 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13708A 13934T 14766T 14798C<br>15326G 15452A 16069T 16126C   | 152C 9116C<br>12517A         |

|     |       |    |  |
|-----|-------|----|--|
| ACV | CL293 | H1 | 263G 477C 750G 1438G 3010A 4769G 6131G<br>8860G 15326G 16519C  |
| ACV | CL294 | V  | 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A 4769G<br>7028T 8860G 15326G 15904T 16298C  |
| ACV | CL295 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 2098A 3010A 3107C<br>4769G 8860G 9286C 11944C 13105G 14221C 6504A<br>15326G 16519C   |
| ACV | CL300 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8014G 12454A<br>8860G 15326G 16519C  |
| ACV | CL302 | K2 | 73G 146C 150T 263G 750G 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 7028T 8860G<br>9055A 9698C 9716C 10550G 11299C 11467G 2404C 14831A<br>11719A 11869A 12308G 12372C 13135A 16293G<br>14037G 14167T 14405G 14766T 14798C<br>15326G 16224C 16299G 16311C 16519C |
| ACV | CL303 | K1 | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 7028T 7559G<br>8440G 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 9419T 16093C<br>11299C 11467G 11719A 12308G 12372C<br>13117G 14167T 14766T 14798C 15326G<br>16224C 16311C 16519C                      |
| ACV | CL307 | T2 | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3480G 4769G 7028T 8860G 9055A<br>9698C 10398G 10550G 11299C 11467G 16129A<br>11470G 11719A 11914A 12308G 12372A<br>14167T 14766T 14798C 15326G 15924G<br>16311C 3107C 3107d 5742T 16278T 16519C              |
| ACV | CL308 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 3107C 3531A 3721G 3918A<br>4216C 4769G 5198G 7028T 8734A 8860G<br>8994A 10398G 11251G 11719A 12612G<br>13708A 14766T 14798C 15326G 15452A<br>16069T 16126C 16300G                                   |
| ACV | CL309 | V3 | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 12810G 12840T 15326G 1662T<br>15431A 15904T 16240G 16298C   |

|     |       |     |  |
|-----|-------|-----|--|
| ACV | CL311 | H5  | 263G 456T 750G 1438G 3107C 4336C 4769G<br>5788C 8389 8860G 15326G 15833T 16231C<br>16304C  |
| ACV | CL312 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 4859C<br>6663G 6681C 8860G 14470C 15326G 16188T 15657C<br>16519C   |
| ACV | CL313 | L3  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3450T<br>4769G 5773G 6221C 7028T 8701G 8860G<br>9449T 9540C 10086G 10373A 10398G 10873C<br>11002G 11719A 12123T 12705T 13105G<br>13914A 14766T 15301A 15326G 15824G<br>16223T 16278T 16362C 16519C   |
| ACV | CL319 | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3480G 4769G 5742T 7028T 8860G<br>9055A 9698C 10398G 10550G 11299C 11467G 1836G<br>11470G 11719A 11914A 12308G 12372C<br>14167T 14766T 14798C 15326G 15924G<br>16278T 16311C 16519C   |
| ACV | CL321 | H11 | 195C 263G 750G 961G 1438G 1876C 4769G<br>8448C 8860G 9257T 13759A 15326G 16137G<br>16293G 16311C   |
| ACV | CL323 | X1  | 73G 146C 153G 263G 750G 1438G 2706G<br>3107C 4769G 5302C 6221C 6371T 7028T<br>7337A 8557A 8860G 9615C 11719A 12705T<br>12864C 13966G 14470C 14587G 14766T<br>15326G 15654C 16519C  |
| ACV | CL331 | J2  | 73G 150T 152C 195C 215G 263G 295T 319C<br>489C 513A 750G 1438G 2706G 3107C 4216C<br>4769G 7028T 7476T 7768G 7789A 8860G<br>9254G 10398G 10499G 11251G 11377A 15597C<br>11719A 12612G 13708A 13722G 14133G<br>14766T 15257A 15326G 15452A 15596A<br>16069T 16145A 16231C 16261T |
| ACV | CL334 | H43 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 6497C 7202G<br>8860G 15326G 16519C   |
| ACV | CL335 | H1  | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3768G<br>4769G 8860G 9037G 15313C 15326G 16239T<br>16519C   |



|     |       |     |   |
|-----|-------|-----|---|
| ACV | CL338 | V2  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 4580A 4769G<br>7028T 8860G 13105G 14770T 15326G 15904T 1325C 6505C<br>16298C 16519C   |
| ACV | CL339 | H1  | 152C 263G 750G 1438G 1692G 3010A 3107C<br>4769G 8631G 8860G 10307T 11422A 12972C<br>13572C 15326G 15391T 15970C 16221T<br>16519C  |
| ACV | CL347 | H3  | 152C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C<br>8860G 10754C 12040G 15326G 16320T 4589C 9077C<br>16519C   |
| ACV | CL348 | I   | 73G 199C 204C 250C 263G 750G 1438G<br>1719A 2706G 3107C 4529T 4769G 6734A<br>7028T 8251A 8860G 9966A 10034C 10238C<br>10398G 11719A 12501A 12705T 13780G<br>14766T 15043A 15326G 15924G 16129A<br>16223T 16278T 16311C 16391A 16519C                                  |
| ACV | CL349 | HV0 | 72C 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>4769G 7028T 8860G 15326G 16298C 13182C  |
| ACV | CL350 | HV0 | 146C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4769G<br>5460A 7028T 8860G 15326G 16248T 9145A   |
| MI  | C1    | H   | 150T 709A 750G 1438G 4769G 8860G 15326G<br>16189C 16362C 16519C 16086C  |
| MI  | C10   | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>9986A 14129T 14224G 15326G 16519C 10365A   |
| MI  | C100  | T1  | 73G 146C 152C 195C 263G 709A 750G 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4769G 4820A<br>4917G 7028T 8113A 8697A 8860G 9554A<br>9899C 10463C 11251G 11719A 12633A 14969C<br>13368A 14766T 14905A 15209C 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16163G<br>16189C 16294T 16519C |
| MI  | C102  | U5  | 73G 263G 750G 1393A 1438G 2706G 3107C<br>3197C 4310G 4769G 7028T 8860G 9477A<br>9667G 11467G 11719A 12308G 12372A 16086C<br>13617C 14766T 14793G 15218G 15326G<br>15907G 16256T 16270T 16298C 16399G  |

|    |      |     |  |
|----|------|-----|--|
| MI | C106 | H13 | 263G 750G 1438G 3107C 4688C 4769G 5568G<br>8206A 8860G 10202T 14004A 14872T 15326G 7754A<br>16188T 16303A 16519C   |
| MI | C11  | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3744G 4769G<br>5460A 8512G 8860G 11914A 13938T 15043A 6810A<br>15326G 16519C   |
| MI | C110 | X2  | 73G 195C 263G 750G 1438G 1719A 2706G<br>4769G 6221C 6371T 7028T 8860G 9326G<br>11719A 12705T 13681G 13966G 14470C 11017C 14351C<br>14669G 14766T 15326G 15777A 16189C<br>16223T 16248T 16278T 16294T 16519C  |
| MI | C112 | V   | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 6773T 7028T 8860G 10978C 12684A<br>13145A 15326G 15904T 16129A 16234T<br>16298C 16311C  |
| MI | C114 | H   | 204C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16519C  |
| MI | C115 | J1  | 73G 185A 189G 228A 263G 295T 462T 489C<br>553T 750G 789C 1438G 2706G 3010A 4216C<br>4769G 4805T 7028T 8860G 10398G 11251G<br>11719A 12612G 13708A 14766T 14798C<br>15326G 15452A 16069T 16126C 16261T  |
| MI | C116 | U6  | 73G 152C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3348G 4769G 6620C 7028T 7805A 8407A<br>8557A 8860G 9779T 10685A 10700G 11467G 11839C<br>11719A 11734G 12308G 12372A 13440T<br>14179G 14766T 15326G 15355A 16172C<br>16219G 16271C 16278T                               |
| MI | C12  | H1  | 93G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4733C 1462A<br>4769G 8860G 14668T 15326G 16519C  |
| MI | C120 | H1  | 150T 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 9293T<br>7762A 8860G 15326G 16519C  |
| MI | C123 | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2226C 2706G 3107C 3480G 3645C 4769G<br>7028T 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G<br>11299C 11467G 11719A 12308G 12372A<br>13023A 13602C 14129T 14167T 14766T<br>14798C 15326G 15892C 16189C 16224C<br>16311C 16362C 16519C |

|    |      |     |   |  |
|----|------|-----|---|--|
| MI | C125 | H26 | 150T 263G 370A 750G 1438G 4769G 8860G<br>9545G 11152C 13500C 15326G 16519C  |  |
| MI | C127 | H   | 263G 750G 1438G 4769G 7859A 8860G<br>15326G 16519C  | 93G 310C 456T<br>513A 1315A<br>9123A 9380A<br>9612A 10915C<br>13269G 13938T<br>14323A 15884A<br>16304C |
| MI | C133 | H5  | 93G 263G 456T 750G 1438G 4336C 4769G<br>8860G 10915C 15326G 15884A 16304C<br>16519C   | 513A 3477A   |
| MI | C134 | H24 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16293G 16519C   |  |
| MI | C138 | H6  | 150T 239C 263G 750G 1005C 1438G 2581G<br>3915A 4727G 4769G 7805A 8860G<br>9380A11253C 15326G 16291T 16362C<br>16482G  | 12669T 16150T  |
| MI | C14  | H1  | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16207G 16519C  | 195C 813G<br>15848G  |
| MI | C140 | H   | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16519C  |  |
| MI | C143 | U3  | 73G 150T 263G 750G 1438G 1811G 2294G<br>2706G 3010A 3107C 4002C 4703C 4769G<br>6518T 7028T 7805A 8860G 9266A 10506G<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13934T<br>14139G 14766T 15326G 15454C 16343G<br>16362C 16390A 16519C | 1536G 15046G   |
| MI | C145 | H   | 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3348G 4769G<br>6620C 7028T 7805A 8407A 8557A 8860G<br>9425G 15326G 16223T 16298C 16519C   | 73G 152C 15071C  |
| MI | C146 | H1  | 263G 477C 750G 1438G 3010A 4769G 5177A<br>8860G 13759A 15326G 16519C  | 146C 16182G  |

|    |      |     |   |  |
|----|------|-----|---|--|
| MI | C147 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4029T 4769G<br>5460A 8269A 8512G 8860G 11203T 13135A<br>13179T 14902T 15326G 15514C 16162G<br>16519C  | 10535C                                       |
| MI | C152 | K1  | 73G 195C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4769G 5250C<br>7028T 8400C 8521G 8860G 9055A 9554A<br>9698C 10398G 10550G 11299C 11467G<br>11719A 12308G 12372A 14167T 14766T<br>14798C 15326G 16214A 16224C 16311C<br>16354T 16519C | 12235C 15293C<br>16093C                      |
| MI | C153 | H   | 263G 750G 1438G 3107C 3531A 4769G 8551C<br>8860G 15326G 16264T 16519C   |  |
| MI | C154 | H63 | 263G 1438G 2159C 2361A 4769G 8860G<br>13392C 14193G 15326G  | 750G 16093C<br>16519C                        |
| MI | C158 | H5  | 263G 456T 750G 1438G 2626C 4769G 5264T<br>7424G 8020A 8358G 8860G 13753C 15326G<br>16270T   | 2623G  |
| MI | C159 | HV0 | 152C 195C 228A 263G 750G 1438G 4769G<br>7028T 8706G 8860G 14323A 15154T 15326G<br>16298C 16311C   |  |
| MI | C16  | U3  | 73G 150T 263G 750G 1811G 2706G 3107C<br>4188G 4640A 4769G 5201C 7028T 8860G<br>9656C 11467G 11719A 12308G 12372A<br>13743C 14139G 14766T 15326G 15454C<br>16168T 16343G 16359C 16519C   |  |
| MI | C164 | H3  | 152C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6182A<br>6776C 8433C 8860G 9525A 9804A 14883T<br>15224T 15326G 16519C  | 204C   |
| MI | C165 | H   | 263G 750G 3107C 3531A 4769G 8860G<br>14040A 15326G 16264T 16519C  | 16278T                                       |
| MI | C166 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 4769G<br>7028T9477A 11467G 11719A 12308G 14766T<br>14793G 15218G 15924G 16256T 16270T<br>16399G   | 195C 8860G<br>12372A 13617C<br>15326G 16189C |

|    |      |     |   |                                      |
|----|------|-----|---|--------------------------------------|
| MI | C168 | V14 | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8843C 8860G 15326G 15904T<br>16298C 16311C   | 5439T                                |
| MI | C169 | V3  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 12810G 12840T 15326G<br>15431A 15904T 16240G 16298C  | 2552C 9128C                          |
| MI | C171 | U2  | 263G 750G 1438G 1811G 2706G 3107C 3720G<br>4769G 5390G 5426C 6045T 6152C 7028T<br>8860G 9380A 11253C 15326G 16362C  | 73G 152C 217C<br>239C 508G<br>13198A |
| MI | C172 | H6  | 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A 4682G<br>4727G 4769G 8860G 9380A 11253C 15326G<br>16362C   | 13198A                               |
| MI | C174 | V18 | 72C 263G 508G 709A 750G 1438G 2706G<br>3107C 4310G 4580A 4769G 7028T 8860G<br>15191C 15326G 15904T 16298C   |                                      |
| MI | C175 | H6  | 150T 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A<br>4727G 4769G 7805A 8860G 9380A 11253C<br>13749T 15326G 16362C   |                                      |
| MI | C177 | K1  | 73G 152C 263G 497T 750G 8860G 9055A<br>9698C 10398G 10550G 11299C 11467G<br>11485C 11719A 11840T 12308G 12372A<br>13740C 14167T 14766T 14798C 15154T<br>15326G 16224C 16311C 16519C                           |                                      |
| MI | C178 | H1  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8568T 8860G<br>14569A 15326G 16129A 16519C  | 4639C 8348G                          |
| MI | C179 | U5  | 73G 150T 152C 195C 198T 263G 750G 1438G<br>2706G 3107C 3197C 4769G 5656G 5894G<br>7028T 7768G 8860G 9477A 10196T 11467G<br>11719A 12308G 12372A 13617C 14182C<br>14766T 15191C 15326G 16189C 16270T<br>16311C |                                      |
| MI | C18  | H6  | 239C 263G 750G 1438G 3915A 4727G 4769G<br>8860G 9380A 10589A 15326G 16249C 16362C   | 3323A                                |
| MI | C180 | H40 | 152C 263G 750G 1438G 1719A 4769G 7621C<br>7979A 8860G 15326G 16519C   |                                      |

|    |      |     |  |   |
|----|------|-----|--|---|
| MI | C181 | J1  | 73G 185A 188G 228A 263G 295T 462T 489C<br>709A 750G 1438G 2706G 3010A 3107C 4216C<br>4232C 4769G 7028T 7599T 8404C 8860G<br>10398G 11251G 11719A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15076G 15326G 15452A<br>16069T 16126C 16278T 16366T 16519C | 11823C  |
| MI | C182 | H20 | 152C 263G 750G 1438G 4769G 8460G 8860G<br>12088A 12523G 15326G 16218T 16328A<br>16362C   |   |
| MI | C188 | H3  | 195C 263G 750G 982G 1438G 3027C 3107C<br>4025T 4769G 6776C 8860G 8865A 12957C<br>15172A 15326G 16176T  | 146C  |
| MI | C189 | U8  | 73G 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3480G 3788G 4769G 5165T 7028T 8860G<br>9055A 9698C 11467G 11719A 12308G 12372A<br>14053G 14167T 14530C 14766T 15326G<br>16183C 16189C 16234T 16311C 16324C<br>16519C                               |   |
| MI | C190 | HV0 | 72C 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>4769G 4952T 7028T 8860G 15110A 15326G<br>16298C  |   |
| MI | C191 | J1  | 73G 185A 263G 295T 462T 750G 1438G 1916T<br>2860T 7028T 8860G 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C   | 489C 12418d<br>14180C   |
| MI | C192 | H5  | 263G 456T 750G 1438G 3107C 4336C 4769G<br>8860G 9531G 12864C 15326G 15833T 16193T<br>16304C  |   |
| MI | C193 | H3  | 93G 263G 750G 1438G 4386C 4769G 6776C<br>8860G 10724C 14118G 15326G 16519C   |   |
| MI | C194 | H5  | 263G 456T 750G 1438G 4336C 4769G 8860G<br>9531G 12864C 15326G 16193T 16304C  | 15833T  |
| MI | C195 | U8  | 73G 263G 282C 750G 1438G 1811G 2706G<br>3738T 4769G 5240G 7028T 7055G 8860G<br>9698C 10733T 11467G 11719A 12308G<br>12768G 14766T 15326G 16146G 16342C   | 6392C 6455T<br>9365T 10497A<br>11045G 11023C<br>12372A 12418d<br>13145A |

|    |      |    |   |
|----|------|----|---|
| MI | C196 | U5 | 73G 146C 150T 263G 750G 1438G 1978G<br>2706G 3197C 4769G 5656G 7028T 7768G<br>8860G 8994A 9477A 11467G 11719A 12308G 64T<br>12372A 13146T 13617C 14016A 14182C<br>14766T 15326G 16051G 16189C 16270T  |
| MI | C197 | H1 | 263G 338T 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>6272G 8860G 14869A 15326G 16189C 16519C 16126A 16129A   |
| MI | C198 | H1 | 152C 263G 750G 1438G 1692G 3010A 4769G<br>8860G 11422A 12972G 15326G 15391T<br>15970C 16221T 16519C   |
| MI | C200 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 12372A 15326G 15904T 16129A<br>16298C  |
| MI | C201 | H3 | 263G 293C 750G 1438G 3107C 4769G 6776C<br>8860G 12346T 13225A 13746T 15326G 12007A<br>15530C 16192T 16519C  |
| MI | C203 | U5 | 73G 150T 263G 279C 517T 750G 1438G 1721T<br>2706G 2755G 3107C 3197C 3338C 4769G<br>5261A 5366T 7028T 7768G 8860G 9477A<br>11467G 11653G 11719A 12192A 12308G<br>12372A 12634G 13617C 13630G 13637G<br>14182C 14766T 15326G 15905C 16270T<br>16311C    |
| MI | C204 | V  | 263G 508G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 7762A 8860G 14914C 15326G<br>15904T 16284G 16298C   |
| MI | C205 | U8 | 73G 263G 282C 750G 1438G 1811G 2706G<br>3738T 4769G 5240G 6392C 6455T 7028T<br>7055G 8860G 9365T 9698C 10733T 11467G<br>11719A 12308G 12372A 12768G 13145A<br>14766T 15326G 16146G 16342C   |
| MI | C206 | K1 | 73G 152C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3480G 4769G 7028T 7559G<br>8440G 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G<br>11299C 11467G 11719A 12308G 12372A 4742C<br>13117G 14167T 14311C 14766T 14798C<br>15326G 16167T 16224C 16256T 16311C<br>16519C |

|    |      |     |  |                      |
|----|------|-----|--|----------------------|
| MI | C207 | H5  | 263G 456T 750G 1438G 3107C 4336C 4769G<br>8860G 9531G 12864C 15326G 15833T 16193T<br>16304C  |                      |
| MI | C210 | H1  | 263G 477C 709A 750G 1438G 3010A 3107C<br>4769G 8860G 15326G 16519C   | 7393A                |
| MI | C213 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 1700C 2706G 3107C<br>3197C 4216C 4769G 5495C 7028T 7543G<br>8860G 9477A 11467G 11719A 12172G<br>12308G 12372A 13617C 14766T 14793G<br>15218G 15326G 15924G 16256T 16270T<br>16399G 16493C                                  | 6126G 12203C         |
| MI | C215 | V   | 72C 131C 263G 750G 1438G 2416C 2706G<br>4580A 4769G 7028T 7897A 8860G 12390T<br>15169G 15326G 15904T 16298C  | 2620A 3022A<br>7158C |
| MI | C22  | H10 | 152C 263G 545 750G 1438G 4769G 8860G<br>9615 14470C 15326G 16519C  | 7600A 16093C         |
| MI | C222 | H   | 152C 263G 750G 1438G 1998 2706G 3107C<br>4769G 7028T 8860G 15326G 16304C 16311C  |                      |
| MI | C226 | H26 | 150T 263G 370A 750G 1438G 4769G 8227C<br>8860G 9545G 11152C 13500C 15326G 16231C<br>16519C   | 4157T                |
| MI | C228 | T2  | 73G 152C 263G 709A 750G 1438G 1888A<br>2706G 3107C 3992T 4216C 4769G 4917G<br>5147A 7028T 8697A 8860G 9254G 10463C<br>11251G 11719A 11812G 13368A 14233G<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16222T 16294T 16304C<br>16519C |                      |
| MI | C23  | H24 | 152C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16293G 16519C   |                      |
| MI | C230 | W5  | 73G 195C 199C 204C 207A 263G 709A 750G<br>1243C 1438G 2706G 3505G 4769G 5046A<br>5460A 6528T 7028T 8251A 8860G 8994A<br>11674T 11719A 11947G 12414C 12705T<br>14766T 15326G 15775G 15884C 16186T<br>16223T 16256T 16519C                       |                      |



