

El gen *PKP2* i la mort sobtada cardíaca



Jordi Roca Badia
2n batxillerat A
Tutora: Consol Duran
Data: 04/10/2019
INS Josep Brugulat

RESUM-ABSTRACT

CATALÀ

Aquest treball tracta de la mort sobtada, concretament de la cardiomiopatia aritmogènica, que és la més freqüent en esportistes d'elit.

La recerca consisteix en saber si variants als gens associats a aquest tipus de mort sobtada són els responsables de la malaltia; per això s'ha fet l'estudi genètic de dues famílies diferents.

Al final s'explica la importància de l'estudi genètic realitzat i els possibles tractaments que hi ha per aquesta malaltia.

CASTELLANO

Este trabajo trata de la muerte súbita, concretamente de la cardiomiopatía aritmogènica, que es la más frecuente entre los deportistas de élite.

La investigación consiste en saber si variantes en los genes asociados a este tipo de muerte súbita son los responsables de la enfermedad; por ello se ha llevado a cabo el estudio genético de dos familias diferentes.

Al final se explica la importancia del estudio genético realizado y los posibles tratamientos que hay para esta enfermedad.

ENGLISH

This research work is related to sudden cardiac death, in particular cardiomyopathy "aritmogènica", which is the most common in extreme professional athletes.

The purpose of this investigation is to detect if certain variants of genes associated to this sudden cardiac death are the responsible, for that reason, a genetic test has been done in two different families.

The importance of the genetic test as well as some potential treatments to cure this illness are explained at the final part of this research work.

AGRAÏMENTS

Primer de tot vull donar les gràcies al grup de persones que formen l'equip de GENCARDIO a l'Institut d'investigació biomèdica de Girona (IDIBGI) per haver-me donat la oportunitat de fer la part pràctica d'aquest treball de recerca en els seus laboratoris.

En segon lloc, gràcies a tu, Helena Riuró, per haver-me encaminat a fer l'estada a l'empresa a l'IDIBGI ja que ha estat una experiència inoblidable i molt gratificant.

Igualment, donar-te les gràcies a tu, Consol Duran, tutora del meu treball, per tot el teu esforç i dedicació, per l'ajuda que m'has anat donant i per haver-me guiat i aconsellat en tot moment durant tot aquest temps.

A continuació vull expressar el meu agraïment a la meva família per haver-me encoratjat a tirar endavant quan sorgia algun problema, per la paciència que han tingut, per estar sempre al meu costat i per escoltar-me quan més ho he necessitat.

I finalment et vull agrair a tu, Mireia Alcalde, d'una manera molt especial la teva dedicació i perseverança, els teus consells i sobretot et dono les gràcies per haver-me ensenyat els procediments a seguir per dur a terme les diferents seqüenciacions. Sense tu res hagués sigut possible. Ha estat un plaer poder treballar al teu costat!

Gràcies a tots i a totes!

INDEX

INTRODUCCIÓ	7
MOTIVACIÓ	7
PLANTEJAMENT DE LA RECERCA	8
HIPÒTESI	8
OBJECTIUS	8
1.EL FUNCIONAMENT DEL COR	9
1.1.L'APARELL CIRCULATORI	9
1.2.LA SANG.....	9
1.2.1.COMPOSICIÓ DE LA SANG	9
1.2.2.ELS VASOS SANGUINIS	10
1.3.EL COR: MORFOLOGIA I ESTRUCTURA.....	10
1.3.1.ELS MOVIMENTS CARDÍACS	12
1.4. LA CIRCULACIÓ DE LA SANG.....	13
1.4.1.CIRCULACIÓ MENOR O PULMONAR	14
1.4.2.CIRCULACIÓ MAJOR O SISTEMÀTICA	14
2.MALALTIES CARDIOVASCULARS.....	16
2.1.MORT SOBTADA CARDÍACA	17
3.MALALTIES ASSOCIADES A LA MORT SOBTADA	19
3.1.LES CANALOPATIES	19
3.2.LES CARDIOMIOPATIES	20
3.2.1. CARDIOMIOPATIA ARITMOGÈNICA.....	22
4.DISCOS INTERCALARS	24
4.1.DESMOSOMES	26
4.2. <i>PKP2</i>	27
5.GENÈTICA	28
5.1.LA DUPLICACIÓ DEL DNA.....	28
5.1.1.EL MECANISME DE LA DUPLICACIÓ DEL DNA EN EUCARIOTES	29
5.2.LA CORRECCIÓ D'ERRADES EN LA REPLICACIÓ	30
5.3.CLASSIFICACIÓ DE LES MUTACIONS	30
5.3.1.MUTACIONS GÈNIQUES.....	30
6.TRANSCRIPCIÓ.....	33
6.1.EL MECANISME DE LA TRANSCRIPCIÓ	33
7.TRADUCCIÓ	35
7.1.EI CODI GENÈTIC	35

7.2.EL MECANISME DE TRADUCCIÓ	37
8.PLANTEJAMENT DE LA RECERCA	40
9.TÈCNiques D'INVESTIGACIÓ	40
9.1.PROVA PCR	40
9.2.GEL D'ELECTROFORESIS AGAROSA.....	42
9.3.EXOSAP	43
9.4.BIGDYE.....	44
9.5.PRECIPITACIÓ	45
9.6.SEQÜENCIACIÓ SANGER	46
10.PROGRAMES D'ANÀLISI I BASES DE DADES	47
11.ANÀLISI DE LES SEQÜÈNCIES	48
11.1.ELECTROFOROGRAMA FAMILIA 1	48
11.2.ELECTROFOROGRAMA FAMILIA 2	49
11.3.VALORACIÓ VARIANTS.....	50
12.RESULTATS.....	50
12.1.ESTUDI FAMILIAR.....	50
13.DISCUSSIÓ	55
CONCLUSIONS	56
BIBLIOGRAFIA.....	58
ANNEX	63

INDEX DE TAULES

Taula 1: Informació família 1.....	52
Taula 2: Informació família 2.....	54

INTRODUCCIÓ

El treball es divideix en dues parts: La primera és la part teòrica on es donen els coneixements necessaris per poder entendre la recerca que es portarà a terme: el cor i el seu funcionament, l'aparell circulatori, la mort sobtada, malalties associades a la mort sobtada, la duplicació del DNA, ... i la segona és la part pràctica on s'explica detalladament la recerca i els resultats obtinguts.