|    |      |     |  |                               |
|----|------|-----|--|-------------------------------|
| MI | C231 | J2  | 73G 150T 152C 195C 215G 263G 295T 319C<br>489C 513A 750G 1438G 2392C 4216C 4769G<br>7028T 7476T 7789A 8860G 10398G 10499G<br>11251G 11377A 11719A 13708A 13722G<br>14133G 14766T 15257A 15326G 15452A<br>16069T 16145A 16231C 16261T | 2706G 12418d<br>12612G 16126C |
| MI | C233 | U6  | 73G 146C 152C 185A 188G 263G 750G 1211A<br>1438G 2706G 3107C 3348G 4769G 7028T<br>7805A 8860G 9438A 11268T 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13431T 14179G 14766T<br>15326G 15634G 15790T 16172C 16183C<br>16189C 16219G 16278T         |                               |
| MI | C234 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3666A 4435G<br>4769G 8860G 15326G 16519C   |                               |
| MI | C24  | H41 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6305A 8860G<br>9683G 11203T 15326G 15617A 16189C<br>16519C   |                               |
| MI | C240 | J1  | 73G 185A 228A 263G 295T 462T 489C 750G<br>1438G 2706G 3010A 3107C 4216C 4769G<br>7028T 8860G 10398G 10530A 11251G 11719A<br>12612G 13708A 13934T 14088C 14766T<br>14798C 15326G 15431A 15452A 16126C                                 |                               |
| MI | C241 | H1  | 152C 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5471A<br>8860G 15326G 16207G 16519C   | 16179T                        |
| MI | C242 | H2  | 263G 750G 1842G 3107C 8860G 13708A<br>15326G 16291T 16519C   | 6919C 14560A                  |
| MI | C248 | H1  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G 9986A<br>14129T 15326G 16519C  | 239C                          |
| MI | C249 | H1  | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16519C  |                               |
| MI | C25  | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3480G 4769G 7028T 7559G 8440G<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13117G<br>14167T 14766T 14798C 15326G 16224C<br>16311C 16519C                   | 146C 16093C                   |

|    |      |     |   |
|----|------|-----|---|
| MI | C251 | H1  | 263G 750G 1438G 2220G 3010A 4769G 5460A<br>8512G 8860G 13368A 15326G 15992G<br>16304C 16325C  |
| MI | C255 | HV0 | 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3348G 4769G<br>6620C 7028T 7805A 8407A 8557A 8860G 7645C<br>15326G 16153A 16298C  |
| MI | C259 | M1  | 73G 195C 263G 489C 750G 813G 1438G<br>2706G 4769G 6446A 6671C 6680C 7028T<br>8701G 8860G 9540C 10398G 10400T 10873C<br>11719A 12403T 12414C 12492G 12705T<br>12950C 13637G 14110C 14766T 14783C<br>15043A 15301A 15326G 16129A 16182C<br>16183C 16189C 16249C 16311C 16519C |
| MI | C26  | H10 | 263G 750G 1438G 4216C 4769G 5263T 8860G<br>10160T 14470C 15326G 16114T 16519C 7275C 9294A   |
| MI | C261 | HV0 | 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4047C<br>4769G 7028T 8723A 8860G 14200C 15110A<br>15172A 15326G 16129A   |
| MI | C264 | J1  | 73G 185A 263G 295T 462T 750G 1438G<br>3010A 3592A 4769G 5198G 7028T 8282d 489C 3106d 4216C<br>8283d 8284d 8285d 8286d 8860G 10398G 9209T 11251G<br>11719A 13708A 14766T 14798C 15326G 12418d 12612g<br>15452A 15613G 16069T 16126C  |
| MI | C265 | M5  | 73G 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>9540C 9833C 10398G 10400T 10873C 11719A 146C 152C 199C<br>12477C 12705T 14323A 14766T 14783C 204C 207A 709G<br>15043A 15287C 15301A 15326G 16129A 8701G<br>16223T 16291T 16298C 16519C   |
| MI | C266 | H2  | 93G 263G 1719A 7598A 8705C 8860G 14037G<br>15326G 16235G 16291T 12418d  |
| MI | C268 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 6272G<br>6734A 8860G 12522C 14869A 15326G 16114T<br>16519C  |
| MI | C269 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16147A 16519C 152C 199C 268T  |

|    |      |     |   |   |
|----|------|-----|---|---|
| MI | C27  | V23 | 72C 263G 750G 1438G 4580A 4769G 6734A<br>7028T 8538C 8860G 15326G 16298C  | 12418d 15904T   |
| MI | C270 | K   | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4769G<br>7028T 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G<br>11299C 11467G 11719A 12308G 12372A<br>12681C 14167T 14766T 14798C 15326G<br>16224C 16311C 16519C  | 146C 152C 185A<br>188G 195C<br>16293G                             |
| MI | C275 | J1  | 73G 185A 228A 263G 295T 462T 489C 750G<br>1438G 2706G 3010A 3107C 4216C 4769G<br>7028T 8860G 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13708A 13934T 14088C 14766T<br>14798C 15326G 15431A 15452A 16069T<br>16126C   | 15253G  |
| MI | C276 | J1  | 73G 242T 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2158C 3010A 3106d 4216C 4769G 5460A<br>7028T 8269A 8557A 8860G 10398G 11251G<br>11719A 12007A 12612G 13708A 13879C<br>14766T 15326G 15452A 16069T 16126C<br>16145A 16172C 16261T   |   |
| MI | C277 | H   | 263G 370A 1438G 4769G 8860G 9545G<br>13500C 15326G 16231C 16519C  | 750G 11152C<br>12418d   |
| MI | C278 | L2  | 73G 195C 263G 489C 750G 1438G 4216C<br>4769G 5493C 6671C 7028T 7076G 7476T<br>8860G 9221G 9540C 10115C 10398G 10873C<br>11719A 11914A 11944C 12693G 12705T<br>13590A 13650T 13803G 14566G 14766T<br>15244G 15301A 15326G 15629C 15784C<br>16093C 16223T 16278T 16294T 16309G<br>16311C 16320T 16390A 16519C | 2706G 8701G<br>8958T  |
| MI | C284 | J1  | 73G 185A 188G 228A 263G 295T 462T 489C<br>709A 750G 1438G 2706G 3010A 4216C 4232C<br>4769G 8860G 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13708A 14020C 14766T 14798C<br>15326G 15452A 16069T 16126C 16278T<br>16366T 16519C  | 7705C 7868T<br>7891T 7912A<br>8021G 8065A<br>8167C 8203T<br>8392A |
| MI | C288 | H3  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C 8227C<br>8860G 15326G 16256T 16519C   |   |
| MI | C289 | H6  | 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A 4727G<br>4769G 5291C 8860G 9254G 9380A 10589A<br>10993A 15326G 16362C 16482G   | 8344G   |

|    |      |    |  |   |
|----|------|----|--|---|
| MI | C291 | T2 | 73G 263G 709A 750G 1438G 1888A 2706G<br>4021G 4216C 4769G 4917G 7028T 8697A<br>8860G 10463C 11251G 11719A 11812G<br>13368A 13759A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16294T 16296T 16519C   |   |
| MI | C296 | H  | 93G 151T 263G 750G 1438G 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16519C  | 5108C 6025C                                 |
| MI | C299 | H1 | 150T 195C 263G 750G 1438G 3010A 3411G<br>3548C 4769G 5279T 8860G 11776C 15326G<br>16368C 16519C  |   |
| MI | C3   | V  | 72C 263G 750G 1438G 2222C 2706G 4580A<br>4769G 6773T 7028T 8860G 15326G 15904T<br>16111T 16234T 16298C   |   |
| MI | C301 | J1 | 73G 185A 228A 263G 295T 462T 485C 489C<br>750G 1438G 2706G 2969G 3010A 3398C<br>4025T 4216C 4769G 7028T 8860G 10398G<br>10410C 11251G 11719A 12561A 12612G<br>13708A 14766T 14798C 15326G 15452A<br>15913T 16069T 16126C 16519C  |   |
| MI | C304 | K1 | 73G 195C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4769G 4994G<br>7028T 7521A 8860G 9055A 9698C 10398G<br>10550G 11299C 11467G 11719A 12308G<br>12372A 14167T 14766T 14798C 15326G<br>16224C 16311C 16519C   |   |
| MI | C305 | T2 | 73G 151T 263G 709A 750G 930A 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4769G 4917G<br>5147A 6467T 7028T 8697A 8860G 9926G<br>10463C 10750G 11251G 11404G 11719A<br>11812G 13368A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15724G 15928A<br>16126C 16294T 16296T 16304C 16519C | 204C 15570C                                 |
| MI | C310 | X2 | 73G 153G 195C 198T 263G 489G 750G 1438G<br>1719A 2706G 4757G 4769G 6221C 6371T<br>6956C 7028T 8860G 11509T 11719A 12705T<br>13966G 14470C 14766T 15326G 16189C<br>16223T 16278T 16292T 16519C  | 514d 515d 12418d<br>16180d 16183c<br>16184d |
| MI | C314 | RO | 64T 93G 263G 750G 1438G 2355G 2442C<br>2706G 3847C 4769G 7028T 8860G 9127G<br>9438A 12618A 13188T 14544A 14766T<br>15326G 15674C 16126C 16362C   | 11908G 15893C                               |

|    |      |     |  |                                       |
|----|------|-----|--|---------------------------------------|
| MI | C315 | H43 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 6497C<br>7202G 8860G 15326G 16519C   | 1464A 2118C                           |
| MI | C318 | T2  | 73G 263G 385G 709A 750G 930A 1438G<br>1530G 1888A 2706G 3107C 4216C 4561C<br>4769G 4917G 5147A 7028T 8697A 8860G<br>10463C 11251G 11719A 11812G 12285C<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16266T<br>16294T 16304C 16519C |                                       |
| MI | C32  | H2  | 263G 750G 951A 8860G 15326G 16519C   |                                       |
| MI | C322 | U5  | 73G 150T 228A 251A 263G 750G 1438G<br>1719A 2706G 3107C 3197C 4769G 7028T<br>7226A 7768G 8860G 9477A 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13617C 13908T 14182C<br>14766T 15326G 16192T 16249C 16270T   | 8858A 9617G                           |
| MI | C324 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3606G 4769G 5460A<br>8512G 8860G 13813A 14902T 15326G 16519C   |                                       |
| MI | C325 | U4  | 73G 195C 263G 499A 709A 750G 827G 1438G<br>1811G 2706G 3107C 4646C 4769G 4811G<br>5999C 6047G 6146G 7028T 8860G 9070G<br>9214G 10907C 11009C 11332T 11467G<br>11719A 12308G 12372A 14620T 14766T<br>14866T 15326G 15693C 16179T 16260T<br>16356C 16519C    | 11372A                                |
| MI | C326 | U5  | 73G 150T 263G 750G 1438G 2218T 2706G<br>3197C 4769G 7028T 7226A 7768G 8860G<br>9477A 10700G 11467G 11719A 12308G<br>12372A 13617C 14182C 14766T 15326G<br>15391T 16037G 16270T 16304C  |                                       |
| MI | C327 | U3  | 73G 150T 152C 263G 514d 750G 1438G<br>1811G 2706G 3107C 4188G 4769G 5249C<br>7028T 8233G 8860G 9656C 11467G 11719A<br>12172G 12308G 12372A 13743C 14139G<br>14461C 14766T 15326G 15454C 15940C<br>16187T 16343G 16391A                                     | 4640A 9181G                           |
| MI | C328 | H10 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G 9104C<br>14470C 15326G 15440C 16126C 16189C<br>16519C  | 1320A 3305G<br>7543G 16093C<br>16129A |

|    |      |    |   |  |
|----|------|----|---|--|
| MI | C329 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>13768C 15326G 16242T 16519C  | 12146G   |
| MI | C33  | H5 | 263G 456T 1438G 3107C 4336C 4769G 8860G<br>11386C 15326G 15772G 15812A 15833T<br>16304C   | 750G 9133A   |
| MI | C330 | U5 | 73G 150T 263G 723G 750G 1438G 1721T<br>2706G 3197C 4065G 4718G 4769G 7028T<br>7768G 8010C 8839A 8860G 9477A 9670G<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13017G<br>13617C 13637G 14182C 14766T 15001C<br>15326G 16270T                                    | 6291T  |
| MI | C332 | T2 | 73G 263G 709A 750G 1438G 1871G 1888A<br>2706G 3107C 4216C 4769G 4917G 5147A<br>7028T 8697A 8860G 10463C 11251G 11719A<br>11812G 13368A 14053G 14233G 14766T<br>14905A 15326G 15452A 15607G 15884C<br>15928A 16126C 16294T 16296T 16304C<br>16519C | 15735T   |
| MI | C333 | T2 | 73G 146C 263G 482C 709A 750G 930A 1438G<br>1888A 2284A 2706G 3107C 4216C 4769G<br>4917G 5147A 7028T 8697A 8860G 10463C<br>11251G 11719A 11812G 13368A 14233G<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16294T 16304C 16519C          |  |
| MI | C337 | L3 | 8971T 12280G  | 2487C  |
| MI | C343 | H6 | 152C 239C 263G 1438G 3915A 4769G 8860G<br>9380A 11253C 15326G 16362C 16482G   | 174A 187T 750G<br>904A 2405A<br>4727G 6621A<br>7506T 8000T |
| MI | C344 | H6 | 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A 4727G<br>4769G 5460A 7325G 8860G 9362G 9380A<br>11253C 11611A 15326G 16311C 16362C<br>16482G   | 2345A  |
| MI | C345 | H1 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>13326C 14902T 15326G 16278T 16311C<br>16519C   | 678C 3796G   |
| MI | C35  | H9 | 152C 263G 513A 750G 1438G 3591A 4310G<br>4769G 8860G 13020C 15064G 15326G 16148T<br>16168T 16519C   | 14016A   |

|    |     |    |   |        |
|----|-----|----|---|--------|
| MI | C36 | N1 | 73G 152C 263G 750G 1438G 1598A 1703T<br>1719A 1734T 2639T 2706G 3107C 3921A<br>4769G 4904T 4960T 5471A 7028T 8251A<br>8472T 8836G 8860G 9335T 10238C 11362G<br>11719A 12501A 12705T 12822G 14766T<br>15326G 16145A 16176T 16223T 16390A<br>16519C     |        |
| MI | C37 | H3 | 114T 263G 750G 1438G 3107C 3204T 3360G<br>3613T 4769G 5999C 6776C 8860G 15326G<br>16248T 16519C   | 16093C |
| MI | C38 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 482C 489C 750G<br>1438G 2706G 3010A 3107C 3394C 4216C<br>4769G 5773A 7028T 7184G 8860G 10398G<br>11251G 11719A 12612G 13708A 14766T<br>14798C 15326G 15452A 16069T 16126C<br>16319A   | 9439A  |
| MI | C4  | T1 | 73G 152C 263G 499A 709A 750G 1438G<br>1888A 2706G 4216C 4769G 4917G 7001G<br>7028T 8697A 8860G 9266A 10257T 10463C<br>11251G 11719A 12633A 12906T 13368A<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16163G 16189C 16263C<br>16294T 16311C |        |
| MI | C40 | H1 | 263G 750G 1438G 2652A 3010A 4733C 4769G<br>8860G 14798C 15326G 16129A 16519C  | 460A   |
| MI | C41 | U3 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1811G 2294G<br>2706G 3010A 3107C 4703C 4769G 6518T<br>7028T 8842G 8860G 9266A 10506G 10920T<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13934T<br>14139G 14766T 15326G 15454C 16343G<br>16390A 16519C                                     |        |
| MI | C43 | J2 | 73G 150T 152C 263G 295T 489C 750G 1438G<br>2706G 3107C 4216C 4769G 5633T 7028T<br>7476T 8860G 10172A 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13708A 14569A 14766T 15257A<br>15326G 15452A 15812A 16069T 16126C<br>16278T                                       |        |
| MI | C44 | H1 | 263G 750G 1438G 1842G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15110A 15326G 16220C 16319A<br>16519C  |        |

|    |     |     |  |                         |
|----|-----|-----|--|-------------------------|
| MI | C47 | H20 | 263G 750G 1438G 4769G 7334C 8860G<br>10248C 15326G 16114T 16217C 16218T<br>16519C  |                         |
| MI | C51 | L3  | 73G 152C 199C 263G 750G 921C 1438G<br>1685A 2706G 3107C 4769G 5147A 7028T<br>7424G 8618C 8701G 8860G 9540C 10043T<br>10398G 10873C 11719A 11971T 12705T<br>13105G 13886C 14272T 14284T 14584C<br>14766T 15301A 15326G 15470C 16111T<br>16124C 16189C 16223T 16519C                             |                         |
| MI | C52 | H6  | 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A 4727G<br>4769G 8860G 9380A 10589A 15326G 16249C<br>16362C 16482G  | 14020C 14693G<br>16124C |
| MI | C54 | J1  | 73G 185A 228A 263G 295T 462T 485C 489C<br>750G 1438G 2969G 3010A 3398C 4025T<br>4216C 4769G 7028T 8860G 10398G 10410C<br>11251G 11719A 12561A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 15913T<br>16069T 16126C 16519C  | 1600T                   |
| MI | C55 | H   | 263G 750G 1438G 3107C 3705A 4769G 5015T<br>8860G 14064T 15326G 15562G  | 227G                    |
| MI | C57 | U2  | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3116T 3197C 3720G<br>4769G 5029C 5390G 5426C 6045T 6152C<br>7028T 8860G 10876G 11197T 11467G 11719A<br>11732C 12308G 12372A 13020C 13734C<br>14766T 15326G 15907G 16051G 16129A<br>16183C 16189C 16362C 16519C                    |                         |
| MI | C58 | J1  | 73G 188G 228A 263G 295T 462T 489C 750G<br>1438G 2706G 3010A 4216C 4769G 7028T<br>8860G 10398G 10463C 11251G 11719A<br>12612G 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C 16366T  | 16233G                  |
| MI | C59 | M1  | 73G 195C 263G 489C 750G 1438G 2706G<br>2746C 4769G 6446A 6680C 7028T 8701G<br>8860G 9540C 10398G 10400T 10685A 10873C<br>10895G 11719A 11914A 12403T 12705T<br>12950C 13111C 14110C 14766T 14783C<br>15043A 15301A 15326G 16129A 16183C<br>16189C 16213A 16223T 16249C 16311C<br>16399G 16519C |                         |



|    |     |    |   |              |
|----|-----|----|---|--------------|
| MI | C64 | V1 | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3421A 4580A<br>4639C 4769G 7028T 8860G 8869G 15326G<br>15904T 16298C 16519C   |              |
| MI | C67 | U4 | 73G 195C 263G 268T 499A 750G 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3567T 3987G 4646C<br>4769G 5999C 6047G 6116G 7028T 8818T<br>8860G 11332T 11467G 11719A 12308G<br>12372A 14620T 14766T 15326G 15693C<br>16482G 16519C  |              |
| MI | C68 | U2 | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3116T 3197C 3720G<br>4769G 5029C 5390G 5426C 6045T 6152C<br>7028T 8860G 10876G 11197T 11467G 11719A<br>11732C 12308G 12372A 13020C 13734C<br>14766T 15326G 15907G 16051G 16129A<br>16183C 16189C 16362C 16519C |              |
| MI | C69 | T2 | 73G 263G 458 709A 750G 930A 1438G 1709A<br>1888A 2706G 4216C 4769G 4917G 5147A<br>7028T 8697A 8860G 9300A 9383T 10463C<br>11251G 11533T 11719A 11812G 12007A<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16294T<br>16296T 16304C 16519C            |              |
| MI | C7  | J1 | 73G 152C 185A 188G 210G 228A 263G 295T<br>462T 489C 750G 1009T 1438G 2706G 3010A<br>3107C 4216C 4769G 7028T 8860G 10398G<br>10879G 11251G 11719A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C 16519C   |              |
| MI | C70 | U4 | 73G 195C 263G 499A 750G 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3672G 4646C 4769G 5999C<br>6047G 7028T 7705C 7853A 8860G 11332T<br>11339C 11467G 11719A 11965T 12308G<br>12372A 12957C 14620T 14766T 15326G<br>15693C 16356C   |              |
| MI | C72 | H5 | 152C 263G 456T 750G 1438G 3434G 4216C<br>4769G 7741C 8860G 15326G 16304C  | 6917A 9647C  |
| MI | C73 | H2 | 263G 750G 6629G 8860G 10810C 15326G<br>16274A 16519C  |              |
| MI | C74 | U5 | 73G 150T 228A 263G 750G 1438G 2706G<br>3197C 4769G 7028T 7226A 7768G 8071G<br>8860G 9477A 11467G 11719A 12308G<br>12372A 13617C 14182C 14766T 15326G<br>15793T 15900C 16172C 16192T 16270T<br>16304C  | 1630G 16129A |