MOTIVACIÓ

En el moment d'escollir el treball de recerca va haver-hi dues circumstàncies que em varen motivar moltíssim i que em varen fer decidir per aquest tema de la mort sobtada:

- Ara fa un any va ocórrer un fet familiar que em va afectar molt: el meu tiet de Sant Joan les Fonts, Jesús Roca, va morir als 55 anys mentre practicava esport. Tota la família va quedar molt trasbalsada i aquesta desgràcia va marcar un abans i un després en molts aspectes de la nostra vida.
- Al cap de poc vaig veure el documental titulat "Xoc Vital" en el qual s'explica, des dels inicis, tota la trajectòria que el cardiòleg Ramon Brugada ha portat a terme per tal de fer arribar el projecte de desfibril·lació a totes les comarques gironines. És un projecte molt ambiciós que sens dubte aconseguirà evitar la mort sobtada de moltes persones.

Era la primera vegada que sentia a parlar d'anomalies del cor que afecten el seu "sistema elèctric" i que són les responsables de la mort sobtada; de seguida vaig pensar en el meu tiet.

A partir d'aquest moment el meu interès per saber més sobre aquest tema va créixer un 100 per 100. Vaig pensar que, amb més coneixement de la mort sobtada, potser la seva mort s'hauria pogut evitar.

PLANTEJAMENT DE LA RECERCA

A partir de la meva motivació, vaig investigar una mica i vaig descobrir que la mort sobtada sovint afecta a persones joves, principalment els esportistes, que solen patir-la mentre fan esport i que a Espanya hi ha uns 30.000 casos anuals.

Com que el tema és molt ampli perquè hi ha dos tipus de morts sobtades: les cardiomiopaties (problemes estructurals del cor) i les canalopaties (problemes elèctrics), vaig decidir-me per les cardiomiopaties i, dintre d'aquestes, per la cardiomiopatia aritmogènica (AC).

La recerca consistirà en fer un estudi genètic a dues famílies diferents afectades per la AC per tal de trobar quina és la variant que causa aquesta malaltia i a quin gen està associada.

HIPÒTESI

Variants als gens associats a la cardiomiopatia aritmogènica són els responsables de la malaltia en les dues famílies estudiades.

OBJECTIUS

1. Seqüenciar els gens majoritaris associats a la cardiomiopatia aritmogènica.
2. Identificar les variants potencialment causants de AC en cada cas.
3. Estudi genètic dels familiars per identificar els individus potencialment en risc de patir una mort sobtada.

MARC TEÒRIC

1.EL FUNCIONAMENT DEL COR

1.1.L'APARELL CIRCULATORI

L'aparell circulatori està format pel cor, els vasos sanguinis i la sang.

Les funcions de l'aparell circulatori són:

- 1.Transportar les substàncies nutritives i l'oxigen a tot el cos.
2. Recollir les substàncies de rebuig i expulsar-les.

1.2.LA SANG

La sang és un líquid vermellós que circula per l'interior dels vasos sanguinis que recorren tot el nostre organisme. En el nostre cos tenim cinc litres de sang. Algunes de les seves funcions són transportar substàncies per tot l'organisme i protegir el cos de malalties.

1.2.1.COMPOSICIÓ DE LA SANG

La sang està formada per un líquid anomenat plasma i per cèl·lules sanguínies que suren en el plasma.

- El **plasma** és un líquid groguenc constituït bàsicament per aigua. Transporta substàncies nutritives i substàncies residuals.
- Les **cèl·lules sanguínies** són:
 - Els **glòbuls vermells o eritròcits** tenen forma de disc i són vermellosos. Transporten l'oxigen i el diòxid de carboni.
 - Els **glòbuls blancs o leucòcits** tenen forma irregular i són gairebé transparents. Combatent les infeccions causades per microorganismes com, per exemple, la grip.

- Les **plaquetes** tenen forma arrodonida. Són les responsables de la coagulació de la sang i actuen quan es produeix una hemorràgia.

1.2.2.ELS VASOS SANGUINIS

Els vasos sanguinis són conductes de parets elàstiques que distribueixen la sang per tot el cos.

N'hi ha de tres tipus: artèries, venes i capil·lars

-Les **artèries** transporten la sang des del cor a tots els òrgans. Tenen les parets gruixudes, molt elàstiques i resistents.

-Les **venes** transporten la sang des dels òrgans cap al cor. Tenen les parets primes i la sang hi circula amb una pressió baixa.

-Els **capil·lars** són vasos molt fins que comuniquen les artèries amb les venes. En els capil·lars es produeix l'intercanvi de substàncies entre la sang i les cèl·lules (Informació extreta de: Fernández Esteban, M.A. i altres. *BiG Biologia i Geologia 3*. Vicens Vives 2015).

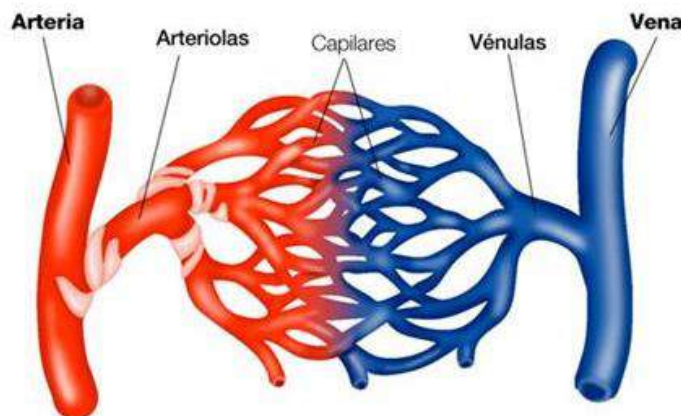


Figura 1: Vasos sanguinis: artèries, venes i capil·lars (Font: Relielton Maciel, 29 gener 2017)

1.3.EL COR: MORFOLOGIA I ESTRUCTURA

El cor és un òrgan buit, lleugerament cònic, situat a la part central de la cavitat toràctica desplaçat una mica cap a l'esquerra, entre els pulmons. Les seves parets estan formades pel múscul cardíac (miocardi) que permet que el cor es

contregui i es relaxi rítmicament. És el motor central de l'aparell circulatori que fa circular la sang pels vasos sanguinis i pels pulmons.

Des de la part més exterior fins a l'interior, el cor consta de tres capes:

- El Pericardi: és la capa més externa del cor que l'envolta i el separa de les estructures veïnes. Forma una espècie de bossa o sac que cobreix completament el cor per evitar que aquest es lesioni. Té dues parts, el pericardi serós i el pericardi fibrós, l'espai que hi ha entre aquestes dues capes s'anomena cavitat pericàrdica i en aquest espai es produeix un líquid que funciona com a lubricant fent que el cor bombegi lliurement i evitant qualsevol fricció amb els òrgans del voltant.
- El Miocardi: és la capa mitjana del cor i la més gruixuda. Constitueix el teixit muscular del cor que es contreu involuntàriament i s'encarrega de bombejar la sang per tot el sistema circulatori. Les seves cèl·lules musculars són estriades i estan unides les unes amb les altres per teixit connectiu fibrós.
- Endocardi: és la capa més interna que recobreix les cavitats i les vàlvules del cor. Es divideix en tres capes i és més gruixut en les aurícules que en els ventricles. Té una superfície llisa que permet que la sang flueixi lliurement pel cor i no s'hi adhereixi. L'última capa està formada per teixit connectiu i per fibres de Purkinje, les quals ajuden a transmetre els senyals elèctrics a tot el cor fent possible que aquest bategi. (Gil de Bernabé i Ortega, E., *Atlas d'Anatomia*. Barcelona: Editorial Edibook, SL)

Els cardiomiòcits són les cèl·lules que predominen al cor i es troben principalment al miocardi; però també s'hi troben altres tipus de cèl·lules com els fibroblasts, les cèl·lules endotelials i teixit conjuntiu.

Internament, el cor està dividit en quatre cavitats: dues aurícules i dos ventricles. Els ventricles tenen les parets més gruixudes que les aurícules perquè han d'aguantar més pressió.

1.3.1. ELS MOVIMENTS CARDÍACS

El cor realitza dos tipus de moviments: es contreu i es relaxa rítmicament, per tal de fer arribar la sang a tot el cos. El període de contracció es diu sístole i el de relaxació s'anomena diàstole.

La successió d'una contracció i una dilatació constitueix un batec. El ritme normal de contracció del cor en una persona en repòs és d'uns 70 batecs per minut.

El batec del cor o cicle cardíac segueix el procés següent:

1r- Sístole auricular: en contreure's els músculs de les aurícules, les vàlvules mitral i tricúspide s'obren i la sang passa als ventricles a través d'uns orificis anomenats auriculo-ventriculars. La sang no retrocedeix cap a les venes gràcies a què els orificis s'estrenyen quan es contreuen les aurícules i els ventricles provoquen una aspiració. Aquesta fase dura 0,15 segons.

2n- Sístole Ventricular: és la fase de contracció dels ventricles i d'expulsió de la sang cap a les artèries. Abans d'iniciar-se, els ventricles són ben plens de sang que els ha arribat de les aurícules. Quan comença la contracció ventricular augmenta la pressió dins els ventricles, originant dos efectes: en primer lloc, les vàlvules que separen els ventricles de les aurícules es tanquen impedit que la sang hi reflueixi; en segon lloc s'obren les vàlvules arterials perquè la sang hi passi. La sang surt per l'artèria aorta en el ventricle esquerre i va cap a la resta del cos i surt per l'artèria pulmonar en el ventricle dret i va cap als pulmons. El buidament de la sang del cor es facilita a l'obrir-se les vàlvules sigmoides de les artèries. Aquesta fase dura uns 0,3 segons.

3- La diàstole general: és la fase de relaxació dels ventricles, és el moment en el qual tot el cor es troba relaxat fins que s'ompli de la sang que arriba de les aurícules. Aquesta fase dura uns 0,4 segons. (Informació extreta de: Gil de

Bernabé i Ortega, E., *Atlas d'Anatomia*. Barcelona: Editorial Edibook, SL i de Cor. (2019, setembre 26). A viquipèdia).

1.4.LA CIRCULACIÓ DE LA SANG

El recorregut de la sang es realitza en un únic sentit i sempre és el mateix. Cada aurícula només es comunica amb el ventricle corresponent. Les vàlvules mitral (a la part esquerra) i tricúspide (a la part dreta) permeten el pas de la sang de l'aurícula al ventricle corresponent i impedeixen el moviment en sentit contrari. La sortida de la sang dels ventricles cap a les artèries està regulada per les vàlvules sigmoides i només s'obren quan la sang del ventricle té la pressió necessària com a conseqüència de la contracció de la paret del ventricle. (Sistema circulatori. (2019, setembre 24). A Viquipèdia).