|    |     |    |  |                                 |
|----|-----|----|--|---------------------------------|
| MI | C76 | K2 | 73G 146C 152C 263G 709A 750G 1438G<br>1811G 2706G 3480G 4561C 4769G 7028T<br>8860G 9055A 9698C 9716C 10550G 11299C<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13293T<br>14167T 14766T 14798C 15326G 15896G<br>16224C 16311C 16519C   |                                 |
| MI | C77 | T2 | 73G 263G 709A 750G 930A 1438G 1888A<br>2706G 3107C 4216C 4769G 4917G 5147A<br>7028T 8697A 8860G 9180G 9966A 10463C<br>11251G 11440A 11719A 11812G 13368A<br>14233G 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16126C 16183C 16189C<br>16292T 16294T 16296T 16304C 16519C |                                 |
| MI | C84 | H1 | 185A 188G 263G 750G 1438G 3010A 3107C<br>4659A 4769G 8860G 11215T 12810G 15326G<br>16209C 16519C   | 14207A                          |
| MI | C85 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 3107C 3531A 3721G 4216C<br>4769G 5198G 7028T 8734A 8860G 8994A<br>10398G 11251G 11719A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C 16300G   | 2371C                           |
| MI | C88 | H3 | 152C 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>11617C 15326G 16519C   |                                 |
| MI | C9  | U2 | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2524C 2706G 3720G 4769G 5390G<br>5426C 6045T 6152C 7028T 7151T 8860G<br>10876G 11176A 11467G 11719A 12308G<br>12346T 12372A 13020C 13734C 14766T<br>14974A 15326G 15907G 16051G 16129A<br>16189C 16221T 16362C 16519C     |                                 |
| MI | C90 | U8 | 73G 263G 282C 750G 1438G 1811G 2706G<br>3738T 4129G 4769G 5240G 6392C 6455T<br>7028T 7055G 8860G 9365T 9698C 10733T<br>11467G 11719A 12135A 12308G 12372A<br>13145A 14766T 15326G 16209C 16342C  |                                 |
| MI | C92 | H3 | 152C 263G 1438G 2707G 3107C 3398C 4769G<br>6776C 8860G 10343T 11590G 14687G 15326G<br>16519C   | 1201G                           |
| MI | C94 | J1 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 5048C 5442C<br>8860G 10398G 11251G 11719A 11908G<br>12612G 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C   | 73G 185A 195C<br>295T 462T 489C |

|    |       |     |  |              |
|----|-------|-----|--|--------------|
| MI | C95   | T2  | 73G 152C 263G 709A 750G 1438G 1888A<br>2706G 4216C 4769G 4917G 5147A 7028T<br>8697A 8860G 9254G 10463C 11251G 11719A<br>11812G 11984C 12172G 13368A 14233G<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16294T 16304C 16519C   | 9193T        |
| MI | C97   | HV1 | 228A 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4093G<br>4596A 4769G 5049T 7028T 8014T 8277C<br>8860G 11410C 15218G 15326G 16067T<br>16311C 16527T  |              |
| MI | CL1   | H15 | 55A 57C 146C 263G 750G 1438G 4769G<br>6253C 8860G 9181G 10653A 11410C 11914A<br>14953T 15326G 16184T   |              |
| MI | CL10  | N1  | 73G 199C 204C 207A 263G 669C 750G 1438G<br>1719A 2702A 2706G 3336C 4769G 5315G<br>7028T 7738C 8485A 8860G 8901G 10238C<br>10316G 10398G 11719A 12501A 12705T<br>13780G 13947T 14308C 14766T 15043A<br>15299C 15326G 16086C 16147A 16164G<br>16172C 16223T 16248T 16320T 16355T<br>16519C |              |
| MI | CL100 | T2  | 73G 195C 263G 709A 750G 930A 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4769G 4917G<br>5147A 7028T 8697A 8860G 10463C 11251G<br>11719A 11812G 13368A 14233G 14766T<br>14905A 15326G 15452A 15607G 15928A<br>16051G 16126C 16146G 16294T 16304C<br>16519C   | 2931G 11105T |
| MI | CL102 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 5665G<br>8860G 15326G 16519C   | 2852T        |
| MI | CL106 | J1  | 73G 185A 188G 263G 295T 462T 482C 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 3107C 3394C<br>4216C 4769G 7028T 7184G 8860G 9180G<br>10398G 11251G 11719A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C  | 1082G 3019A  |
| MI | CL11  | H3  | 146C 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>12957C 15326G 16519C   |              |
| MI | CL110 | H1  | 151T 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C<br>4769G 5460A 6710G 8860G 15326G 15817G<br>16295T 16519C  | 1760A        |

|    |       |     |  |             |
|----|-------|-----|--|-------------|
| MI | CL112 | H   | 263G 750G 1438G 4769G 8860G 15326G<br>16519C   | 1282A       |
| MI | CL114 | H1  | 73G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>6365C 8860G 15326G 16162G 16209C 16519C   |             |
| MI | CL115 | H3  | 263G 750G 1438G 1695T 2352C 3107C 4512A<br>4769G 5480G 6776C 8860G 11914A 14581C<br>15326G 16519C  |             |
| MI | CL116 | H13 | 72C 263G 750G 1438G 2259T 4745G 4769G<br>7567A 8860G 10410C 12192A 13542G 13680T<br>14872T 15326G 16311C   |             |
| MI | CL12  | H3  | 93G 95C 152C 263G 750G 1438G 1555G<br>4769G 6776C 8258C 8860G 15326G 16519C  |             |
| MI | CL120 | K1  | 73G 195C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3107C 3480G 4769G 7028T<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11719A 12308G 12372A 14167T<br>14766T 14798C 15326G 16224C 16311C<br>16519C 16524C                | 16093C      |
| MI | CL123 | W1  | 73G 189G 195C 204C 207A 263G 709A 750G<br>1243C 1438G 2706G 3107C 3505G 4769G<br>5046A 5460A 7028T 7864T 8251A 8860G<br>8994A 11674T 11719A 11947G 12414C<br>12705T 13395G 14766T 15326G 15884C<br>16223T 16292T 16320T 16519C   |             |
| MI | CL125 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 1700C 2706G 3107C<br>3197C 4769G 5495C 7028T 7238C 8860G<br>9477A 11467G 11719A 12308G 12372A<br>13617C 14766T 14793G 15218G 15326G<br>15924G 16176T 16256T 16270T 16399G                                    | 6259G       |
| MI | CL127 | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3480G 4769G 5984G 6260A 7028T<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11485C 11719A 11840T 12308G<br>12372A 13740C 14167T 14766T 14798C<br>15326G 16224C 16311C 16519C | 3081G 7684C |
| MI | CL133 | HV0 | 72C 195C 263G 750G 1438G 2706G 3826C<br>4769G 7028T 8860G 15326G 16298C  | 3022A       |

|    |       |     |   |                        |
|----|-------|-----|---|------------------------|
| MI | CL134 | T2  | 73G 146C 151T 263G 709A 750G 930A 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4769G 4917G<br>5147A 7028T 8697A 8860G 10463C 10750G<br>11251G 11593G 11719A 11812G 12375C<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16294T<br>16296T 16304C 16519C | 13332T                 |
| MI | CL138 | H6  | 150T 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A<br>4727G 4769G 8860G 9380A 11253C 15326G<br>16362C 16482G   |                        |
| MI | CL14  | H3  | 146C 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>12957C 15326G 16519C  | 2638C                  |
| MI | CL140 | X2  | 73G 195C 225A 226C 263G 750G 813G 1438G<br>1719A 2706G 3107C 4044G 4769G 6221C<br>6371T 7028T 8393T 8860G 9053A 11719A<br>12705T 13708A 13966G 14470C 14766T<br>15326G 15927A 16183C 16189C 16223T<br>16278T 16519C   |                        |
| MI | CL143 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 6956G<br>8860G 15326G 16311C 16519C   | 12221A                 |
| MI | CL145 | J1  | 73G 146C 185A 188G 222T 228A 235G 263G<br>295T 462T 489C 750G 1438G 2706G 3010A<br>3107C 4216C 4769G 7028T 8860G 10398G<br>10685A 11251G 11719A 12612G 13281C<br>13708A 13933G 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C 16291T 16519C                         | 2666C 16093C           |
| MI | CL146 | J1  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4769G<br>7028T 8860G 11719A 14766T  |                        |
| MI | CL147 | H1  | 263G 335G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16189C 16356C 16519C   | 6152C 15564G<br>15596A |
| MI | CL152 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>9986A 15326G 16145A 16519C   | 16239T                 |
| MI | CL153 | HV9 | 131C 152C 263G 750G 1438G 2706G 4769G<br>5441G 7028T 8860G 8994A 15326G 16311C<br>16390A  | 12894G                 |

|    |       |    |  |  |
|----|-------|----|--|--|
| MI | CL154 | H6 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G  | 72C 195C 239C<br>4727G 7371G<br>15289C 16153A<br>16362C 16482G |
| MI | CL158 | H2 | 263G 8860G 14178C 15326G 16235G 16291T<br>16357C   |  |
| MI | CL159 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 3107C 3531A 3721G 4216C<br>4769G 5198G 7028T 8734A 8860G 8994A<br>10398G 11251G 11719A 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C 16300G               |  |
| MI | CL16  | U3 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1811G 2294G<br>2706G 3010A 3107C 4703C 4769G 6518T<br>7028T 8860G 9266A 10506G 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13934T 14139G 14766T<br>15326G 15454C 16343G 16390A 16519C                                | 16129A   |
| MI | CL164 | H3 | 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>15326G 16519C   |  |
| MI | CL165 | H3 | 195C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C<br>8860G 12957C 14200C 15326G 16176T  | 146C 198T 10907G   |
| MI | CL166 | H3 | 195C 263G 750G 1438G 3027C 4769G 6776C<br>8860G 12957C 15326G 16176T   | 152C 8705  |
| MI | CL168 | H6 | 239C 263G 750G 1005C 1438G 2581G 3915A<br>4727G 4769G 6261A 7805A 8860G 9380A<br>11253C 15326G 16291T 16362C   | 8720A 8935T  |
| MI | CL169 | H3 | 152C 263G 750G 1438G 4679C 4769G 6776C<br>8860G 13404C 15326G 16239T 16311C<br>16519C  |  |
| MI | CL171 | K1 | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 6260A 7028T<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11485C 11719A 11840T 12308G<br>12372A 13740C 14167T 14766T 14798C<br>15326G 16224C 16311C 16519C |  |

|    |       |    |  |  |
|----|-------|----|--|--|
| MI | CL172 | U3 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1811G 2706G<br>3335A 3546A 4188G 4640A 4769G 7028T<br>7055G 8572A 8860G 9656C 11467G 11521G<br>11719A 12308G 12372A 13743C 14139G<br>14766T 15326G 15454C 15773A 16256T<br>16343G                                       | 16093C 16174T                                  |
| MI | CL174 | H3 | 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G 9575A<br>10915C 15326G 16519C  | 956T   |
| MI | CL175 | U5 | 73G 150T 194T 263G 750G 1438G 2706G<br>3107C 3197C 4769G 5656G 6216C 7028T<br>7080C 7768G 8860G 9477A 10398G 10586A<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13617C<br>14182C 14766T 15191C 15326G 16189C<br>16270T 16311C 16519C                          | 6260A  |
| MI | CL177 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 2757 3010A 3107C<br>3615G 3746T 4769G 8860G 14130T 15326G<br>16051G 16162G 16519C  |  |
| MI | CL178 | U5 | 73G 150T 263G 723G 750G 1438G 1721T<br>2706G 3106d 3107C 3197C 4718G 4769G<br>7028T 7768G 8860G 9477A 11467G 11719A<br>12308G 13017G 13617C 14182C 15001C<br>15326G 16270T   | 8839C 12372A<br>12418d 13637G<br>14766T 16184T |
| MI | CL179 | U2 | 73G 217C 228A 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3720G 4769G 5390G 5426C<br>6045T 6152C 7028T 8860G 10876G 11467G<br>11719A 12308G 12372A 13020C 13734C<br>14766T 15326G 15907G 16051G 16129A<br>16183C 16362C 16519C                      | 9152C 11684C                                   |
| MI | CL18  | T2 | 73G 263G 709A 750G 930A 1438G 1888A<br>2706G 4216C 4769G 4917G 5147A 7028T<br>7702A 8697A 8860G 10463C 10750G 11251G<br>11719A 11812G 13368A 14233G 14334T<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16294T 16296T 16304C<br>16519C | 15553A 15831C                                  |
| MI | CL180 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 4859C 8860G<br>15326G 15941C 16129A 16519C   | 12083C 15639C                                  |
| MI | CL181 | T2 | 73G 263G 385G 709A 750G 930A 1438G<br>1530G 1888A 2706G 4216C 4769G 4917G<br>5147A 7028T 8697A 8860G 10463C 11251G<br>11719A 11812G 13368A 14233G 14766T<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16266T 16274A 16294T 16304C 16519C             |  |

|    |       |    |  |                                       |
|----|-------|----|--|---------------------------------------|
| MI | CL182 | H4 | 263G 750G 1438G 3107C 3992T 4024G 4769G<br>5004C 8860G 9123A 14582G 15326G 16213A  | 1664A                                 |
| MI | CL188 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16311C 16519C  | 12366G 15153A                         |
| MI | CL189 | V1 | 72C 263G 508G 709A 750G 1438G 2706G<br>4580A 4769G 7028T 8860G 15191C 15326G<br>15904T 16298C  | 310C                                  |
| MI | CL190 | U5 | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3197C 3498T 4769G 4772C 5656G 6674C<br>7028T 7768G 8860G 9477A 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13617C 13713A 14182C<br>14766T 15326G 15777A 15924G 16167T<br>16270T 16311C 16318G 16356C  | 11323T 13986G<br>16290T               |
| MI | CL191 | H7 | 263G 750G 1438G 4769G 4793G 5836G<br>15326G 15409T 16320T 16342C 16519C  | 8860G 12418d                          |
| MI | CL192 | M1 | 73G 152C 195C 263G 489C 513A 750G 813G<br>1438G 2706G 3107C 4769G 6446A 6671C<br>6680C 7028T 8701G 8860G 9540C 10398G<br>10400T 10873C 11719A 12403T 12705T<br>12950C 14110C 14127G 14766T 14783C<br>15043A 15172A 15301A 15326G 15884C<br>16129A 16183C 16189C 16223T 16249C<br>16311C 16519C |                                       |
| MI | CL193 | H1 | 263G 477C 750G 1438G 3010A 4769G 8803G<br>8860G 11944C 15326G 16319A 16519C  | 248d 12418d                           |
| MI | CL194 | U6 | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3348G 4769G<br>7028T 7337A 7805A 8860G 11719A 12308G<br>12372A 14766T 15043A 15326G 16172C<br>16189C 16219G 16278T 16390A 16465T   | 922C 1660T<br>10437T 10806T<br>11467G |
| MI | CL195 | U4 | 73G 195C 263G 499A 750G 1438G 1811G<br>2706G 3107C 4646C 4769G 5999C 6047G<br>6827C 7028T 8818T 8860G 11332T 11467G<br>11719A 12172G 12308G 12372A 14620T<br>14766T 15326G 15693C 16356C 16519C  | 16362C                                |
| MI | CL196 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 8860G 9356T<br>15326G 16519C   | 16129A                                |



|    |       |    |  |             |
|----|-------|----|--|-------------|
| MI | CL197 | H3 | 263G 293C 750G 1438G 4769G 5495C 6776C<br>8860G 12346T 15326G 15530C 16519C  | 14530C      |
| MI | CL198 | H7 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 4793G 5836G<br>8860G 15326G 15409T 16320T 16342C<br>16519C   | 199C        |
| MI | CL200 | J2 | 73G 150T 152C 263G 295T 489C 750G 1438G<br>2706G 3107C 4216C 4769G 5633T 7028T<br>7476T 8622T 8860G 10172A 10398G 11251G<br>11719A 12612G 13708A 14569A 14766T<br>15257A 15326G 15452A 15812A 16069T<br>16126C 16193T 16278T | 4157T       |
| MI | CL201 | T2 | 73G 263G 709A 750G 1438G 1888A 2706G<br>3107C 4769G 7028T 8697A 8860G 11719A<br>11812G 13368A 14766T 15326G 15452A<br>15928A 16126C 16153A 16294T 16519C   | 4530A 9122C |
| MI | CL203 | H3 | 10C 263G 750G 1438G 3107C 3324T 4769G<br>6719C 6776C 8470G 8860G 11470G 15326G<br>16129A 16172C 16519C   | 6764A       |
| MI | CL204 | U5 | 73G 150T 263G 533G 750G 1438G 2706G<br>3107C 3197C 3507A 4769G 5656G 7028T<br>7768G 8860G 9116C 9477A 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13617C 14182C 14766T<br>15326G 16192T 16270T 16319A                                     |             |
| MI | CL205 | K1 | 73G 195C 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3480G 3552C 4769G 7028T<br>8842G 8860G 9055A 9698C 10398G 10550G<br>11299C 11467G 11719A 11914A 12308G<br>12372A 14167T 14766T 14798C 15326G<br>16224C 16311C 16519C      | 16093C      |
| MI | CL206 | H1 | 150T 152C 263G 750G 1438G 3010A 4769G<br>7762A 8860G 15326G 16519C   |             |
| MI | CL207 | U5 | 73G 150T 195C 263G 636G 750G 1438G<br>2706G 3107C 3197C 4769G 5656G 7028T<br>7768G 8860G 9477A 11467G 11719A 12308G<br>12372A 13617C 14182C 14766T 15326G<br>15883A 16183C 16189C 16519C                                     |             |
| MI | CL210 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>9356T 15326G 16278T 16519C  |             |

|    |       |    |   |
|----|-------|----|---|
| MI | CL213 | V3 | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 12810G 12840T 15326G 3065C<br>15431A 15904T 16240G 16298C  |
| MI | CL215 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 4580A 4769G<br>7028T 8860G 9380A 15326G 15904T 16298C 16093C<br>16519C 16524C   |
| MI | CL22  | U3 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1811G 2294G<br>2706G 3010A 4703C 4769G 6518T 7028T<br>7521A 8860G 9266A 10506G 11467G 11719A 5563A 14530C<br>12308G 12372A 13934T 14139G 14766T<br>15326G 15454C 16343G 16390A 16519C  |
| MI | CL222 | H+ | 263G 750G 1438G 1601T 2706G 3107C 3721G<br>4769G 5003A 7028T 8860G 12092A 15326G<br>16189C 16311C   |
| MI | CL226 | H1 | 195C 263G 750G 961G 1438G 3107C 4769G<br>8448C 8860G 13759A 15326G 16265G 1147A 2365C<br>16293G 16311C 12128G   |
| MI | CL228 | H1 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G 9091G<br>12651A 14470C 15326G 16519C 9152C 11377A   |
| MI | CL23  | H4 | 195C 263G 750G 1438G 4769G 5442C 8860G<br>13663T 15326G 16519C 16093C   |
| MI | CL230 | H6 | 239C 263G 750G 1438G 3915A 4727G 4769G<br>8860G 9380A 11253C 15326G 16362C 16482G   |
| MI | CL231 | HV | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3200C<br>4769G 7028T 8860G 10084C 10196T 15326G<br>15904T 16126C 16298C 16346C  |
| MI | CL233 | U2 | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 3720G 4769G 5390G 5426C 6045T<br>6152C 6956C 7028T 8860G 10876G 11092G 310C 12372A<br>11467G 11719A 12308G 13020C 13734C 16180d 16183C<br>14766T 15326G 15907G 16051G 16129C 16184d 16390A<br>16189C 16362C 16519C |
| MI | CL234 | U3 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1811G 2706G<br>2833G 3546A 4188G 4640A 4769G 7028T<br>7759C 8860G 8895C 9656C 11119T 11467G<br>11719A 12308G 12372A 12738G 13743C<br>14139G 14766T 15262C 15326G 15454C<br>16343G  |