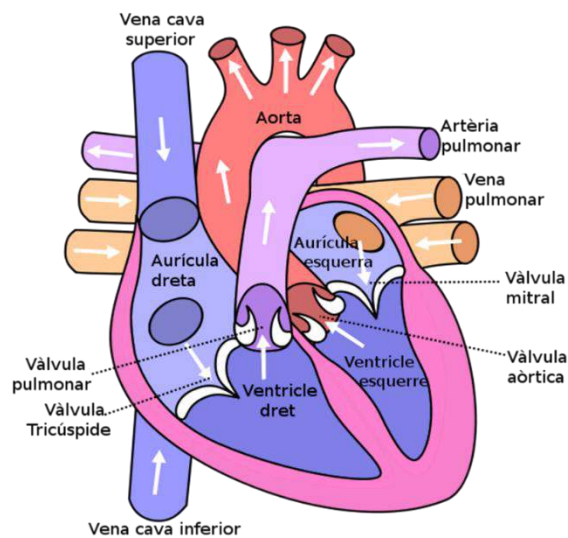


Figura 2: Estructura del cor. (Font: viquipèdia)

Aurícula dreta: aquí hi van a parar les dues venes caves (la superior i la inferior) que porten al cor la sang de tot l'organisme.

Aurícula esquerra: aquesta cavitat recull la sang que arriba dels pulmons, ja oxigenada.

Ventriple dret: rep la sang de l'aurícula dreta a través de la vàlvula tricúspide, s'encarrega d'impulsar aquesta sang, pobra en oxigen, cap a l'artèria pulmonar per mitjà de la vàlvula pulmonar.

Ventriple esquerre: rep la sang oxigenada de l'aurícula esquerra a través de la vàlvula mitral i l'envia cap a l'artèria aorta per mitjà de la vàlvula aòrtica

En l'organisme humà la circulació té dos sistemes perfectament diferenciats:
El menor o pulmonar i el major o general

1.4.1.CIRCULACIÓ MENOR O PULMONAR

En el **circuit menor o pulmonar**, la sang va del cor als pulmons i dels pulmons al cor. La seva funció és fer l'intercanvi de gasos respiratoris: als pulmons la sang expulsa el diòxid de carboni i absorbeix l'oxigen de l'aire.

El recorregut del circuit menor o pulmonar és el següent:

A l'aurícula dreta hi van a parar les dues venes caves (la superior i la inferior) que porten al cor la sang desoxigenada de tot el cos. De l'aurícula dreta, la sang pobra en oxigen passa al ventriple dret per la vàlvula tricúspide, el ventriple dret es contrau i envia la sang als pulmons a través de l'artèria pulmonar. Aquesta artèria es divideix en dues branques que entren als pulmons i es ramifiquen per formar capil·lars a través dels quals s'efectua l'intercanvi del gasos respiratoris. La sang oxigenada torna per les venes pulmonars fins a l'aurícula esquerra i aquí s'acaba el circuit pulmonar menor.

1.4.2.CIRCULACIÓ MAJOR O SISTEMÀTICA

En el **circuit major o general**, la sang va del cor cap a les diferents parts del cos (cap, extremitats, intestins, ronyons, etc.) i torna de nou al cor.

La sang proporciona substàncies nutritives i oxigen a les cèl·lules. Les cèl·lules transformen aquestes substàncies en energia i també generen substàncies residuals i diòxid de carboni que aboquen a la sang la qual s'encarregarà d'expulsar-les.

El recorregut del circuit major o general és el següent:

La sang oxigenada de l'aurícula esquerra passa al ventricle esquerra a través de la vàlvula mitral, el ventricle esquerre es contrau i impulsa la sang oxigenada, procedent de la circulació pulmonar, cap a l'artèria aorta.

Aquesta artèria es ramifica en artèries més petites i la sang es distribueix per tots els òrgans del cos on s'efectua l'intercanvi capil·lar: deixa l'oxigen i els nutrients i recull les substàncies de rebuig que s'han produït. Els capil·lars es connecten a venes que van fins a les venes caves i aquesta sang, pobra en oxigen i carregada de diòxid de carboni, torna al cor entrant per la vena cava a l'aurícula dreta on torna a començar el circuit pulmonar. (informació extreta de: Fernández Esteban, M.A. i altres. *BiG Biología i Geología 3*. Vicens Vives 2015).