|    |       |    |   |                              |
|----|-------|----|---|------------------------------|
| MI | CL24  | H1 | 263G 477C 750G 1438G 3010A 4769G 5177A<br>8860G 13759A 15326G 16519C  |                              |
| MI | CL240 | I  | 73G 263G 750G 1438G 2626C 3107C 4769G<br>5775C 8860G 9947A 10034C 10238C 10398G<br>10915C 11719A 12501A 12705T 13780G<br>14766T 15043A 15326G 15924G 16129A<br>16172C 16223T 16311C 16391A 16519C   | 8616T                        |
| MI | CL241 | H3 | 152C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 5492C<br>8860G 15326G 15519C 15622C 16291T<br>16519C   | 4157T 7428A<br>13269G 15927A |
| MI | CL242 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 4216C 4769G 5308T 7028T<br>8860G 10398G 11251G 11719A 12182G<br>12612G 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C 16145A 16261T   | 4157T                        |
| MI | CL248 | H1 | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 11864C 15326G 16519C  |                              |
| MI | CL249 | H6 | 93G 239C 263G 750G 1438G 3915A 4727G<br>4769G 8860G 9380A 11253C 15326G 16147A<br>16362C 16482G   |                              |
| MI | CL25  | U5 | 10C 73G 228A 263G 750G 1438G 2706G<br>3107C 3197C 4769G 7028T 8860G 9477A<br>10619T 11467G 11719A 12015C 12308G<br>12372A 13617C 14632T 14766T 14793G<br>15326G 16192T 16256T 16270T 16526A   |                              |
| MI | CL251 | T2 | 73G 146C 152C 189G 263G 279C 709A 750G<br>1438G 1888A 2706G 4216C 4769G 4917G<br>5187T 6261A 7028T 7873T 8697A 8860G<br>10463C 10822T 11251G 11719A 11812G<br>12358G 13368A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16292T 16294T 16519C        | 4157T                        |
| MI | CL255 | N1 | 73G 215G 263G 750G 1438G 1598A 1703T<br>1719A 2222C 2639T 2706G 2775G 3921A<br>4769G 4960T 5471A 5913A 7028T 8251A<br>8472T 8836G 8860G 9180G 9335T 10238C<br>11362G 11719A 12397G 12501A 12705T<br>12822G 14766T 15326G 15924G 16145A<br>16176T 16223T 16390A 16519C | 4157T                        |

|    |       |    |   |       |
|----|-------|----|---|-------|
| MI | CL259 | V3 | 72C 263G 750G 1438G 2706G 4580A 4769G<br>7028T 8860G 12810G 12840T 15326G 15431A<br>15904T 16240G 16298C  |       |
| MI | CL26  | T2 | 73G 152C 189G 214G 263G 709A 750G 930A<br>1438G 1888A 2706G 3107C 4216C 4769G<br>4917G 5147A 7028T 8697A 8860G 9254G<br>10463C 11251G 11719A 11812G 13368A<br>14233G 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16126C 16260T 16294T<br>16304C 16519C | 9714A |
| MI | CL261 | H4 | 73G 263G 750G 1438G 3992T 4024G 4769G<br>5004C 5318T 8269A 8860G 9123A 10007C<br>10034C 10044G 14365T 14582G 15326G   |       |
| MI | CL264 | H3 | 151T 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>11518A 14687G 15326G 16192T 16519C  |       |
| MI | CL265 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 4580A 4769G<br>6773T 7028T 8860G 10978C 12684A 15326G<br>15904T 16129A 16234T 16298C  |       |
| MI | CL266 | U5 | 73G 263G 750G 1438G 1700C 2706G 3197C<br>4769G 5495C 6040G 7028T 8860G 9477A<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13617C<br>14766T 14793G 15218G 15326G 15924G<br>16129A 16256T 16270T 16399G   |       |
| MI | CL268 | H1 | 152C 263G 279C 750G 1438G 1692G 3010A<br>3107C 4769G 5237A 8860G 11422A 12972G<br>15326G 15391T 15970C 16221T 16519C  | 1763G |
| MI | CL269 | H1 | 239C 263G 750G 1438G 2501T 3010A 3107C<br>4769G 8496C 8860G 15326G 15758G 16519C  |       |
| MI | CL27  | RO | 64T 263G 451G 750G 1438G 2442C 2706G<br>3107C 3275A 3847C 4769G 7028T 8860G<br>9620T 11969A 13188T 14668T 14766T<br>14905A 15326G 16126C 16362C   |       |
| MI | CL270 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5774 8860G<br>15088T 15326G 16270T 16519C   | 217C  |
| MI | CL275 | H1 | 263G 477C 709A 750G 1438G 3010A 3107C<br>4769G 8860G  |       |

|    |       |    |   |                        |
|----|-------|----|---|------------------------|
| MI | CL276 | HV | 263G 750G 930A 1438G 1888A 2706G 3107C<br>4216C 4769G 4917G 5147A 7028T 8860G<br>12618A 14798C 15287C 15326G 16304C   | 709A 8697A             |
| MI | CL277 | H3 | 152C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C<br>8860G 15326G 15553A 16519C  | 463T 4157T 9152C       |
| MI | CL278 | H  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16519C  | 678C 3796G<br>16114T   |
| MI | CL284 | T1 | 73G 263G 709A 750G 1438G 1888A 2706G<br>3107C 4216C 4769G 4917G 7028T 7142C<br>8697A 8860G 10463C 11251G 11719A 12633A<br>13368A 14766T 14905A 15028T 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16163G<br>16189C 16243C 16294T 16519C | 4157T                  |
| MI | CL288 | J2 | 73G 150T 152C 263G 295T 489C 750G 1438G<br>2706G 4216C 4769G 5633T 6216C 6893T<br>7028T 7476T 8860G 10172A 10398G 11251G<br>11719A 12612G 12882T 13708A 14766T<br>15257A 15326G 15452A 15812A 16069T<br>16126C 16193T 16278T      | 204C 9178A<br>9461G    |
| MI | CL289 | H1 | 263G 477C 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16519C   | 246C 4157T 7080C       |
| MI | CL291 | H2 | 263G 750G 6629G 8860G 10810C 15326G<br>16274A 16519C  | 1717C 4961G            |
| MI | CL296 | K1 | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3480G 4769G 5742T 7028T<br>8860G 9055A 9698C 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11470G 11719A 11914A 12308G<br>12372A 14167T 14766T 14798C 15326G<br>15924G 16278T 16311C 16519C  | 204C 9178A<br>9461G    |
| MI | CL299 | H1 | 263G 750G 1438G 4769G 6341T 8860G<br>13768C 15326G 16239T 16242T 16519C   | 3010A 12418d<br>13225A |
| MI | CL3   | V  | 72C 152C 263G 750G 1438G 2706G 4580A<br>4769G 7028T 7055G 8860G 14203G 15326G<br>15904T 16153A 16298C   |                        |

|    |       |    |  |                        |
|----|-------|----|--|------------------------|
| MI | CL301 | H1 | 263G 750G 1438G 4769G 8860G 15326G<br>16356C 16519C  | 3010A 12418d<br>16189C |
| MI | CL304 | T2 | 73G 263G 709A 750G 930A 1438G 1888A<br>2706G 2857C 4216C 4769G 4917G 5147A<br>7028T 8697A 8860G 9077C 10463C 10704A<br>11251G 11719A 11812G 12030G 13368A<br>14233G 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16126C 16294T 16296T<br>16304C 16519C         |                        |
| MI | CL305 | H3 | 263G 750G 1438G 2581G 3107C 4769G 5911T<br>6776C 8860G 14002G 15326G 16129A 16519C   | 9471C 13676G           |
| MI | CL310 | H6 | 150T 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A<br>4727G 4769G 5294T 7805A 8860G 9380A<br>11253C 13749T 15326G 16362C 16482G   | 204C 709A<br>16129A    |
| MI | CL314 | J1 | 73G 185A 188G 228A 263G 295T 462T 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 3394C 4216C<br>4769G 5773A 7028T 7184G 8760C 8860G<br>10398G 11251G 11719A 12192A 12612G<br>13708A 14766T 14798C 15326G 15452A<br>16069T 16126C 16201   | 588C                   |
| MI | CL315 | T2 | 73G 146C 152C 189G 263G 279C 709A 750G<br>1438G 1888A 2706G 4216C 4769G 4917G<br>5187T 6261A 7028T 7873T 8697A 8860G<br>10463C 10822T 11251G 11719A 11812G<br>12358G 13368A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16292T 16294T 16519C |                        |
| MI | CL318 | H1 | 263G 750G 1438G 2438G 3107C 3915A 4769G<br>8860G 15326G 16129A 16400T 16519C   |                        |
| MI | CL32  | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 7202G 8602C<br>8860G 14212C 15326G 16182C 16189C<br>16224C 16519C  |                        |
| MI | CL322 | H5 | 263G 456T 750G 1438G 4336C 4769G 8860G<br>9531G 12864C 15326G 15833T 16193T<br>16304C  | 2673A 4157T            |

|    |       |    |   |   |
|----|-------|----|---|---|
| MI | CL324 | HV | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3618C<br>4769G 6266G 7028T 8860G 13029T 15001C<br>15326G  | 1134A 4157T<br>8658T 16298C<br>16362C         |
| MI | CL325 | H5 | 263G 750G 1438G 4769G 7859A 8860G 9380A<br>9612A 13938T 14323A 15326G 16519C  | 922A 2405 3106d                               |
| MI | CL326 | U5 | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3197C<br>4769G 7028T 8860G 9477A 9667G 11467G<br>11719A 12308G 12372A 13617C 14766T<br>14793G 15218G 15326G 16256T 16270T<br>16291T 16399G  | 12082G 12101C<br>15096C                       |
| MI | CL327 | W1 | 73G 195C 204C 207A 263G 709A 750G 1243C<br>1438G 3505G 4769G 5046A 5460A 7028T<br>7046G 7864T 8251A 8860G 8994A 11674T<br>11719A 11947G 12414C 12705T 14766T<br>15326G 15884C 16223T 16519C                         | 119C 189G 16292T                              |
| MI | CL328 | H1 | 72C 152C 263G 750G 1438G 3010A 3106d<br>4769G 8860G 15326G  | 16519C  |
| MI | CL329 | H9 | 750G 3591A 4310G 8860G 12456A 13020C<br>15326G 16168T 16519C  | 152C 237G 263G<br>1438G 4769G                 |
| MI | CL33  | H2 | 195C 263G 750G 1438G 4769G 8860G 15326G<br>16519C   | 16293G  |
| MI | CL330 | T2 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1888A 2850C<br>3106d 4216C 4769G 4917G 7022C 7028T<br>8697A 8860G 10463C 11812G 13368A 14687G<br>14766T 14905A 15187G 15326G 15452A<br>15607G 15787C 16126C 16294T 16296T<br>16362C 16519C | 709A 11251G<br>11719A 13965C<br>14233G 15928A |
| MI | CL332 | U5 | 73G 150T 263G 517T 750G 1438G 1721T<br>2755G 3197C 4769G 7028T 7768G 8860G<br>9477A 11467G 11653G 11719A 12308G<br>12372A 12634G 13617C 13637G 14180C<br>14182C 14766T 15191C 15326G 15905C<br>16224C 16270T        | 9707C 12418d<br>13630G                        |
| MI | CL333 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 3010A 3106d 4769G<br>6734A 8860G 10143A 11140T 15326G 16519C  |   |

|    |       |    |  |   |
|----|-------|----|--|---|
| MI | CL337 | H1 | 73G 263G 750G 1438G 3010A 3106d 4769G<br>8860G 16051G 16162G 16264T 16465T<br>16519C   | 204C 12418d<br>15326G                                     |
| MI | CL343 | L2 | 150T 152C 182T 195C 198T 204C 263G 418T<br>750G 769A 1018A 1438G 1442A 1706T 2332T<br>2358G 2416C 3594T 4104G 4158G 4370C<br>4767G 4769G 5027T 5331A 5814C 6026A<br>6480A 6713T 7028T 7055G 7256T 7521A<br>7624A 8080T 8206A 8387A 8701G 8860G<br>9221G 9540C 10115C 10398G 10828C 10873C<br>11719A 11944C 12236A 12705T 12948G<br>13590A 13650T 13924T 14059G 14437G<br>14766T 15110A 15301A 15326G 16114A<br>16129A 16213A 16278T 16355T 16362C<br>16390A 16519C | 73G 514d 515d<br>12406A 15217A<br>15872G 16093C<br>16223T |
| MI | CL344 | I4 | 73G 199C 204C 250C 263G 750G 1438G<br>1719A 4529T 4769G 7028T 8251A 8519A<br>8860G 9090C 10034C 10238C 11719A 12501A<br>12705T 13780G 14766T 15043A 15326G<br>15924G 16129A 16223T 16304C 16391A<br>16519C   | 146T 182T<br>10398G 10819G                                |
| MI | CL345 | V  | 72C 263G 750G 1438G 3106d 4580A 4769G<br>7028T 8860G 15904T 16051G 16298C  | 15326G  |
| MI | CL35  | H5 | 93G 263G 456T 513A 750G 1438G 4336C<br>4769G 8860G 9123A 10915C 15326G 15884C<br>16304C 16519C   | 8645G   |
| MI | CL36  | J1 | 73G 242T 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2158C 2706G 3010A 3107C 4216C 4769G<br>5460A 7028T 8269A 8557A 8860G 10398G<br>11251G 11719A 12007A 12612G 13708A<br>13879C 14766T 15326G 15452A 16069T<br>16126C 16145A 16172C 16261T  | 228A 6121C<br>12351C                                      |
| MI | CL37  | J1 | 73G 185A 263G 295T 462T 482C 489C 750G<br>1438G 2706G 3010A 3394C 4216C 4769G<br>5276G 7028T 8860G 10398G 11227T 11251G<br>11719A 12612G 13647T 13708A 14766T<br>14798C 15326G 15337T 15452A 16069T<br>16126C 16172C   |   |
| MI | CL38  | H1 | 263G 477C 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16519C  |   |



|    |      |    |   |                  |
|----|------|----|---|------------------|
| MI | CL4  | J1 | 73G 185A 228A 263G 295T 462T 482C 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 3107C 3394C<br>4216C 4769G 7028T 7142C 7184G 7861C<br>8860G 9531G 9575A 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C   |                  |
| MI | CL40 | U2 | 73G 114T 152C 217C 263G 340T 508G 750G<br>1438G 1811G 2706G 3107C 3116T 3720G<br>4769G 5390G 5426C 6045T 6152C 7028T<br>8860G 10876G 10915C 11197T 11467G<br>11719A 11732C 12308G 12372A 13020C<br>13734C 14766T 15326G 15907G 16051G<br>16129A 16183C 16189C 16362C 16519C                                 |                  |
| MI | CL41 | HV | 72C 93G 263G 750G 1438G 2706G 4769G<br>7028T 8860G 8982G 14144T 15326G 15904T<br>16298C 16527T  |                  |
| MI | CL43 | HV | 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4769G<br>7028T 8860G 9293T 10609C 15326G 15454C<br>16298C  |                  |
| MI | CL44 | H6 | 152C 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A<br>4727G 4769G 8860G 9380A 11253C 15326G<br>16362C 16482G   |                  |
| MI | CL47 | M1 | 73G 195C 215G 263G 489C 750G 813G 1438G<br>2706G 3705A 4769G 6164T 6446A 6455T<br>6671C 6680C 7028T 7853A 8701G 8860G<br>9540C 10398G 10400T 10873C 11719A<br>12346T 12403T 12705T 12950C 14110C<br>14766T 14769G 14783C 15043A 15301A<br>15326G 16129A 16183C 16189C 16223T<br>16249C 16311C 16359C 16519C |                  |
| MI | CL51 | HV | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3197C<br>4655A 4769G 7028T 8860G 11365C 15326G<br>15904T 16298C   |                  |
| MI | CL52 | J1 | 73G 146C 185A 188G 263G 750G 1211A<br>1438G 2706G 3348G 4769G 7028T 7805A<br>8860G 10398G 10685A 11251G 11719A<br>12438C 12612G 13281C 13708A 13933G<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C 16519C   | 222T 228A 15773A |
| MI | CL54 | H1 | 263G 750G 1438G 3107C 3915A 4769G 6296T<br>8860G 12795A 15326G 16519C   |                  |

|    |      |    |   |   |
|----|------|----|---|---|
| MI | CL55 | H  | 263G 750G 1438G 4769G 8860G 15326G  | 72C 93G 195d<br>263G 280T 961G<br>1884A 8448C<br>10398G 10410C<br>13928C 15904T<br>16189C 16298C<br>16311C 16519C |
| MI | CL57 | HV | 263G 750G 930A 1438G 1530G 1888A 2706G<br>3107C 4216C 4769G 4917G 5147A 7028T<br>8860G 15326G 16129A 16400T 16519C  | 709A 8697A  |
| MI | CL58 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16519C  | 4157T   |
| MI | CL59 | T2 | 73G 263G 750G 1438G 3010A 4769G 8860G<br>10463C 11251G 11719A 11812G 13368A<br>14233G 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16051G 16126C 16146G<br>16294T 16304C 16519C   | 709A 8697A  |
| MI | CL64 | T2 | 73G 263G 750G 1438G 1888A 2086G 2706G<br>3107C 4216C 4769G 4917G 4961G 5322C<br>7028T 7777T 8697A 8860G 10463C 10577G<br>11251G 11719A 11812G 13368A 14118G<br>14233G 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16126C 16189C 16294T<br>16362C 16519C  |   |
| MI | CL67 | U5 | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3010A 4216C<br>4232C 4769G 7028T 8404C 8860G 9477A<br>9548A 11467G 11719A 12308G 12372A<br>13617C 14766T 14793G 15326G 16192T<br>16256T 16270T 16526A   | 709A 8697A  |
| MI | CL68 | U6 | 73G 146C 263G 750G 1438G 2706G 4580A<br>4769G 7028T 8860G 11268T 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13431T 14179G 14766T<br>15326G 15634G 15790T 16172C 16182C<br>16183C 16189C 16219G 16278T   |   |
| MI | CL69 | H5 | 152C 263G 456T 750G 1438G 3107C 4336C<br>4769G 8860G 15326G 16111T 16304C   |   |
| MI | CL7  | U2 | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3116T 3720G 4769G 5390G<br>5426C 6045T 6152C 7028T 8860G 10876G<br>11197T 11467G 11719A 11732C 12308G<br>12372A 13020C 13734C 14766T 15326G<br>15907G 16051G 16129A 16183C 16189C<br>16362C 16519C |   |

|    |      |    |   |               |
|----|------|----|---|---------------|
| MI | CL70 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3421A<br>4580A 4769G 7028T 8860G 15326G 15904T<br>16234T 16519C   | 15130T 16399G |
| MI | CL72 | K1 | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3480G 4769G 6260A 6510A 7028T<br>9055A 9698C 9803T 10398G 10550G 11299C<br>11467G 11485C 11719A 11840T 12308G<br>12372A 13740C 14167T 14766T 14798C<br>15326G 15721C 16224C 16311C 16519C                               |               |
| MI | CL73 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 8860G 9986A<br>15326G 16145A 16519C   |               |
| MI | CL74 | H5 | 204C 263G 456T 750G 1438G 4769G 5082C<br>6167C 7837C 8860G 12618A 14798C 15287C<br>15326G 16304C  | 1966A         |
| MI | CL76 | H1 | 263G 750G 1438G 2438G 3107C 3915A 4769G<br>8860G 15326G 16129A 16400T 16519C  | 709A          |
| MI | CL77 | J1 | 73G 146C 185A 188G 228A 263G 295T 462T<br>489C 750G 1438G 2706G 3010A 4216C 4769G<br>7028T 8860G 10398G 10685A 11251G 11719A<br>12438C 12612G 13281C 13708A 13933G<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C 16519C   | 222T 15773A   |
| MI | CL84 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 11365C 15326G 15904T<br>16298C   | 2894C         |
| MI | CL85 | I1 | 73G 199C 203A 204C 250C 263G 750G 1438G<br>1719A 2706G 3107C 3447G 3990T 4529T<br>4769G 5460A 6734A 7028T 8616T 8860G<br>9947A 10034C 10238C 10398G 10915C<br>11719A 12501A 12705T 13780G 14766T<br>15043A 15326G 15924G 16129A 16172C<br>16223T 16311C 16391A 16519C | 1211A         |
| MI | CL88 | V  | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 6773T 7028T 8860G 15326G 15904T<br>16234T 16519C   | 15130T 16399G |
| MI | CL9  | V  | 72C 152C 263G 750G 1438G 2706G 4580A<br>4769G 6605G 7028T 7055G 8860G 10084C<br>14203G 15326G 15904T 16153A 16298C  | 14803A 16265C |

|       |      |     |  |                         |
|-------|------|-----|--|-------------------------|
| MI    | CL90 | V   | 72C 150T 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>4580A 4769G 7028T 8860G 15326G 15904T<br>16298C  |                         |
| MI    | CL92 | A1  | 73G 235G 263G 663 750G 1438G 1736 2706G<br>4248C 4769G 4824G 5393C 7028T 7468T<br>8794T 8860G 9948A 10094T 11719A 12705T 2123T<br>14766T 14793G 15326G 15565C 16223T<br>16227C 16290T 16311C 16319A 16519C   |                         |
| MI    | CL94 | T2  | 73G 263G 385G 709A 750G 930A 1438G<br>1530G 1888A 2706G 3107C 4216C 4769G<br>4917G 5147A 7028T 8697A 8860G 10463C<br>11251G 11719A 11812G 13368A 14233G<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16266T 16274A 16294T<br>16304C 16519C |                         |
| MI    | CL95 | V   | 72C 263G 750G 1438G 2706G 3107C 4580A<br>4769G 7028T 8860G 15326G 15904T 16298C  |                         |
| MI    | CL97 | HV  | 72C 195C 198T 750G 1438G 2706G 4769G<br>7028T 8520G 8860G 15326G 16298C  | 12443C 15030C           |
| AMBAS | C103 | H11 | 195C 263G 750G 961G 1438G 3107C 4769G<br>6481C 8448C 8860G 13759A 15326G 16213A<br>16293G 16311C   | 675G 16086C             |
| AMBAS | C104 | T1  | 73G 152C 195C 263G 709A 750G 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4491A 4769G<br>4917G 5585A 7028T 7080C 8697A 8860G<br>9899C 10463C 11251G 11719A 12633A<br>13368A 14766T 14905A 15326G 15452A<br>15607G 15928A 16126C 16163G 16189C<br>16294T 16519C   |                         |
| AMBAS | C105 | H7  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 4793G 5348T<br>8860G 14514C 15326G 16185T 16519C   |                         |
| AMBAS | C107 | J1  | 73G 242T 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2158C 2706G 3010A 4216C 4769G 5460A<br>7028T 8269A 8557A 8860G 10398G 11719A<br>12007A 12612G 13708A 13879C 14766T<br>15326G 15452A 16069T 16126C   | 12711G 13186G<br>15237C |

|       |      |    |  |   |
|-------|------|----|--|---|
| AMBAS | C113 | H3 | 152C 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>10754C 12040G 15326G 16320T 16519C   |   |
| AMBAS | C117 | J2 | 73G 150T 195C 215G 263G 295T 319C 489C<br>513A 750G 1438G 2392C 2706G 3107C 4216C<br>4769G 7028T 7476T 7789A 8860G 10398G<br>10499G 11251G 11377A 11719A 12612G<br>13708A 13722G 14133G 14766T 15257A<br>15326G 15452A 16069T 16126C 16145A<br>16231C 16261T | 3849A   |
| AMBAS | C118 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3394C 4769G<br>5460A 8512G 8860G 14458T 14902T 15326G<br>16519C  |   |
| AMBAS | C119 | H1 | 263G 750G 1438G 2249T 4688C 7399T 8206A<br>8860G 15326G 16519C   | 10861C 11017C<br>11023C                                       |
| AMBAS | C128 | H  | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3197C 4224T<br>4769G 5495C 7028T 8860G 11422T  | 1700C   |
| AMBAS | C129 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 7762A 8860G<br>15326G 16129A 16311C 16519C   | 150T 11167G<br>15629C   |
| AMBAS | C13  | U5 | 73G 152C 263G 750G 1438G 2706G 3197C<br>4721G 4769G 5354T 6340T 7028T 8860G<br>9477A 10082T 10619T 11467G 11719A<br>12308G 12372A 13521T 13617C 14766T<br>14793G 15326G 16256T 16270T 16311C<br>16526A   |   |
| AMBAS | C130 | M1 | 73G 152C 195C 263G 489C 750G 813G 1438G<br>4769G 6446A 6671C 6680C 7028T 8701G<br>8860G 9540C 10398G 10400T 10873C 11719A<br>12403T 12705T 14110C 14127G 14766T<br>14783C 15043A 15301A 15326G 15884A<br>16129A 16189C 16223T 16249C 16311C<br>16519C        | 513A 9540C<br>12950C 15172A<br>15653G 16180d<br>16183C 16184d |
| AMBAS | C135 | W3 | 73G 189G 195C 204C 207A 263G 709A 750G<br>1243C 1406C 1438G 2706G 3107C 3505G<br>4769G 4928C 5046A 5460A 6899A 7028T<br>8251A 8860G 8994A 11674T 11719A 11947G<br>12414C 12705T 13263G 14766T 15326G<br>15784C 15884C 16223T 16243C 16519C                   |   |

|       |      |    |   |  |
|-------|------|----|---|--|
| AMBAS | C137 | H3 | 263G 709A 750G 1438G 3970T 4769G 6776C<br>8860G 9254G 13958C 14662G 15326G<br>16399G 16519C   | 152C                                   |
| AMBAS | C141 | H3 | 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>15326G 16519C  |  |
| AMBAS | C144 | U4 | 73G 195C 263G 499A 750G 1438G 1811G<br>2706G 3672G 4646C 4769G 5999C 6047G<br>7028T 7705C 7853A 8860G 11332T 11339C<br>11467G 11719A 11965T 12308G 12372A<br>12957C 14620T 14766T 15326G 15693C<br>16356C 16519C  |  |
| AMBAS | C148 | H3 | 195C 263G 750G 1438G 4769G 6776C 8860G<br>12957C 14200C 15326G 16176T   |  |
| AMBAS | C150 | K1 | 73G 146C 195C 263G 750G 1187C 1189C<br>1438G 1811G 2706G 3480G 4769G 5237A<br>5913A 6845T 7028T 8860G 9055A 9698C<br>10154G 10398G 10550G 11299C 11467G<br>11719A 12308G 12372A 12738G 14167T<br>14766T 14798C 15301A 15326G 16183C<br>16189C 16224C 16260T 16311C 16519C | 14356A                                 |
| AMBAS | C155 | K1 | 73G 114T 263G 497T 750G 1189C 1438G<br>1811G 2706G 3480G 4769G 7028T 8860G<br>9698C 9932A 10398G 10550G 11299C 11467G<br>11470G 11719A 11914A 12308G 12372A<br>14167T 14766T 14798C 15326G 15884C<br>15924G 16224C 16311C 16519C  |  |
| AMBAS | C157 | J1 | 73G 185A 188G 195C 228A 263G 295T 462T<br>489C 750G 1438G 2706G 3010A 3107C 3915A<br>4216C 4769G 7028T 8860G 10398G 11251G<br>11719A 11821G 12453C 12612G 13708A<br>14766T 14798C 15326G 15452A 16069T<br>16126C 16291T 16293G 16519C                                     | 773C                                   |
| AMBAS | C160 | L3 | 150T 263G 3106d 750G! 1438G 2352C 4769G<br>5460A 7028T 8392A 8519A 8701G 8860G<br>9540C 10398G 10819G 10873C 11719A<br>12705T 13317A 14766T 15301A 15326G<br>16041G 16223T 16519C   | 73G 398C 514d<br>515d 14212C<br>16189C |
| AMBAS | C162 | H  | 263G 750G 1438G 4491A 4769G 8860G<br>15326G 16519C  |  |

|       |      |    |  |                                |
|-------|------|----|--|--------------------------------|
| AMBAS | C167 | T2 | 73G 150T 263G 709A 750G 1888A 2308G<br>2706G 3107C 4216C 4769G 4917G 7028T<br>8860G 10463C 11251G 11719A 11812G<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15499T 15607G 15928A 16114T<br>16126C 16153A 16192T 16294T 16519C                              | 1345A 4157T<br>6451C           |
| AMBAS | C170 | J1 | 73G 146C 242T 295T 340T 462T 489C 1438G<br>2158C 2706G 3010A 4216C 5460A 7028T<br>8269A 8557A 8860G 10398G 11719A 15326G<br>15452A 16069T 16126C 16145A 16172C<br>16222T 16261T  | 263G 750G 4769G<br>8170G 8251A |
| AMBAS | C183 | V2 | 72C 263G 3106d 750G 1438G 4580A 4769G<br>5927T 7028T 8860G 12813T 14770T 15326G<br>15904T 16298C   | 7997A 12418d<br>13393T 16362C  |
| AMBAS | C184 | H5 | 263G 456T 750G 1438G 2386T 3107C 4336C<br>4769G 8803T 8860G 15326G 15833T 16259A<br>16304C   |                                |
| AMBAS | C185 | V1 | 72C 263G 750G 1438G 2706G 4580A 4639C<br>4769G 7028T 8860G 8869G 15326G 15904T<br>16274A 16298C 16311C 16519C  | 8939C 11642A                   |
| AMBAS | C19  | U5 | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3197C<br>3498T 4769G 4772C 5656G 6674C 7028T<br>7768G 8860G 9477A 11467G 11719A 12308G<br>12372A 13617C 13713A 14182C 14766T<br>15326G 15777A 15924G 16167T 16192T<br>16270T 16311C 16318G 16356C                               | 16261T                         |
| AMBAS | C209 | I1 | 73G 199C 203A 204C 250C 263G 750G 1438G<br>1719A 2706G 3447G 3990T 3992T 4529T<br>4769G 6734A 7028T 8251A 8616T 8860G<br>9947A 9966A! 10034C 10398G 11233C<br>11719A 12501A 12705T 13780G 14766T<br>15043A 15326G 15924G 16129A 16172C<br>16223T 16391A 16519C | 10238C 10915C<br>16311C        |
| AMBAS | C211 | H  | 263G 512G 750G 1438G 4769G 6392C 8860G<br>13135A 15326G 16311C   |                                |
| AMBAS | C212 | U5 | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>3197C 4769G 5656G 7028T 7385G 7768G<br>8860G 9477A 10927C 11467G 11719A 12308G<br>12372A 12618A 13617C 14182C 14766T<br>15326G 16189C 16256T 16270T  | 4157T                          |

|       |      |    |   |
|-------|------|----|---|
| AMBAS | C216 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 6647G<br>8860G 15326G 16519C  |
| AMBAS | C218 | H5 | 263G 456T 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>14484C 15326G 16304C 4157T  |
| AMBAS | C224 | H4 | 152C 182T 195C 263G 750G 1438G 3107C<br>3203G 3992T 4024G 4769G 5004C 8860G<br>9123A 14365T 14582G 15326G   |
| AMBAS | C227 | T2 | 73G 150T 263G 709A 750G 1438G 1888A<br>2706G 4216C 4769G 4917G 7028T 8697A<br>8860G 10463C 11251G 11719A 11812G<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16153A<br>16294T 16519C              |
| AMBAS | C237 | H1 | 263G 477C 709A 750G 1438G 3010A 3107C<br>4769G 8860G 9380A 15326G 16519C  |
| AMBAS | C267 | H3 | 263G 750G 1438G 2581G 3107C 4769G 5911T<br>6776C 8860G 14002G 15326G 16129A 16519C  |
| AMBAS | C271 | J1 | 73G 185A 228A 263G 295T 462T 489C 750G<br>1393A 1438G 2706G 3010A 3107C 3394C<br>3594T 4216C 4769G 7028T 8860G 10398G<br>11251G 11719A 12612G 13708A 13934T<br>14766T 14798C 15326G 15452A 15530C<br>16069T 16126C 16189C |
| AMBAS | C28  | H2 | 263G 750G 951A 8860G 14440G 15326G<br>16519C 15C2 182T 408A<br>870T 16256T  |
| AMBAS | C280 | H4 | 252C 263G 750G 1438G 4769G 8860G 9758C<br>15326G 16519C   |
| AMBAS | C29  | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>9986A 14129T 14224G 15326G 16519C  |
| AMBAS | C297 | H1 | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>8860G 15326G 16207G 16519C  |



|       |      |     |   |             |
|-------|------|-----|---|-------------|
| AMBAS | C306 | H2  | 195C 263G 1438G 2626C 3107C 4769G 5775C<br>8860G 12795A 15326G 16519C   | 16193T      |
| AMBAS | C31  | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5206T 8860G<br>9581C 15326G 15766G 16189C 16290T<br>16519C  | 3106d       |
| AMBAS | C316 | V   | 72C 189G 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>4580A 4769G 7028T 8860G 10933T 15326G<br>15904T 16298C  | 1202A       |
| AMBAS | C320 | H3  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C 8860G<br>15326G 16256T 16519C   |             |
| AMBAS | C336 | HV0 | 263G 750G 1438G 1700C 2706G 3107C 3197C<br>4224T 4769G 5495C 7028T 8860G 15289C<br>15326G 16153A 16298C   | 195C 14992C |
| AMBAS | C340 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>10463C 15204C 15326G 16390A 16519C   | 12693G      |
| AMBAS | C341 | M1  | 73G 152C 195C 263G 489C 513A 750G 813G<br>1438G 2706G 3107C 4769G 6040G 6446A<br>6671C 6680C 7028T 8701G 8860G 9540C<br>10398G 10400T 10873C 11719A 12403T<br>12705T 12950C 14110C 14127G 14766T<br>14783C 15043A 15172A 15301A 15326G<br>15884C 16129A 16189C 16223T 16249C<br>16311C 16519C | 1336C       |
| AMBAS | C342 | U5  | 73G 150T 263G 516T 750G 1438G 2706G<br>3197C 4769G 5656G 6341T 7028T 7768G<br>8860G 9477A 11719A 12308G 12372A 13194A<br>13617C 14182C 14766T 15191C 15326G<br>16174T 16189C 16270T 16311C  |             |
| AMBAS | C346 | K1  | 73G 263G 497T 750G 1189C 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3277A 3480G 4769G 5063C<br>6260A 7028T 8860G 9055A 9698C 10398G<br>10550G 11299C 11467G 11485C 11563T<br>11719A 11840T 12308G 12372A 13740C<br>14167T 14766T 14798C 15326G 16224C<br>16311C 16519C  |             |
| AMBAS | C39  | H3  | 152C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C<br>8860G 15326G 16519C   |             |

|       |     |     |   |                        |
|-------|-----|-----|---|------------------------|
| AMBAS | C49 | T1  | 73G 263G 709A 750G1888A 2706G 4216C<br>4917G 7028T 8697A 8701G 8860G 10463C<br>11251G 11719A 12633A 12654G 13368A<br>14766T 14905A 15326G 15452A 15607G<br>15928A 16126C 16163G 16189C 16294T<br>16519C   | 1438G 3834A<br>4769G   |
| AMBAS | C50 | H20 | 263G 750G 1438G 4769G 7334C 8860G<br>15326G 16218T 10248C 16114T 16217C<br>16519C   |                        |
| AMBAS | C61 | H51 | 204C 263G 750G 1438G 4769G 8251A 8860G<br>9531G 10166C 11440A 15326G 16189C<br>16519C   |                        |
| AMBAS | C62 | H1  | 146C 263G 750G 1438G 3010A 4769G 7870C<br>8860G 15326G 16519C   | 10454C 12418A          |
| AMBAS | C75 | U2  | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 678C 750G<br>1438G 1811G 2706G 3116T 3720G 3866C<br>4769G 5390G 5426C 6045T 6152C 7028T<br>8860G 10876G 11197T 11467G 11719A<br>11732C 11969A 12308G 12372A 13020C<br>13734C 14766T 15326G 15907G 16051G<br>16129A 16182C 16183C 16189C 16362C<br>16519C |                        |
| AMBAS | C78 | H1  | 150T 263G 711C 750G 1438G 3010A 3107C<br>4769G 5460A 8512G 8860G 14902T 15326G  | 4688C 16213A           |
| AMBAS | C80 | H1  | 93G 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G<br>5301G 5387T 5460A 8022C 8512G 8860G<br>14491T 14902T 15326G 16519C   | 7208G 16093C           |
| AMBAS | C81 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 8860G 9007G<br>9986A 14129T 14224G 15326G 16519C  | 12938C 16129A          |
| AMBAS | C82 | H5  | 93G 263G 456T 513A 750G 1438G 4769G<br>8860G 9123A 10915C 15326G 15884C 16304C<br>16519C  | 8021G 8943T            |
| AMBAS | C83 | H3  | 151T 152C 263G 750G 1438G 4769G 6776C<br>7965A 8860G 9456G 15326G 16519C  | 9525A 15033C<br>15854C |

|       |       |    |   |  |
|-------|-------|----|---|--|
| AMBAS | C87   | U5 | 73G 150T 263G 750G 1438G 1721T 2706G<br>3106d 3197C 4491A 4639C 4732G 4769G<br>6329T 7028T 7768G 8860G 9477A 11467G<br>11719A 12308G 12372A 12957C 13617C<br>13637G 13677T 14182C 14305A 14766T<br>15326G 16114A 16192T 16270T 16519C   | 1332G 1550G<br>1643C 6366A<br>6932G 6954A<br>11350V 12418d<br>13358C |
| AMBAS | C89   | H1 | 263G 267C 485C 750G 1438G 1555G 3010A<br>4769G 6446A 8860G 11002G 15326G 15844G<br>16519C   |  |
| AMBAS | C93   | H1 | 152C 263G 750G 1438G 3010A 3768G 4769G<br>8860G 15313C 15326G 16239T 16519C   |  |
| AMBAS | C98   | H5 | 114A 263G 456T 750G 1438G 3316A 4336C<br>4769G 6818T 8860G 9686C 15326G 15833T<br>16218T 16519C   | 514d 515d 16291T<br>16304C   |
| AMBAS | C99   | H1 | 263G 477C 750G 1438G 3010A 4769G 8860G<br>15326G 16519C   | 709A   |
| AMBAS | CL103 | I4 | 73G 152C 199C 204C 250C 263G 750G 1438G<br>1719A 2706G 3107C 4529T 4769G 7028T<br>8251A 8519A 8860G 10034C 10238C 10398G<br>10819G 11719A 12501A 12705T 13780G<br>14766T 15043A 15326G 15924G 16129A<br>16223T 16304C 16391A 16519C   |  |
| AMBAS | CL104 | T2 | 73G 263G 709A 750G 1438G 1888A 2706G<br>3107C 4216C 4243G 4769G 4917G 5471A<br>6445T 7028T 8074G 8697A 8860G 9797C<br>10463C 11251G 11719A 11812G 12408C<br>12777G 13260C 13368A 13527G 14233G<br>14323A 14605G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16294T<br>16296T 16519C |  |
| AMBAS | CL105 | J1 | 73G 185A 188G 263G 295T 462T 482C 489C<br>750G 1438G 2706G 3010A 3394C 4216C<br>4769G 7028T 7184G 8860G 9180G 10398G<br>11251G 11719A 12612G 13708A 14766T<br>14798C 15326G 15452A 16069T 16126C  |  |
| AMBAS | CL107 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 3107C 4216C 4769G 7028T<br>8860G 9836C 10398G 11719A 12612G 13708A<br>13934T 14766T 14798C 15326G 15452A<br>16069T 16126C  | 9055A  |

|       |       |     |   |   |
|-------|-------|-----|---|---|
| AMBAS | CL113 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 5665G<br>8860G 9239G 15326G 16519C  |   |
| AMBAS | CL117 | H4  | 263G 750G 1438G 3992T 4024G 4769G 5004C<br>8269A 8860G 9123A 14365T 14582G 15326G   | 7805A 7961C                                       |
| AMBAS | CL118 | U2  | 73G 152C 263G 508G 750G 1438G 1811G<br>2706G 3107C 3720G 3736A 3849A 4553C<br>4736C 4769G 5390G 5426C 6045T 6152C<br>7028T 8473C 8860G 10876G 11467G 11719A<br>12308G 12372A 12557T 13020C 13734C<br>14766T 15274G 15326G 15891T 15907G<br>16051G 16129A 16183C 16189C 16362C<br>16519C | 1389A 4772C                                       |
| AMBAS | CL119 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3396C 4769G<br>4859C 8860G 12888T 15326G 15941C 16129A<br>16519C  | 6490C 8966C                                       |
| AMBAS | CL128 | U5  | 73G 263G 750G 1438G 1700C 2706G 3197C<br>4769G 5495C 6713T 7028T 8860G 9477A<br>11467G 11719A 12308G 12372A 13617C<br>14766T 14793G 15218G 15326G 15924G<br>16256T 16270T 16399G  |   |
| AMBAS | CL129 | U4  | 73G 247A 263G 499A 750G 1438G 1811G<br>2706G 2792G 4646C 4769G 5999C 6047G<br>6665T 6929G 7028T 7674C 8065A 8818T<br>8860G 11332T 11467G 11719A 12308G<br>12372A 14620T 14766T 15326G 15693C<br>16265G 16356C 16362C 16519C   | 10908G  |
| AMBAS | CL13  | U4  | 73G 195C 263G 499A 750G 1438G 1811G<br>4769G 4811G 5999C 6047G 6146G 7028T<br>8860G 9070G 9214G 10907C 11009C 11332T<br>11467G 11719A 12308G 12372A<br>14620T 15326G 15693C 16179T 16260T<br>16356C 16519C  | 709A 827G 4646C<br>13662T 14766T<br>14866T 16311C |
| AMBAS | CL130 | R0a | 64T 152C 263G 451G 750G 1438G 2442C<br>2706G 3275A 3847C 4769G 7028T 8860G<br>9620T 11969A 13188T 14668T 14766T<br>14905A 15326G 16126C 16362C  | 3196A   |
| AMBAS | CL135 | T2  | 73G 151T 263G 709A 750G 8697A 8860G<br>10463C 10750G 11251G 11719A 11812G<br>11969A 13368A 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16294T 16296T 16304C 16519C  |   |