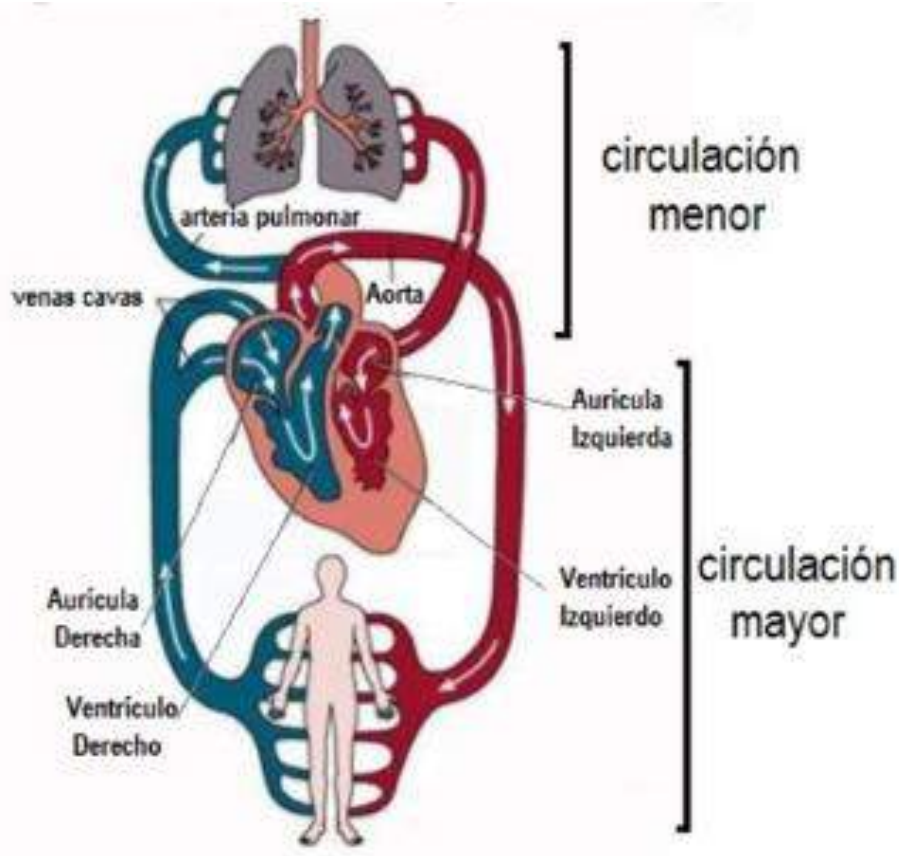


Figura 3: Circulació major i menor (Font: 11-MH-ELTON FRANK QUISPE CUSICHE)

2.MALALTIES CARDIOVASCULARS

Les malalties cardiovasculars són actualment la principal causa de mort a tot el món.

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'any 2015 (últim any en què s'han publicat dades) varen morir 17,7 milions de persones al món a causa d'una malaltia cardiovascular, xifra que representa un 31% de totes les morts registrades al món i, segons dades publicades per la Fundació Espanyola del Cor (FEC), s'estima que aquesta dada ascendirà a 23 milions l'any 2030. (Bloc Impulso vital. Las cifras de la enfermedad cardiovascular.(2018, septiembre 28). *Fundación Española del Corazón*)

En l'últim informe de "Defuncions segon causa de la mort" de l'any 2017 elaborat per l'Institut Nacional d'Estadística, s'adverteix que a Espanya les malalties cardiovasculars continuen essent la primera causa de mort (28,8%), per davant del càncer (26,7%) i de les malalties respiratòries (10,3%) (Notas de Prensa. (2018, diciembre 19). Defunciones según la causa de muerte. Año 2017. *INE*).

Concretament, l'any 2017, a Espanya varen morir quasi 70.000 persones per malalties cardiovasculars: més de 32.000 persones per infart de miocardi i 37.000 persones per altres problemes associats a la salut de cor (Morales, F. (2018, septiembre 29). Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en España. *Expansión*).

Aquesta malaltia és multifactorial, ja que hi ha diferents aspectes que intervenen per afavorir-la, alguns d'ells són: el tabac, l'obesitat, la dieta, la genètica, la inactivitat,... De totes aquestes afectacions, en aquest treball es tractaran les de caràcter genètic.

Es calcula que aproximadament el 12,5% de les defuncions que es produeixen de forma natural a Espanya són morts sobtades (< 2 h des de l'inici dels símptomes (Muerte Súbita (I). (1999). Epidemiología de la muerte súbita cardíaca en España. *Revista Española de Cardiología*. 52 (9), 717-725).

Segons dades de l'any 2017, cada any es produeixen a Espanya 30.000 casos de mort sobtada. El 80% d'aquestes morts són causades per una malaltia coronària i el 20% són causades per malalties cardiovasculars hereditàries. Hi ha dos grans grups: les cardiomiopaties i les canalopaties ("Noticias" España. (2018, septiembre 26). Salud. Cada año se producen en España unos 30.000 casos de muerte. *RTVE.es/AGENCIAS*).

2.1.MORT SOBTADA CARDÍACA

La mort sobtada és la mort que es produeix de forma natural per una aturada del cor que succeeix de manera inesperada en persones que aparentment tenen un bon estat de salut o que es trobaven bé durant les 24 hores anteriors als símptomes. Primer de tot la persona perd el pols i, si passen més de deu segons sense que el cervell rebi l'oxigen que necessita, llavors es desmaia i, si no rep assistència mèdica, en el termini màxim d'una hora morirà.

La mort sobtada es produeix, en la majoria dels casos, per una arrítmia cardíaca anomenada fibril·lació ventricular. Aquesta arrítmia provoca un mal funcionament elèctric del cor fent que aquest no pugui bategar correctament i deixi de bombejar la sang, aturant-se el rec sanguini tant al cervell com a la resta del cos i la pressió arterial cau a zero. L'òrgan més sensible és el cervell ja que amb pocs minuts d'aturada cardíaca es poden produir lesions cerebrals molt greus i irreversibles.

En alguns casos, amb reanimació cardiopulmonar, es pot aturar l'arrítmia i el pacient es recupera. El tractament més eficaç és la desfibril·lació: amb un aparell anomenat desfibril·lador s'aplica alhora una descàrrega elèctrica controlada a totes les cèl·lules del cor.

Per tenir un bon pronòstic és molt important el temps que passa des que el cor s'atura fins que s'aplica una desfibril·lació; cada minut que passa hi ha un 10% menys de possibilitats que el pacient es recuperi (Rodríguez, M., Muerte Súbita. (2017). *Fundación Española del Corazón*).

Tot i que la mort sobtada s'ha donat en persones que no han tingut mai cap patologia, en persones joves pot ser causada per defectes en l'estructura del

cor (cardiomiopaties) o per defectes en la generació o en la transmissió dels impulsos elèctrics del cor (canalopaties).