|       |       |     |   |                     |
|-------|-------|-----|---|---------------------|
| AMBAS | CL137 | H82 | 195C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16220C 16519C  | 16124C              |
| AMBAS | CL141 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 3290C 4025T<br>4769G 8860G 15326G 16189C 16356C 16519C  |                     |
| AMBAS | CL144 | X2  | 73G 93G 146C 195C 225A 226C 263G 750G<br>1438G 1719A 2706G 3107C 3396C 4769G<br>6221C 6371T 7028T 8393T 8860G 11719A<br>12166C 12477C 12705T 13708A 13966G<br>14470C 14766T 15217A 15326G 15927A<br>16189C 16223T 16278T 16519C                       | 153G                |
| AMBAS | CL148 | HV  | 263G 750G 1438G 2652A 2706G 3107C 4769G<br>7028T 8860G 9986A 15326G 16145A 16519C   |                     |
| AMBAS | CL150 | U2  | 73G 152C 199C 471C 709A 750G 1438G 1700C<br>1811G 2706G 4025T 4164G 4769G 6503G<br>7028T 8860G 8938G 10343T 11467G 11719A<br>11812G 11893G 12127A 12308G 12372A<br>14766T 14926G 15326G 16051G 16183C<br>16189C 16234T 16266T 16294T 16519C<br>16525G |                     |
| AMBAS | CL155 | T2  | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>4769G 5773A 6446A 6671C 6680C 7028T<br>8860G 10463C 11251G 11719A 11812G<br>13368A 13860T 14233G 14766T 14905A<br>15326G 15452A 15607G 15928A 16126C<br>16218T 16266T 16294T 16304C 16519C                    | 813G 8697A<br>8701G |
| AMBAS | CL157 | H5  | 93G 263G 456T 513A 750G 1438G 3107C<br>4336C 4769G 8860G 9123A 10915C 15110A<br>15326G 15884C 16304C 16519C   |                     |
| AMBAS | CL160 | L3  | 73G 150T 263G 398C 1438G 2706G 3107C<br>4769G 5460A 7028T 8392A 8519A 8701G<br>8860G 9540C 10398G 10819G 11719A 12705T<br>13317A 14212C 14766T 15301A 15326G<br>16041G 16189C 16223T 16519C   |                     |
| AMBAS | CL162 | H5  | 93G 263G 456T 513A 750G 1438G 3107C<br>4336C 4769G 8860G 9123A 10915C 15326G<br>15884C 16304C 16519C  |                     |

|       |       |    |  |                            |
|-------|-------|----|--|----------------------------|
| AMBAS | CL167 | J1 | 73G 199C 263G 295T 462T 489C 574T 750G<br>1438G 2706G 3010A 3107C 4216C 4769G<br>7028T 8269A 8860G 10101C 10398G 10589A<br>11251G 11719A 12612G 13105G 13626T<br>13708A 14569A 14766T 15326G 15452A<br>15712G 16069T 16126C 16145A 16209C<br>16222T 16256T 16261T 16278T |                            |
| AMBAS | CL170 | V  | 72C 150T 263G 750G 1438G 2706G 4233C<br>4580A 4769G 7028T 8860G 15326G 15904T<br>16298C  |                            |
| AMBAS | CL183 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 3107C 4216C 4769G 5024T<br>7028T 8860G 10398G 11251G 11719A<br>12612G 13708A 14766T 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C   | 2053C                      |
| AMBAS | CL184 | J1 | 73G 228A 263G 295T 462T 489C 750G 1438G<br>2706G 3010A 4216C 4769G 5024T 7028T<br>8860G 10398G 11251G 11719A 12612G<br>13708A 14766T 14798C 15326G 15452A<br>16069T 16126C   | 8108G 10646C<br>16148T     |
| AMBAS | CL185 | H5 | 263G 456T 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>9629G 12127A 15326G 16304C   |                            |
| AMBAS | CL19  | U5 | 73G 150T 263G 750G 896G 1438G 1721T<br>2706G 3107C 3197C 4732G 4769G 7028T<br>7768G 8860G 9477A 11467G 11719A 12308G<br>12372A 12972G 13617C 13637G 14182C<br>14766T 15326G 15511C 16192T 16311C   |                            |
| AMBAS | CL209 | H1 | 263G 750G 1438G 3010A 3107C 4769G 8860G<br>9356T 15326G 16519C   | 7117C                      |
| AMBAS | CL211 | T2 | 73G 150T 263G 709A 750G 1438G 1473T<br>1888A 4048A 4216C 4769G 4917G 7028T<br>8697A 8860G 10253C 11251G 11719A 11812G<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 16126C 16153A 16294T<br>16519C  | 64T 1130G 10463C<br>15928A |
| AMBAS | CL212 | U4 | 73G 195C 247A 263G 499A 750G 1438G<br>1811G 2706G 2792G 3107C 4646C 4769G<br>5999C 6047G 6665T 6929G 7028T 8065A<br>8227C 8818T 8860G 10688A 11332T 11467G<br>11719A 12308G 12372A 12924G 14620T<br>14766T 15326G 15693C 16129A 16265G<br>16295T 16356C 16362C 16519C    |                            |

|       |       |    |  |        |
|-------|-------|----|--|--------|
| AMBAS | CL216 | H  | 93G 263G 750G 1438G 1884A 3107C 4769G<br>8860G 10410C 15326G 16189C 16311C<br>16519C   |        |
| AMBAS | CL218 | U5 | 73G 263G 750G 1438G 2706G 3107C 3197C<br>4769G 5108C 7028T 8860G 9469T 9477A<br>10619T 11467G 11719A 12308G 12372A<br>13617C 14766T 14793G 15326G 16192T<br>16256T 16270T 16526A   |        |
| AMBAS | CL224 | M1 | 73G 195C 263G 489C 750G 813G 1438G<br>2706G 3107C 4769G 6446A 6671C 6680C<br>7028T 8701G 8860G 9540C 10398G 10400T<br>10873C 11719A 12403T 12414C 12492G<br>12705T 12950C 13637G 14110C 14766T<br>14783C 15043A 15301A 15326G 16129A<br>16182C 16183C 16189C 16249C 16311C<br>16519C | 198T   |
| AMBAS | CL227 | U2 | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3116T 3720G 4769G 5390G<br>5426C 6045T 6152C 7028T 7080C 8860G<br>10876G 11197T 11467G 11719A 11732C<br>12308G 12372A 13020C 13734C 13958C<br>14766T 15326G 15907G 16129A 16183C<br>16189C 16362C                             | 11461G |
| AMBAS | CL237 | V  | 236C 263G 750G 1438G 1617T 2706G 3107C<br>3438A 4580A 4769G 7028T 7844G 8860G<br>9806T 14629T 15326G 15904T 16189C<br>16298C   | 16183C |
| AMBAS | CL267 | N1 | 73G 215G 263G 750G 1438G 1598A 1703T<br>1719A 2222C 2639T 2706G 2775G 3921A<br>4769G 4960T 5471A 5913A 7028T 8472T<br>8836G 8860G 9180G 9335T 10238C 11362G<br>11719A 12397G 12501A 12705T 12822G<br>14766T 15326G 15924G 16145A 16176T<br>16223T 16390A 16519C                      |        |
| AMBAS | CL271 | T2 | 73G 146C 151T 263G 709A 750G 1438G<br>1888A 2706G 3107C 4216C 4769G 4917G<br>5147A 7028T 8697A 8860G 10463C 10750G<br>11251G 11593G 11719A 11812G 12375C<br>13368A 14233G 14766T 14905A 15326G<br>15452A 15607G 15928A 16126C 16294T<br>16304C 16519C                                | 3184T  |
| AMBAS | CL28  | H1 | 93G 146C 263G 750G 1438G 3010A 4769G<br>8860G 11809C 11914A 15326G 16278T<br>16519C  | 12418d |

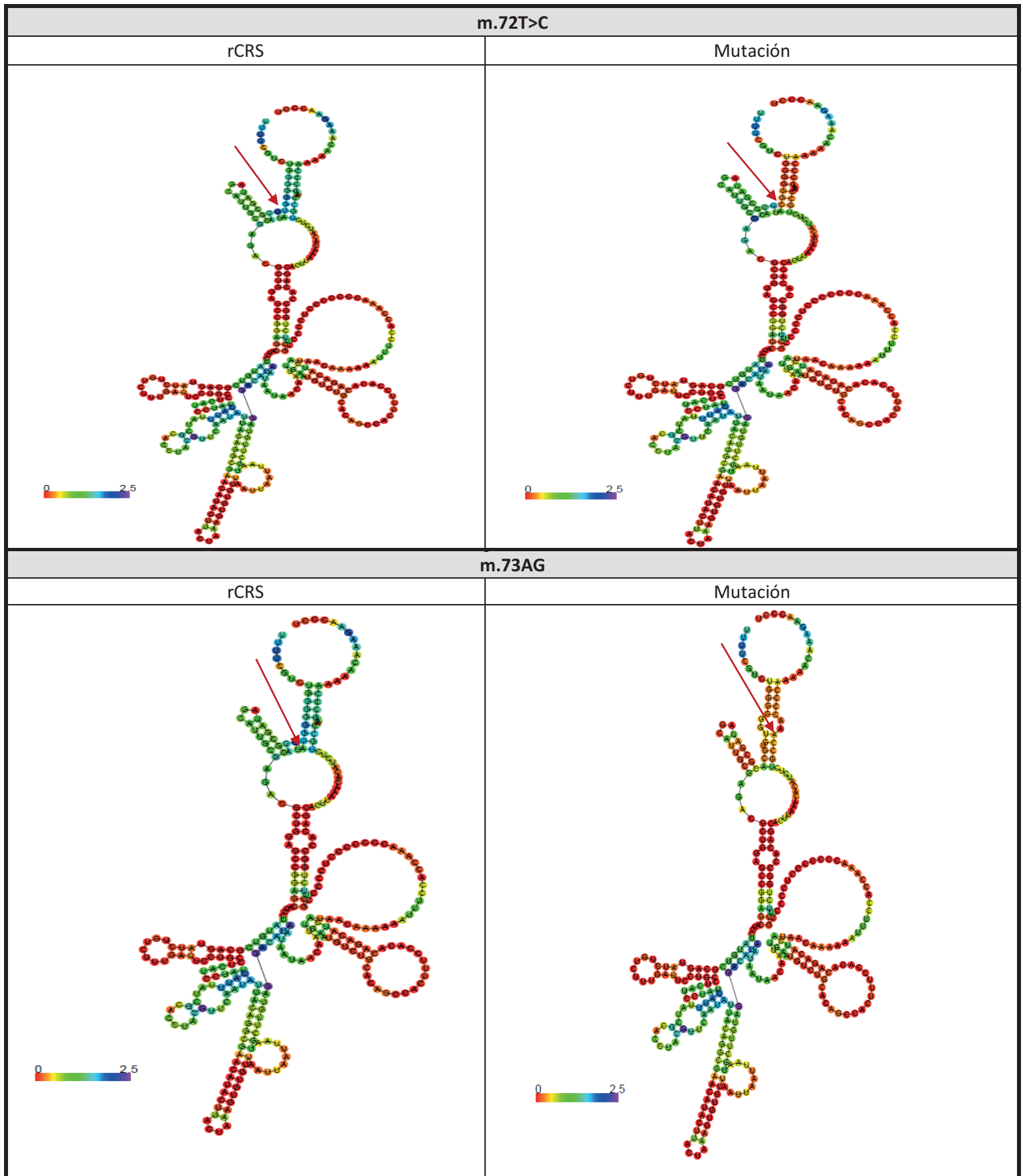
|       |       |     |   |               |
|-------|-------|-----|---|---------------|
| AMBAS | CL280 | H3  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G   | 152C          |
| AMBAS | CL29  | H10 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>11776C 14470C 15326G 16519C  | 7110C         |
| AMBAS | CL297 | H3  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 6776C 8860G<br>15326G   | 2593A         |
| AMBAS | CL306 | H44 | 195C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 5442C<br>8860G 13663T 15326G 16519C  | 15501G 16093C |
| AMBAS | CL31  | I2  | 73G 152C 199C 204C 207A 250C 263G 750G<br>1438G 1719A 2706G 3107C 4529T 4769G<br>7028T 8251A 8860G 9266A 10034C 10238C<br>10398G 11065 11719A 12501A 12705T<br>13780G 14766T 15043A 15326G 15758G<br>15924G 16129A 16145A 16223T 16391A<br>16519C |               |
| AMBAS | CL316 | U6  | 73G 263G 750G 794A 1193C 1438G 1692G<br>2706G 3107C 3348G 4769G 5120G 5471A<br>7028T 7805A 8473C 8860G 11038G 11467G<br>11719A 12308G 12372A 14179G 14766T<br>15043A 15326G 15530C 15632T 16172C<br>16219G 16278T                                 |               |
| AMBAS | CL320 | U6  | 73G 150T 194T 263G 437T 750G 793T 1438G<br>2706G 3348G 3688C 4769G 4965G 5081C<br>6340T 7028T 8860G 11013T 11467G 11719A<br>12076G 12308G 12372A 13879C 14766T<br>15244G 15326G 16169T 16172C 16189C  |               |
| AMBAS | CL336 | H1  | 263G 750G 1438G 3010A 4769G 5189G 8860G<br>14605G 15326G 16519C   | 1736G 16295T  |
| AMBAS | CL340 | H6  | 150T 239C 263G 750G 1438G 3107C 3915A<br>4727G 4769G 7805A 8860G 9380A 11253C<br>14305A 15326G 16362C   |               |
| AMBAS | CL341 | T2  | 73G 263G 750G 1438G 1537T 2706G 4580A<br>4769G 7028T 9055A 9698C 9803T 10398G<br>10550G 11299C 11467G 11485C 11719A<br>11840T 12308G 12372A 13740C 14167T<br>14766T 14798C 15326G 15721C 16224C<br>16311C 16519C                                  | 8860G         |