Els tres casos de cardiomiopatia més freqüents son:

Miocardiópatia hipertròfica: és una malaltia hereditària que es caracteritza per l'engrossiment del múscul cardíac, en la majoria dels casos del ventricle esquerre.

Miocardiópatia dilatada: és una malaltia del cor que es caracteritza per la dilatació anormal del ventricle esquerre i disfunció sistòlica (bombeig de sang anormal), incapacitant al múscul cardíac per bombejar sang eficaçment.

Cardiomiopatia aritmogènica: és una malaltia del cor que es caracteritza per el deteriorament progressiu del teixit muscular del cor que és reemplaçat per teixit fibroadipós. (Informació extreta de: Texas Heart Institute. *Cardiomiopatia*).

Dintre les canalopaties trobem:

Síndrome de Brugada: malaltia del cor caracteritzada per episodis de taquicàrdia ventricular polimòrfica ràpida que pot causar episodis de desmaís o mort sobtada.

Síndrome de QT llarg: és una anomalia dels canals de potassi i sodi del cor i produeix arrítmies. Pot causar pèrdues de consciència, aturada cardíaca i fins i tot la mort sobtada.

Síndrome de QT curt: és una malaltia genètica del sistema elèctric del cor que causa arrítmies i també la mort sobtada. El seu nom prové d'un escurçament de l'interval QT.

Taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica: és una malaltia del cor de caràcter hereditari que es presenta en cors estructuralment normals; està relacionada amb l'estrès físic i emocional (Muerte súbita cardíaca. (2015, septiembre 25). *Cuídate Plus*).

Aquestes malalties sovint afecten persones joves, i aproximadament en la meitat dels casos, la mort sobtada és la primera i única manifestació de la malaltia.

Els esportistes, especialment els futbolistes, conformen un grup de població que pot experimentar aquest episodi durant la pràctica de la seva activitat física. Els experts fan èmfasi en què tots, tant jugadors federats com aficionats, haurien de sotmetre's a reconeixements mèdics específics amb assiduitat. Això és degut, a que moltes morts sobtades en esportistes menors de 35 anys són causades per malformacions congènites del cor que podrien ser descobertes amb proves convencionals (Quan el cor diu prou: Mort Sobtada Cardíaca. (2017, abril 10). *Mutualitat Catalana de Futbolistes*).

Només hi ha un tractament efectiu per frenar la mort sobtada cardíaca i és la desfibril·lació precoç.

3.MALALTIES ASSOCIADES A LA MORT SOBTADA

3.1.LES CANALOPATIES

Les canalopaties són anomalies genètiques en proteïnes de les cèl·lules cardíques que controlen l'activitat elèctrica del cor i que poden causar alteracions en el ritme cardíac (Brent Mitchell, L. (1899). Canalopatías cardíacas. *Manual MSD. Merck and Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA*).

Les canalopaties es produeixen per la disfunció dels canals iònics de calci, sodi o potassi (proteïnes de la membrana del cor que regulen el pas dels ions a través seu). El cor no presenta cap alteració anatòmica i la persona no té cap símptoma.

Les quatre canalopaties més importants són:

- La Síndrome Brugada
- La Síndrome de QT llarg
- La Síndrome de QT curt
- La Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica

3.2.LES CARDIOMIOPATIES

Les cardiomiopaties són malalties associades a anomalies estructurals del cor. Concretament, danyen les parets del múscul cardíac i impedeixen que el cor bombegi la sang a la resta del cos. El cor es fa més gros i rígid.

Els principals símptomes son:

- Falta d'alè quan es fan un esforç o fins i tot estant en repòs
- Cames, turmells i peus inflats
- Cansament
- Sentir els batecs del cor ràpids i forts
- Molèstia o opressió al pit
- Mareig

Es calcula que una de cada cinc persones adultes pateix la malaltia però la majoria de vegades passa desapercebuda i el malalt no rep el tractament necessari.

Tot i que sovint les causes són desconegudes, se sap que alguns tipus de cardiomiopaties són hereditàries; altres vegades són el resultat d'una malaltia adquirida.

La cardiomiopatia adquirida pot donar-se per diferents factors, entre els més destacables:

- Pressió arterial alta
- Dany en el teixit cardíac provocat per un atac cardíac
- Freqüència cardíaca accelerada
- Problemes a les vàlvules cardíques
- Trastorns metabòlics como l'obesitat o la diabetis
- Problemes de tiroides
- Falta de vitamines o minerals essencials, com tiamina (vitamina B-1)

- Complicacions durant l'embaràs
- Abús de l'alcohol durant un llarg període de temps
- Consumició de drogues

Les cardiomiopaties poden provocar:

Insuficiència cardíaca: el cor no pot bombejar la sang que el cos necessita i, si no es tracta, pot ser mortal.

Coàguls sanguinis: quan el cor no bombeja correctament es poden formar coàguls de sang i si aquests coàguls passen al flux sanguini, poden obstruir-lo de manera que no pugui arribar la sang a altres òrgans vitals.

Problemes a les vàlvules: quan hi ha una cardiomiopatia el cor es fa gros i llavors es pot donar el cas que les vàlvules cardíques no tanquin bé. Això pot provocar un flux invers.

Aturada cardíaca i mort sobtada: aquesta malaltia pot causar ritmes cardíacs anormals els quals poden provocar desmaís o la mort sobtada si el cor deixa de bategar correctament.

El tractament pot ser amb medicaments, implantant dispositius quirúrgicament i en els casos més greus, fent un transplantament de cor.

Tot i que en molts casos les cardiomiopaties no es poden prevenir, és important tenir en compte els nostres antecedents familiars i portar un estil de vida saludable.

Els tres tipus més freqüents de cardiomiopaties són: La miocardiopatia hipertròfica, La miocardiopatia dilatada i la cardiomiopatia aritmogènica. (Informació extreta de: Miocardiopatia. (2019, gener 23). *MayoClínic*).

En aquest treball m'he centrat en la cardiomiopatia aritmogènica.

3.2.1. CARDIOMIOPATIA ARITMOGÈNICA

La cardiomiopatia aritmogènica és una malaltia d'origen genètic que es caracteritza per la substitució progressiva del teixit del miocardi per teixit fibroadipós, especialment en el ventricle dret, tot i que quasi en un 50% dels casos també afecta el ventricle esquerre (Tomé Esteban, M, García-Pinilla, J.M, Mckenna, W.J. (2004). Actualización en miocardiopatía aritmogènica del ventrículo derecho: genética, diagnóstico, manifestaciones clínicas y estratificación de riesgo. *Update in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Genetic, Clinical Presentation and Risk Stratification. Revista Española de Cardiología. 57 (8), 757-767*).

Un cor sa està format per múscul perquè la seves cèl·lules es mantenen unides per proteïnes, en canvi, en un cor malalt, les proteïnes no poden mantenir unides les cèl·lules del cor; llavors aquestes es separen, es moren i en el seu lloc es formen adipòcits de grassa per intentar reparar el mal.

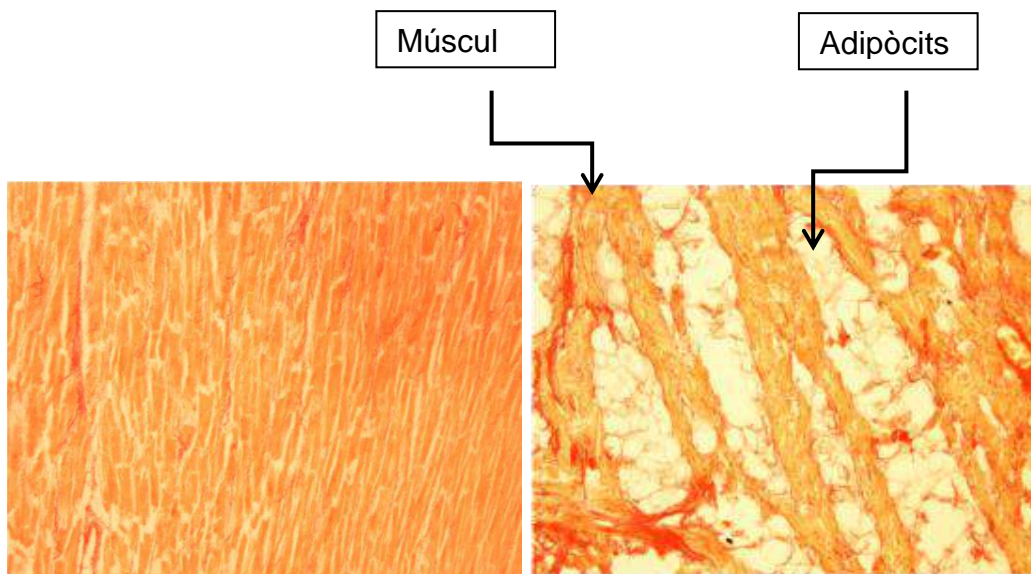


Figura 4: miocardi individu sa.

Figura 5: miocardi individu afectat per CA.
Substitució Fibroadiposa en el teixit.

(Font: Tesi doctoral Mireia Alcalde, 20 de gener de 2016)

És una malaltia hereditària en el 60% dels casos i és causada per mutacions patogèniques en gens que codifiquen proteïnes desmosòmiques, entre els més destacats hi ha:

<u>Gen</u>	<u>Proteïna</u>
<i>PKP2</i>	Plakofilina-2
<i>DSP</i>	Desmoplaquina
<i>DSG2</i>	Desmogleïna-2
<i>DSC2</i>	Desmolonina-2
<i>JUP</i>	Placoglobina

Les mutacions d'aquests gens són les responsables del funcionament anormal dels desmosomes, fent que les cèl·lules del miocardi se separin i morin (Pruebas genéticas – Cardiomiopatia ventricular derecha aritmogènica (Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy) – Genes *PKP2*, *CTNNA3*, *DES*, *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *JUP*, *LMNA*, *PLN*, *RYR2*, *TGFB3*, *TTN* y *TMEM43*. Instituto Valenciano de Microbiología).

També s'han identificat mutacions de gens no desmosòmics, responsables d'aquesta patologia:

LMNA (lamin A/C), *TMEM43* (proteïna transmembrana 43), *TGFB3* (factor de creixement transformador beta 3), *CTNNA3* (catenina alfa-3), *TTN* (titina) i *PLN* (fosfolan).

La presència de teixit fibroadipós provoca alteracions en la transmissió elèctrica (impuls elèctric). Aquestes anomalies poden provocar arrítmies ventriculars, síncope i fins i tot la mort sobtada. S'estima que aquesta malaltia és responsable d'un 5% del total de les morts sobtades que succeeixen anualment. Malauradament, en alguns casos la pròpia mort sobtada es pot presentar com el primer símptoma de la patologia.

El símptomes més comuns son: palpitations, marejos, pèrdues del coneixement i dificultats per respirar.

Afecta una de cada 5.000 persones i la seva prevalença és superior en l'home (80% dels casos). El rang d'edat en la presentació del primer símptoma és molt ampli i es situa entre els 20-60 anys. L'edat mitjana de diagnòstic es situa al voltant dels 35-40 anys. En la població menor de 35 anys es considera la primera causa de mort sobtada i molt especialment en joves atletes ja que l'esport és un inductor d'arrítmies letals en casos predisposats genèticament a patir la patologia (Alcalde, M. (2015). *Paper de la Placofilina-2 en la Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret: Bases Genètiques i Mecanismes Moleculars*. (Tesi doctoral). Universitat de Girona. Catalunya).