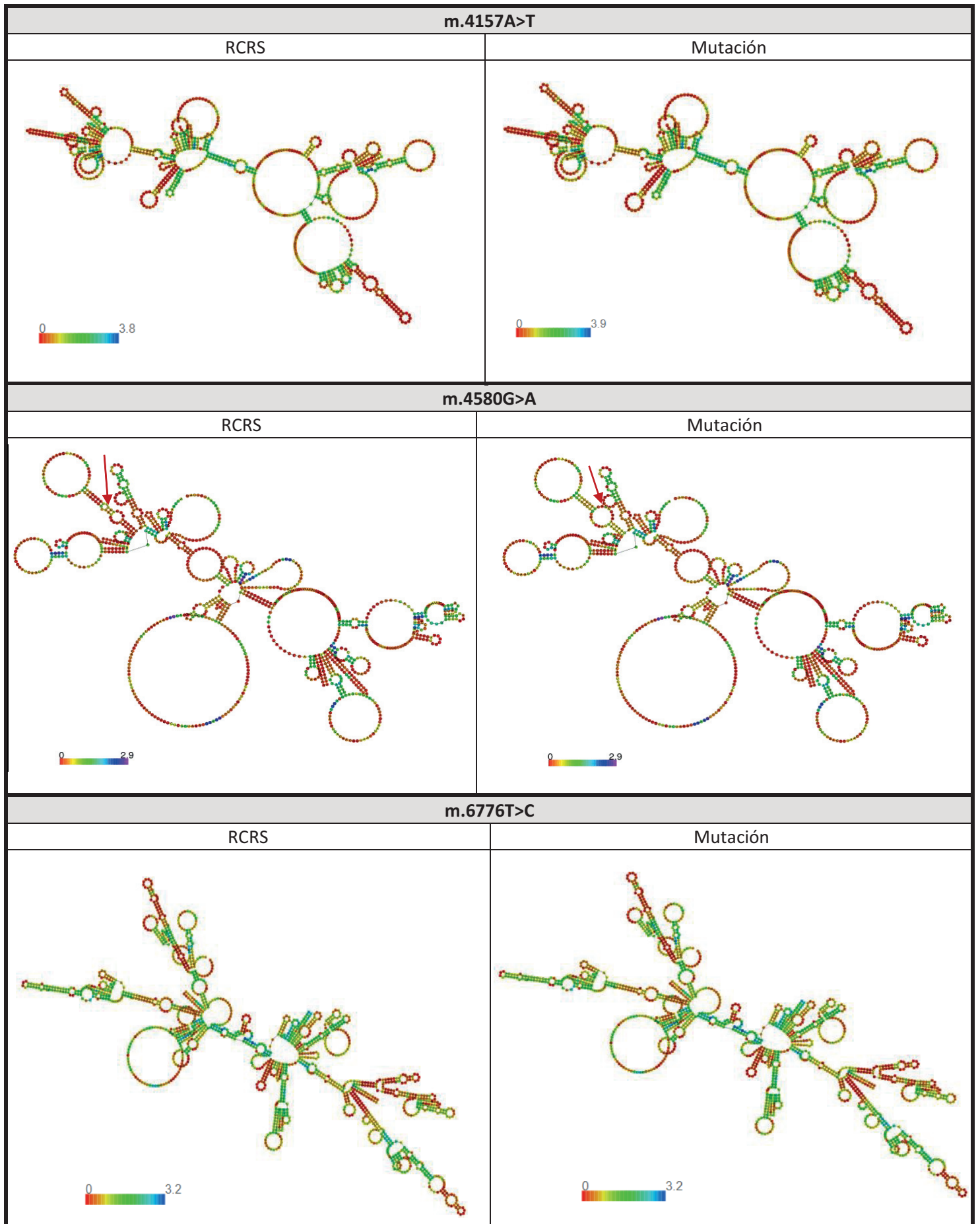


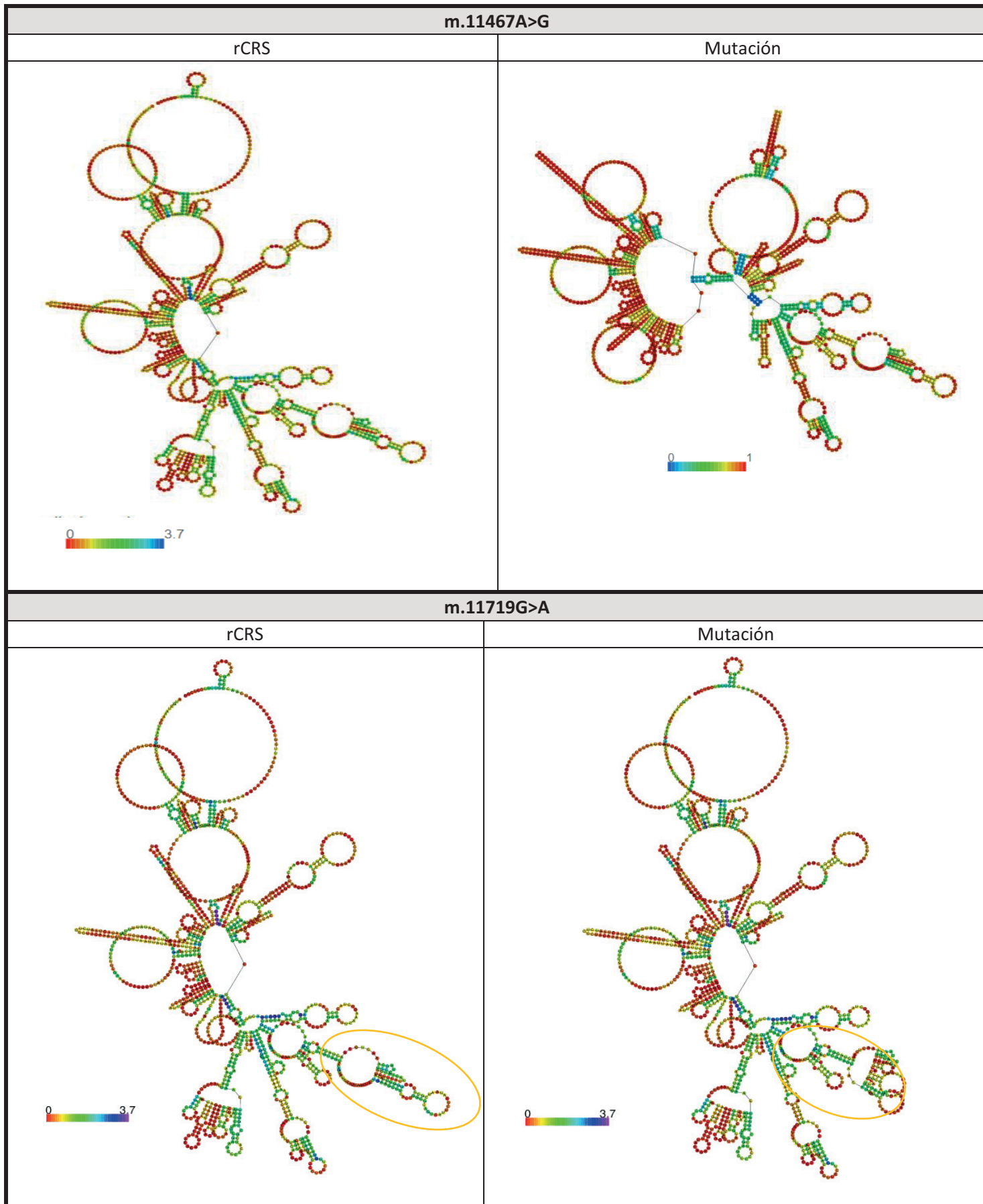
|       |       |     |   |  |
|-------|-------|-----|---|--|
| AMBAS | CL342 | H1  | 146C 263G 3106d 750G 1438G 4769G 8860G<br>9356T 15326G 16278T 16519C  | 3010A 12418d   |
| AMBAS | CL346 | H24 | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8860G<br>15326G 16293G 16519C   | 6446A 6680C<br>6842C 7028T                               |
| AMBAS | CL39  | HV0 | 72C 195C 263G 750G 1438G 2706G 3107C<br>4769G 7028T 8860G 14935C 15326G 16298C  | 152C   |
| AMBAS | CL49  | J1  | 73G 185A 188G 228A 295T 462T 489C 1438G<br>2706G 3010A 4216C 4769G 6293C 7028T<br>7245G 8839A 8860G 10398G 11251G 11719A<br>11722C 12612G 13708A 14798C 15326G<br>15452A 16069T 16126C 16519C                                   | 263G 750G 3013A<br>9181G 12418d<br>14766T                |
| AMBAS | CL50  | W5  | 73G 189G 195C 207A 263G 709A 750G 1243C<br>1438G 3505G 4363C 4769G 5046A 5460A<br>6425C 6528T 7028T 8251A 8614C 8860G<br>8994A 10097G 11674T 11719A 11947G<br>12414C 12705T 15326G 15775G 15884C<br>16223T 16292T 16362C 16519C | 194T 204C 10145T<br>10410C 14766T                        |
| AMBAS | CL61  | X2  | 64T 73G 153G 195C 225A 226C 263G 750G<br>1438G 1719A 2706G 4659A 4769G 6221C<br>6371T 6908C 7028T 8860G 9452A 11719A<br>12705T 13966G 14470C 14766T 15326G<br>15793T 16183C 16189C 16223T 16266T<br>16278T 16519C               |  |
| AMBAS | CL62  | X2  | 73G 263G 391C 750G 1438G 1719A 2706G<br>3107C 4769G 7028T 8393T 8860G 11719A<br>12705T 14766T 15326G 16189C 16223T<br>16278T 16519C   | 14836G 16355T<br>16362C                                  |
| AMBAS | CL75  | U5  | 73G 150T 263G 750G 1438G 1721T 2706G<br>3197C 4732G 4769G 5918C 7028T 7768G<br>8860G 9477A 11467G 11719A 12308G<br>12372A 13617C 13637G 14182C 14323A<br>14766T 15326G 16189C   | 14298C   |
| AMBAS | CL78  | H2  | 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8033G 8860G<br>15326G 16291T 16519C   |  |
| AMBAS | CL80  | U4  | 73G 152C 195C 263G 499A 750G 1438G<br>1661T 1811G 2706G 4646C 6047G 7028T<br>8818T 8860G 11332T 11467G 11719A 12308G<br>12372A 12937G 14620T 14766T 15326G<br>15693C 16129A 16134T 16172C 16356C<br>16519C                      | 146C 961C 4769G<br>5999C 6261A<br>9428C 11009C<br>16234T |

|       |      |     |   |  |
|-------|------|-----|---|--|
| AMBAS | CL81 | K1  | 73G 497T 750G 1189C 1811G 2706G 3480G<br>4769G 7028T 8860G 9055A 9698C 10398G<br>10550G 11299C 11467G 11470G 11719A<br>11914A 12308G 14167T 15326G 15924G<br>16224C 16311C 16519C   | 263C 1438C<br>12372G 14071C<br>14766A 14798C<br>16093C |
| AMBAS | CL82 | H4  | 146C 326G 750G 3992T 4024G 4961G 8269A<br>8860G 9123A 14365T 14582G 16129A 16261T   | 263G 514d 515d<br>4769G 5004C<br>15326G                |
| AMBAS | CL83 | H51 | 204C 263G 750G 1438G 3107C 4769G 8251A<br>8860G 9531G 11440A 15326G 16183C 16189C<br>16519C   | 7702A  |
| AMBAS | CL87 | U2  | 73G 152C 217C 263G 340T 508G 750G 1438G<br>1811G 2706G 3116T 3720G 4769G 5390G<br>5426C 6045T 6152C 7028T 7080C 8860G<br>10876G 11197T 11467G 11719A 11732C<br>12308G 12372A 13020C 13734C 13958C<br>14766T 15326G 15907G 16051G 16129A<br>16183C 16189C 16362C | 13830C   |
| AMBAS | CL89 | H24 | 263G 750G 1438G 4769G 8860G 15326G<br>16293G  |  |
| AMBAS | CL93 | U5  | 73G 150T 263G 750G 1438G 2706G 3197C<br>4769G 5656G 7028T 7385G 7768G 8860G<br>9477A 10927C 11467G 11719A 12308G<br>12372A 12618A 13617C 14182C 14766T<br>15326G 16183C 16189C 16270T   | 15099C   |
| AMBAS | CL98 | T1  | 73G 152C 195C 263G 709A 750G 1438G<br>1453G 1888A 2706G 3107C 4216C 4769G<br>4917G 7028T 8697A 8860G 9899C 10463C<br>11251G 11719A 12633A 13368A 14766T<br>14905A 15326G 15452A 15607G 15928A<br>16126C 16163G 16294T 16519C                                    |  |
| AMBAS | CL99 | X2  | 73G 195C 225A 226C 263G 750G 813G 1438G<br>1719A 2706G 3107C 4044G 4769G 6221C<br>6371T 7028T 8393T 8860G 9053A 11719A<br>12705T 13708A 13966G 14470C 14766T<br>15326G 15927A 16183C 16189C 16223T<br>16278T 16519C   |  |

**Tabla suplementaria 8.** Representación de la estructura con la menor energía libre para cada una de las variantes realizada utilizando el RNAserver. La estructura esta coloreada en función de la entropía posicional.







**Tabla suplementaria 9.** Valores para el análisis del número de copias de DNA mitocondrial. El ID hace referencia a la pareja caso-control.

| ID  | Enfermedad | $\Delta\text{Ct}$ de Casos | $\Delta\text{Ct}$ de controles | $\Delta\Delta\text{Ct}$ | Fold change |
|-----|------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------|
| 5   | ACV        | -7,81                      | -7,41                          | -0,40                   | 1,32        |
| 6   | ACV        | -7,41                      | -7,74                          | 0,33                    | 0,79        |
| 8   | ACV        | -5,59                      | -6,27                          | 0,68                    | 0,62        |
| 17  | ACV        | -6,00                      | -5,88                          | -0,12                   | 1,09        |
| 21  | ACV        | -6,92                      | -7,73                          | 0,81                    | 0,57        |
| 30  | ACV        | -6,34                      | -6,52                          | 0,18                    | 0,88        |
| 34  | ACV        | -6,56                      | -5,69                          | -0,88                   | 1,83        |
| 42  | ACV        | -5,08                      | -4,36                          | -0,72                   | 1,65        |
| 45  | ACV        | -6,90                      | -6,58                          | -0,32                   | 1,25        |
| 46  | ACV        | -4,82                      | -4,95                          | 0,13                    | 0,91        |
| 48  | ACV        | -5,11                      | -4,98                          | -0,13                   | 1,10        |
| 53  | ACV        | -4,82                      | -4,64                          | -0,18                   | 1,13        |
| 60  | ACV        | -4,84                      | -4,60                          | -0,24                   | 1,18        |
| 63  | ACV        | -5,29                      | -5,21                          | -0,08                   | 1,06        |
| 65  | ACV        | -4,67                      | -5,11                          | 0,44                    | 0,74        |
| 66  | ACV        | -5,18                      | -4,97                          | -0,20                   | 1,15        |
| 71  | ACV        | -4,89                      | -5,28                          | 0,40                    | 0,76        |
| 79  | ACV        | -5,10                      | -4,29                          | -0,82                   | 1,76        |
| 86  | ACV        | -4,84                      | -4,69                          | -0,14                   | 1,10        |
| 91  | ACV        | -4,93                      | -5,41                          | 0,47                    | 0,72        |
| 101 | ACV        | -6,21                      | -5,85                          | -0,36                   | 1,29        |
| 108 | ACV        | -5,01                      | -5,46                          | 0,44                    | 0,74        |
| 109 | ACV        | -5,54                      | -4,98                          | -0,56                   | 1,47        |
| 111 | ACV        | -4,24                      | -3,67                          | -0,58                   | 1,49        |
| 121 | ACV        | -6,17                      | -5,81                          | -0,37                   | 1,29        |
| 122 | ACV        | -5,11                      | -5,65                          | 0,54                    | 0,69        |
| 124 | ACV        | -4,27                      | -3,70                          | -0,57                   | 1,48        |
| 126 | ACV        | -3,99                      | -4,40                          | 0,41                    | 0,75        |
| 131 | ACV        | -6,72                      | -5,27                          | -1,46                   | 2,74        |
| 132 | ACV        | -4,61                      | -3,99                          | -0,62                   | 1,54        |
| 136 | ACV        | -4,02                      | -3,92                          | -0,10                   | 1,07        |
| 139 | ACV        | -6,16                      | -6,69                          | 0,53                    | 0,69        |
| 142 | ACV        | -6,03                      | -6,13                          | 0,11                    | 0,93        |
| 149 | ACV        | -6,07                      | -5,83                          | -0,23                   | 1,17        |
| 151 | ACV        | -4,58                      | -5,37                          | 0,79                    | 0,58        |
| 156 | ACV        | -4,66                      | -4,67                          | 0,01                    | 1,00        |
| 161 | ACV        | -3,04                      | -4,52                          | 1,48                    | 0,36        |
| 163 | ACV        | -5,06                      | -4,44                          | -0,62                   | 1,54        |
| 173 | ACV        | -4,65                      | -6,11                          | 1,46                    | 0,36        |
| 176 | ACV        | -6,58                      | -6,18                          | -0,40                   | 1,32        |
| 186 | ACV        | -5,92                      | -5,66                          | -0,27                   | 1,20        |
| 187 | ACV        | -6,27                      | -6,04                          | -0,23                   | 1,17        |
| 199 | ACV        | -6,57                      | -6,44                          | -0,14                   | 1,10        |
| 202 | ACV        | -6,58                      | -7,07                          | 0,49                    | 0,71        |

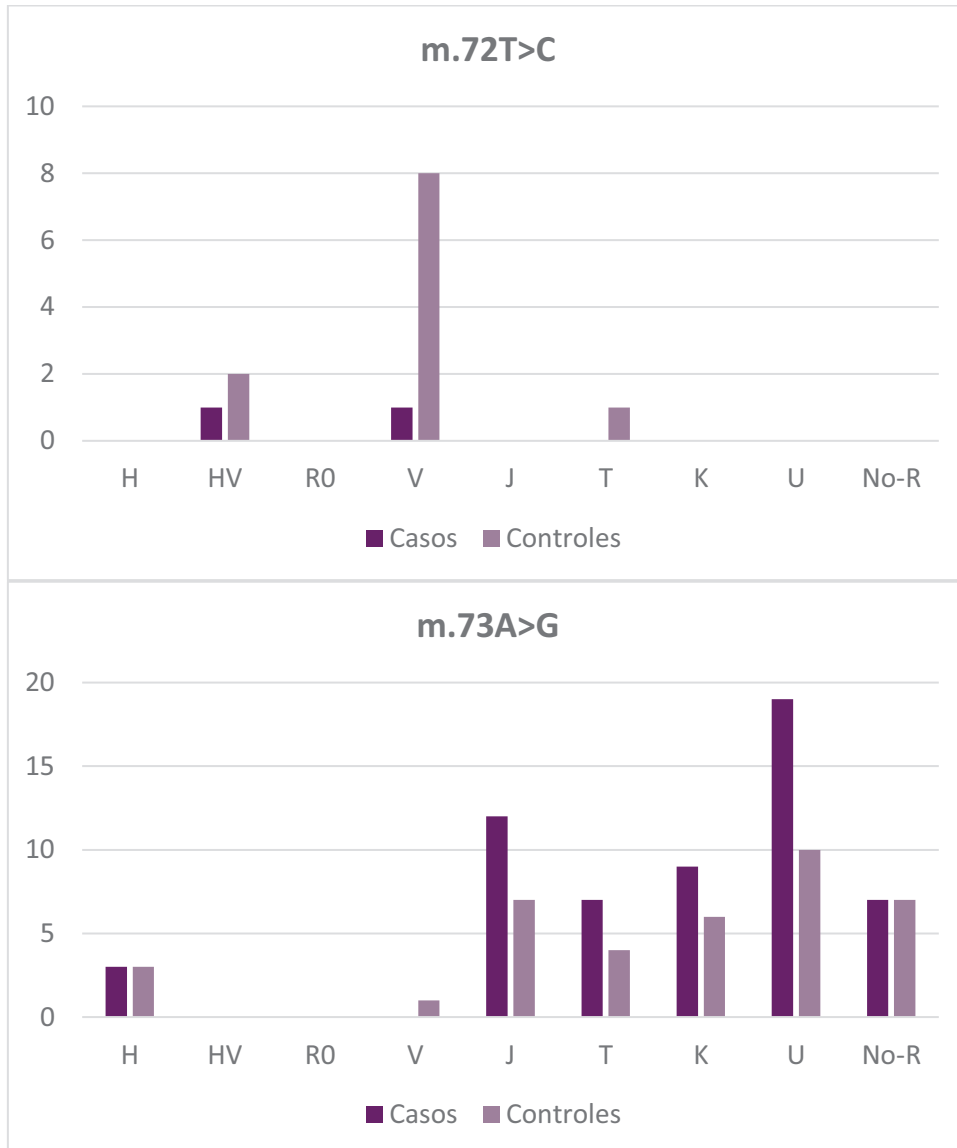
|     |     |       |       |       |       |
|-----|-----|-------|-------|-------|-------|
| 208 | ACV | -6,86 | -6,45 | -0,41 | 1,33  |
| 214 | ACV | -6,48 | -7,41 | 0,93  | 0,52  |
| 217 | ACV | -7,27 | -6,51 | -0,76 | 1,69  |
| 219 | ACV | -6,64 | -6,35 | -0,29 | 1,22  |
| 220 | ACV | -6,70 | -6,70 | 0,00  | 1,00  |
| 221 | ACV | -6,45 | -6,37 | -0,08 | 1,06  |
| 223 | ACV | -7,05 | -6,98 | -0,07 | 1,05  |
| 225 | ACV | -6,55 | -7,13 | 0,58  | 0,67  |
| 229 | ACV | -7,16 | -6,27 | -0,89 | 1,85  |
| 232 | ACV | -6,97 | -6,41 | -0,56 | 1,47  |
| 235 | ACV | -6,85 | -6,47 | -0,38 | 1,30  |
| 236 | ACV | -7,17 | -6,84 | -0,33 | 1,26  |
| 238 | ACV | -7,51 | -7,27 | -0,24 | 1,18  |
| 239 | ACV | -7,23 | -7,58 | 0,35  | 0,78  |
| 243 | ACV | -8,30 | -7,32 | -0,98 | 1,97  |
| 244 | ACV | -7,06 | -7,48 | 0,42  | 0,75  |
| 246 | ACV | -6,85 | -6,84 | -0,01 | 1,01  |
| 281 | ACV | -3,73 | -2,90 | -0,83 | 1,78  |
| 285 | ACV | -7,95 | -8,58 | 0,64  | 0,64  |
| 286 | ACV | -4,96 | -4,37 | -0,59 | 1,50  |
| 293 | ACV | -4,30 | -4,79 | 0,48  | 0,72  |
| 302 | ACV | -8,23 | -6,93 | -1,30 | 2,46  |
| 313 | ACV | -4,25 | -3,38 | -0,87 | 1,83  |
| 319 | ACV | -6,57 | -2,45 | -4,13 | 17,49 |
| 321 | ACV | -4,02 | -3,53 | -0,49 | 1,41  |
| 335 | ACV | -1,91 | -4,75 | 2,84  | 0,14  |
| 339 | ACV | -7,98 | -7,72 | -0,26 | 1,20  |
| 348 | ACV | -6,02 | -8,18 | 2,16  | 0,22  |
| 349 | ACV | -7,77 | -8,01 | 0,24  | 0,85  |
| 3   | MI  | -6,83 | -6,36 | -0,47 | 1,39  |
| 4   | MI  | -6,90 | -5,81 | -1,10 | 2,14  |
| 7   | MI  | -3,59 | -3,08 | -0,52 | 1,43  |
| 9   | MI  | -5,73 | -5,63 | -0,10 | 1,07  |
| 10  | MI  | -5,20 | -6,01 | 0,81  | 0,57  |
| 12  | MI  | -6,03 | -6,40 | 0,37  | 0,77  |
| 16  | MI  | -6,44 | -6,21 | -0,23 | 1,18  |
| 18  | MI  | -5,97 | -6,68 | 0,71  | 0,61  |
| 22  | MI  | -7,80 | -7,11 | -0,69 | 1,61  |
| 23  | MI  | -7,34 | -6,90 | -0,44 | 1,36  |
| 24  | MI  | -6,15 | -6,85 | 0,70  | 0,61  |
| 26  | MI  | -4,68 | -5,38 | 0,70  | 0,62  |
| 32  | MI  | -6,12 | -6,10 | -0,02 | 1,02  |
| 33  | MI  | -5,09 | -5,18 | 0,09  | 0,94  |
| 35  | MI  | -4,70 | -4,98 | 0,28  | 0,82  |
| 36  | MI  | -4,49 | -4,44 | -0,04 | 1,03  |
| 37  | MI  | -3,60 | -4,29 | 0,69  | 0,62  |
| 38  | MI  | -5,79 | -4,28 | -1,51 | 2,85  |
| 40  | MI  | -5,34 | -5,59 | 0,25  | 0,84  |

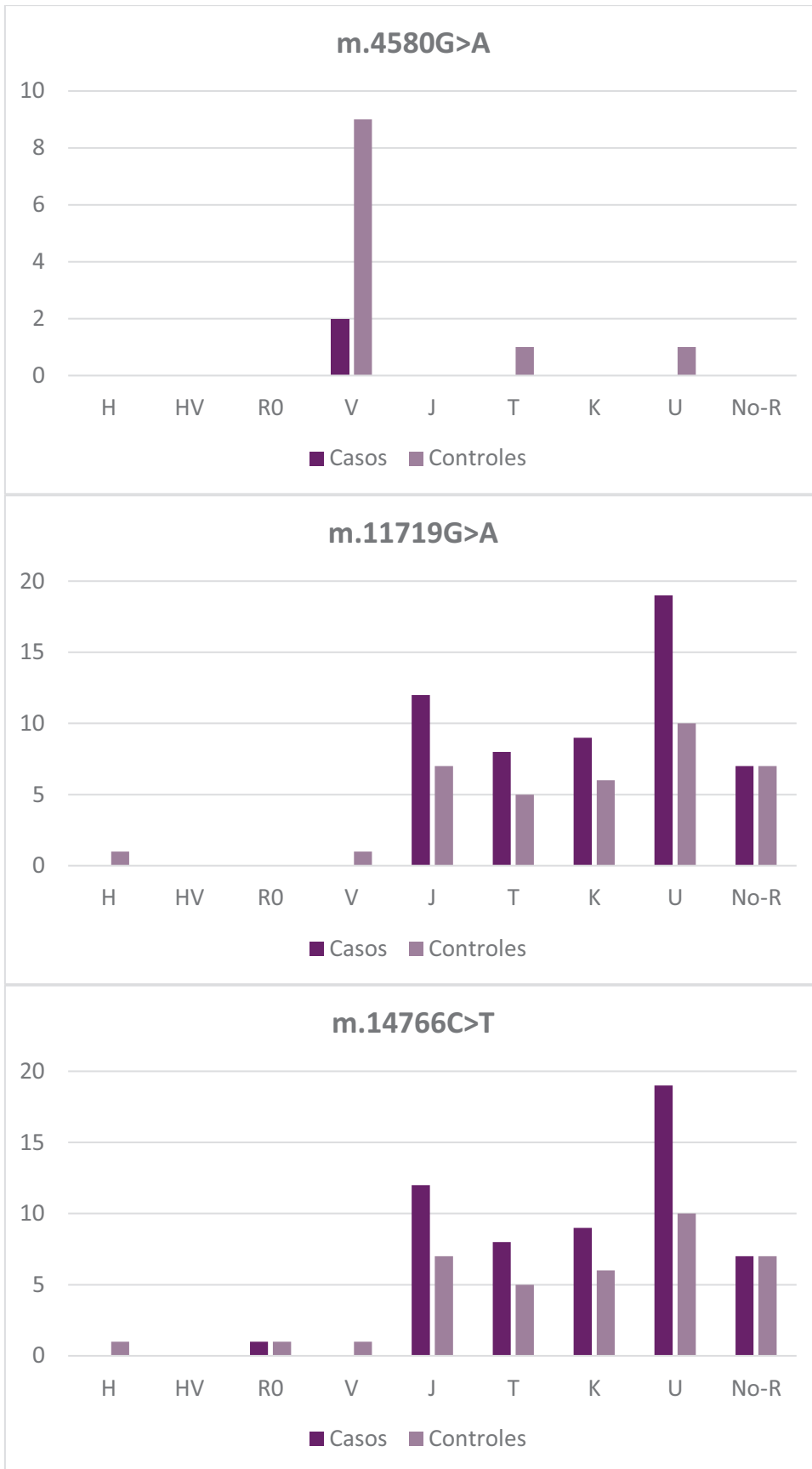
|     |    |       |       |       |      |
|-----|----|-------|-------|-------|------|
| 41  | MI | -8,79 | -8,68 | -0,11 | 1,08 |
| 43  | MI | -7,00 | -6,42 | -0,58 | 1,49 |
| 44  | MI | -8,87 | -8,31 | -0,56 | 1,47 |
| 47  | MI | -8,28 | -8,77 | 0,50  | 0,71 |
| 51  | MI | -5,74 | -6,46 | 0,72  | 0,61 |
| 52  | MI | -5,14 | -6,01 | 0,88  | 0,55 |
| 54  | MI | -5,55 | -5,26 | -0,30 | 1,23 |
| 55  | MI | -6,30 | -6,50 | 0,20  | 0,87 |
| 57  | MI | -8,58 | -9,56 | 0,98  | 0,51 |
| 59  | MI | -8,40 | -8,07 | -0,33 | 1,26 |
| 67  | MI | -6,01 | -4,30 | -1,71 | 3,28 |
| 68  | MI | -8,49 | -8,36 | -0,13 | 1,09 |
| 69  | MI | -5,47 | -5,72 | 0,25  | 0,84 |
| 70  | MI | -5,64 | -4,01 | -1,63 | 3,09 |
| 72  | MI | -5,71 | -5,55 | -0,16 | 1,12 |
| 73  | MI | -5,70 | -5,71 | 0,01  | 0,99 |
| 74  | MI | -4,26 | -5,63 | 1,37  | 0,39 |
| 76  | MI | -5,34 | -5,62 | 0,28  | 0,82 |
| 77  | MI | -5,22 | -5,33 | 0,11  | 0,93 |
| 84  | MI | -6,07 | -6,18 | 0,11  | 0,93 |
| 85  | MI | -7,26 | -6,25 | -1,01 | 2,01 |
| 88  | MI | -7,06 | -7,00 | -0,06 | 1,04 |
| 90  | MI | -7,61 | -6,69 | -0,92 | 1,90 |
| 92  | MI | -6,76 | -6,46 | -0,30 | 1,23 |
| 94  | MI | -6,63 | -6,68 | 0,05  | 0,97 |
| 95  | MI | -6,65 | -5,98 | -0,67 | 1,59 |
| 96  | MI | -6,81 | -6,84 | 0,03  | 0,98 |
| 97  | MI | -6,77 | -5,79 | -0,98 | 1,97 |
| 100 | MI | -9,03 | -9,03 | 0,00  | 1,00 |
| 102 | MI | -7,13 | -7,37 | 0,24  | 0,84 |
| 106 | MI | -8,81 | -8,47 | -0,35 | 1,27 |
| 110 | MI | -7,72 | -6,97 | -0,76 | 1,69 |
| 112 | MI | -7,49 | -7,54 | 0,05  | 0,97 |
| 114 | MI | -8,19 | -8,91 | 0,73  | 0,60 |
| 116 | MI | -6,85 | -8,31 | 1,46  | 0,36 |
| 120 | MI | -6,64 | -7,67 | 1,03  | 0,49 |
| 123 | MI | -6,62 | -6,71 | 0,09  | 0,94 |
| 125 | MI | -7,06 | -7,42 | 0,36  | 0,78 |
| 127 | MI | -6,41 | -6,89 | 0,48  | 0,72 |
| 134 | MI | -8,99 | -8,91 | -0,08 | 1,05 |
| 138 | MI | -7,57 | -5,87 | -1,70 | 3,24 |
| 140 | MI | -7,17 | -6,93 | -0,24 | 1,18 |
| 143 | MI | -8,38 | -8,18 | -0,20 | 1,15 |
| 145 | MI | -6,98 | -7,18 | 0,20  | 0,87 |
| 147 | MI | -9,43 | -9,57 | 0,14  | 0,91 |
| 152 | MI | -6,14 | -6,84 | 0,70  | 0,62 |
| 153 | MI | -6,60 | -6,59 | -0,01 | 1,01 |
| 154 | MI | -4,60 | -6,34 | 1,74  | 0,30 |

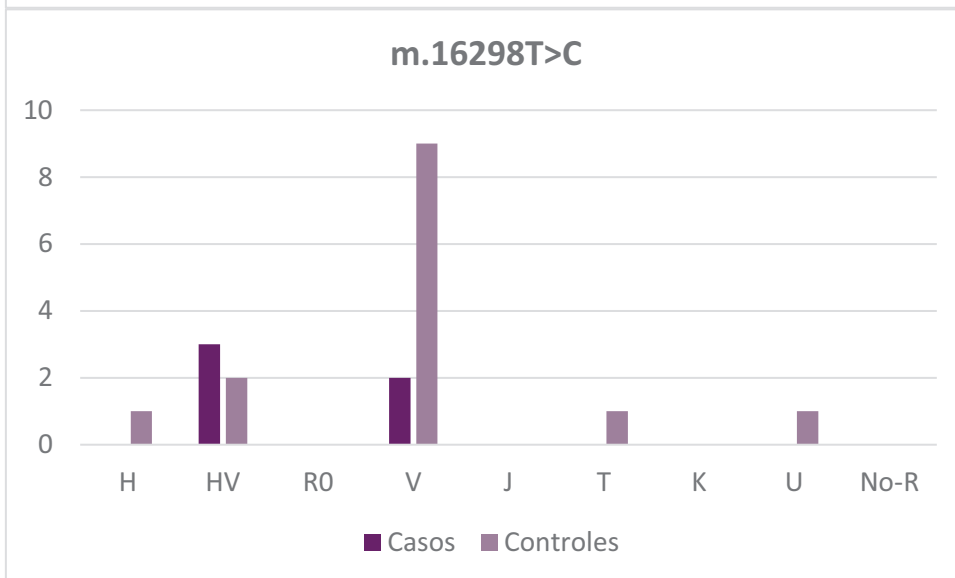
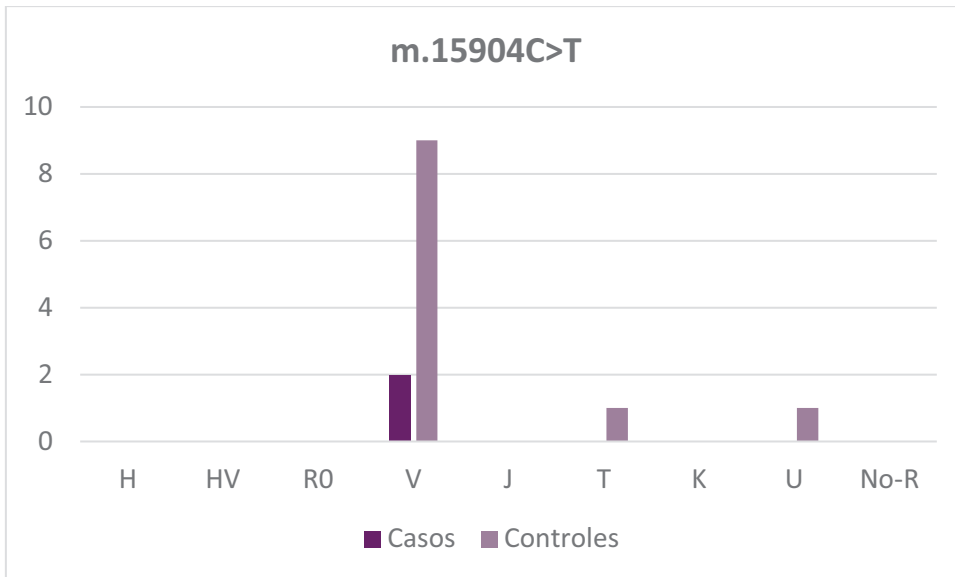


|     |    |       |       |       |      |
|-----|----|-------|-------|-------|------|
| 158 | MI | -6,43 | -6,50 | 0,07  | 0,95 |
| 159 | MI | -6,62 | -6,19 | -0,43 | 1,35 |
| 164 | MI | -6,03 | -6,44 | 0,41  | 0,75 |
| 165 | MI | -5,64 | -5,32 | -0,32 | 1,25 |
| 166 | MI | -6,22 | -6,13 | -0,09 | 1,06 |

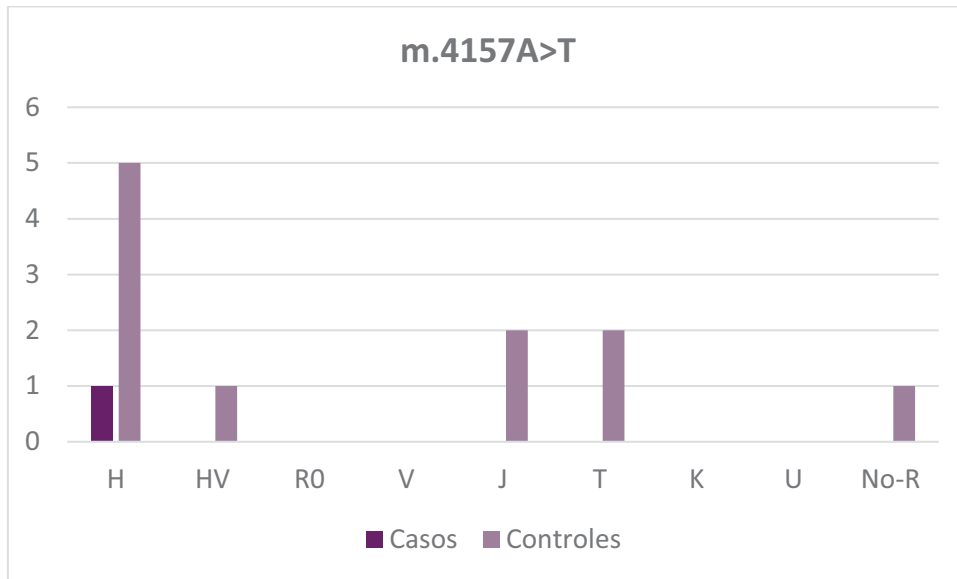
**Figura suplementaria 1.** Distribución de las mutaciones fijadas que muestran una frecuencia estadísticamente distinta entre casos de ACV y sus controles, en función de los diferentes haplogrupos mitocondriales.



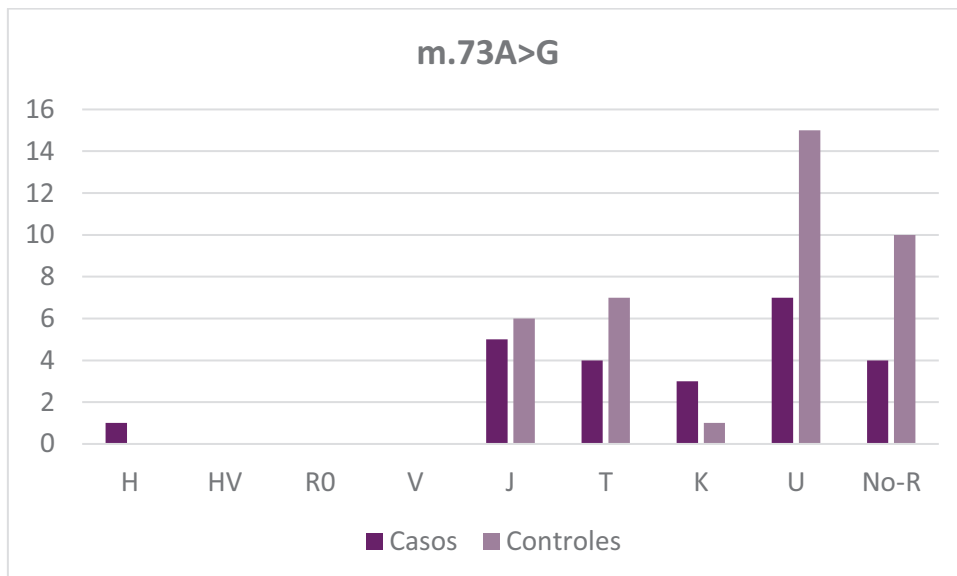


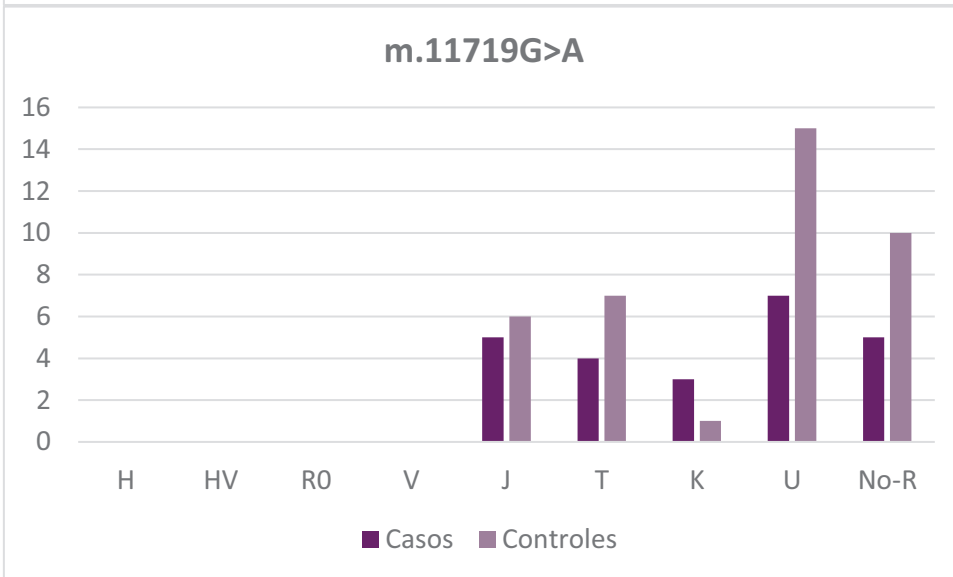
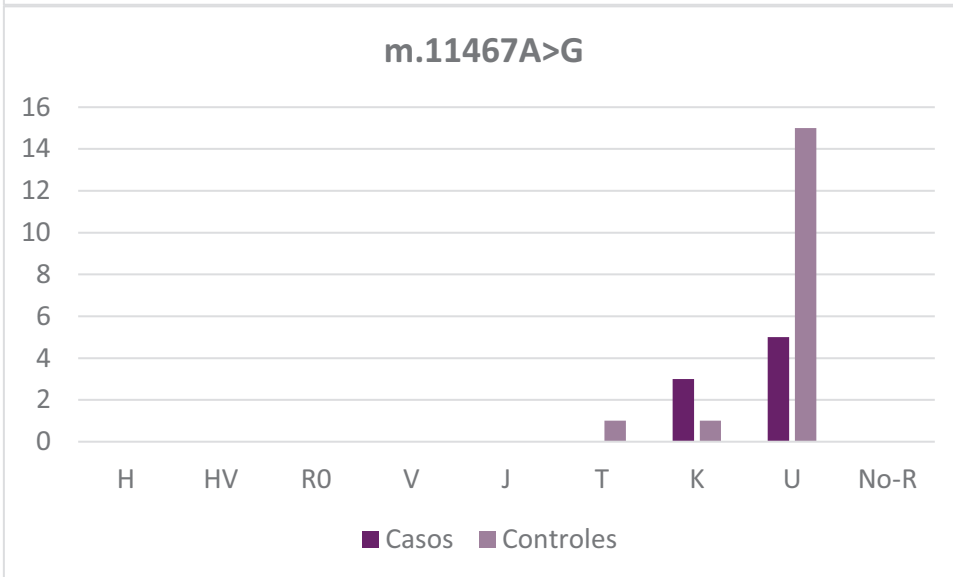
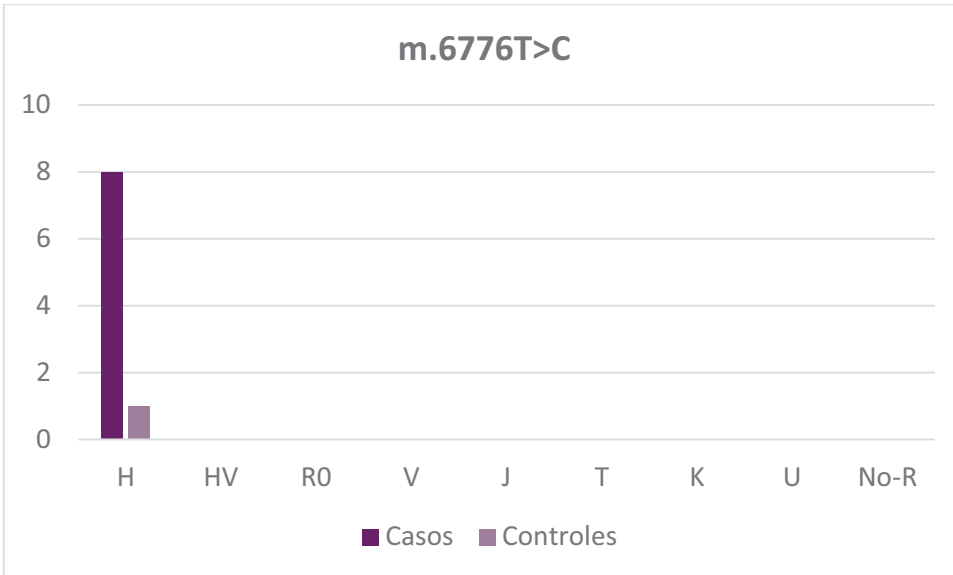


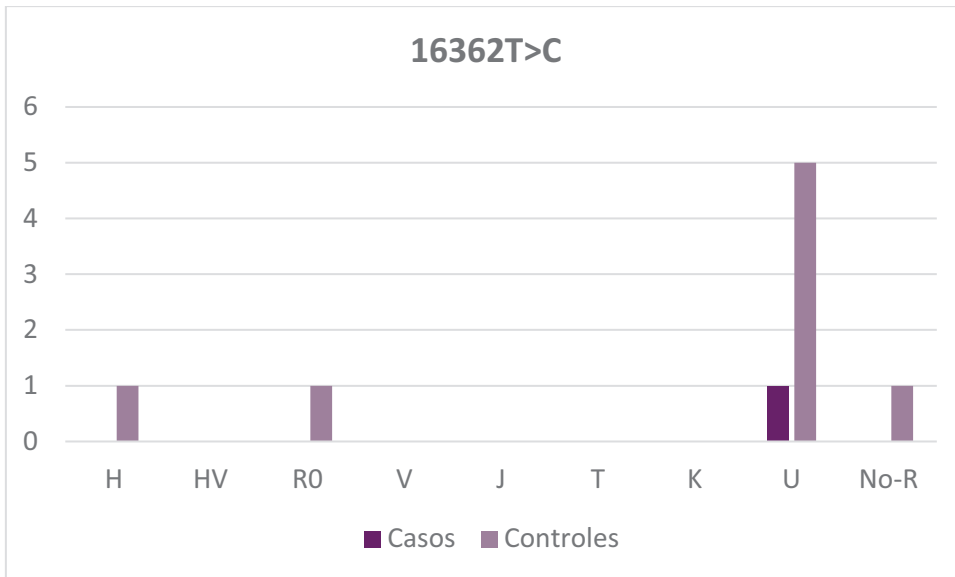
**Figura suplementaria 2.** Distribución de la heteroplasmia en la posición 4157 en función de los diferentes haplogrupos mitocondriales.



**Figura suplementaria 3.** Distribución de las mutaciones fijadas que muestran una frecuencia estadísticamente distinta entre casos de ACV e IM y sus controles, en función de los diferentes haplogrupos mitocondriales.







**Figura suplementaria 4.** Distribución de las mutaciones fijadas que muestran una frecuencia estadísticamente distinta entre casos de ECV y controles, en función de los diferentes haplogrupos mitocondriales.