Les persones amb aquesta malaltia tenen un error genètic en la seqüència de lletres que es necessiten per formar les proteïnes que uneixen les cèl·lules del múscul del cor. Aquest error genètic el tenen des del naixement però les alteracions no surten fins a l'adolescència o l'edat adulta.

Actualment aquesta malaltia no té cura però hi ha molts tractaments que redueixen el risc de desenvolupar els símptomes i ajuden a prevenir complicacions.

L'avaluació inicial dels pacients sospitosos de patir aquesta patologia consisteix en una exploració física, la revisió de la seva història clínica: antecedents familiars d'arrítmies o mort sobtada, l'ECG, el monitoratge Holter de 24h i l'exploració dels dos ventricles mitjançant tècniques d'imatge no invasives. Si els resultats de les tècniques d'imatge no invasives són suggestius però no diagnòstics de cardiomiopatia aritmogènica; per poder establir el diagnòstic final, podria ser necessari practicar proves complementàries com una prova electrofisiològica o una biòpsia endomiocàrdica.

4.DISCOS INTERCALARS

El múscul cardíac està format per cèl·lules musculars ramificades que tenen un o dos nuclis i que s'uneixen entre sí mitjançant un tipus d'unió anomenada disc intercalar. A diferència del múscul esquelètic, les fibres musculars cardíacques corresponen a un conjunt de cèl·lules cardíacques unides entre sí en disposició

lineal (Félix Castillo Saavedra, F.E. (2006). Perfil cardíac. Múscul cardíac. *Monografias.com*).

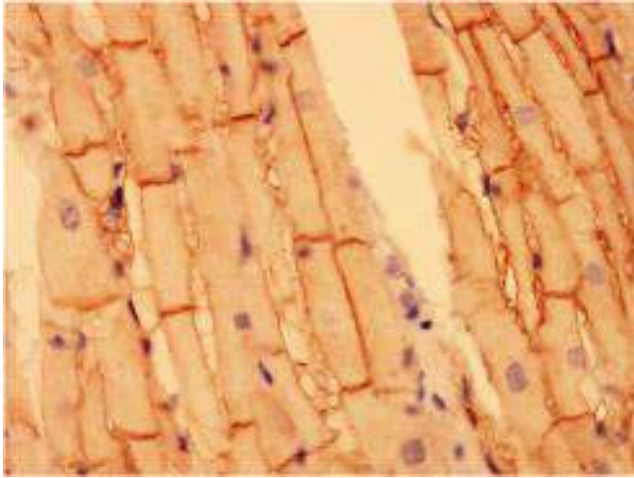


Figura 6: marcatge immunohistoquímic dels discos intercalars del miocardi. (Font: Tesi doctoral Mireia Alcalde, 20 de gener de 2016).

Els discos intercalars són complexos proteics que actuen com a sistemes d'unió que associen a les cèl·lules musculars cardíques per formar les fibres del miocardi. Aquestes estructures es troben en regions de la membrana on els extrems de dues cèl·lules s'enfronten i s'ubiquen en lloc d'un disc Z. El seu nom deriva del fet que en talls longitudinals apareixen com estructures escaleriformes.

Els discos intercalars presenten:

- Una porció transversa, en la qual s'ubiquen dos tipus d'unions intercel·lular: fàscia adherents i màcula adherents
- Una la porció lateral, que va paral·lela als miofilaments, en la qual s'ubiquen unions de comunicació (nexes o gap junctions).

La fàscia adherents és un tipus d'unió pròpia del cor. Aquestes estructures ancoren filaments d'actina a la membrana plasmàtica i també uneixen les membranes de cèl·lules adjacents. D'aquesta manera s'associen l'aparell contràctil de cada cèl·lula amb el de la cèl·lula veïna.

La màcula adherents correspon a desmosomes típics que s'ubiquen en les porcions transverses i paral·leles del disc. Aquestes estructures ancoren filaments intermitjos de la fibra cardíaca i participen, juntament amb la fàscia adherents, en l'adhesió de les membranes plasmàtiques de les cèl·lules veïnes.

Les unions de comunicació (nexes) corresponen a llocs que permeten el pas de ions i de molècules petites des del citoplasma d'una cèl·lula a la cèl·lula veïna (Castell, A. (s.d.). *Pàgina web interactiva de biologia cel·lular i tissular. Múscul Cardíac. Discos intercalars*).

4.1.DESMOSOMES

Els desmosomes són estructures cel·lulars que mantenen adherides a cèl·lules veïnes. Estructuralment aquesta unió està controlada per les cadherines (desmogleïna i desmocolina), els seus filaments intermedis (queratina). A l'interior de les cèl·lules actuen com a llocs d'ancoratge per als filaments intermedis en forma de corda, els quals formen una xarxa estructural al citoplasma proporcionant una certa rigidesa. Mitjançant aquestes unions els filaments intermedis de les cèl·lules adjacents estan indirectament connectats formant una xarxa contínua que s'estén a tot el teixit. El tipus de filaments intermedis ancorats als desmosomes depèn del tipus de cèl·lula: de queratina en la majoria de les cèl·lules epitelials i de desmina en les fibres musculars cardíques.

L'estructura general dels desmosomes consta d'una placa citoplasmàtica densa composta per un complex proteic d'ancoratge intracel·lular que és el responsable de la unió dels elements citoesquelets a les proteïnes d'unió transmembrana (Informació extreta de: Desmosoma. (2018, gener 19). A viquipèdia).

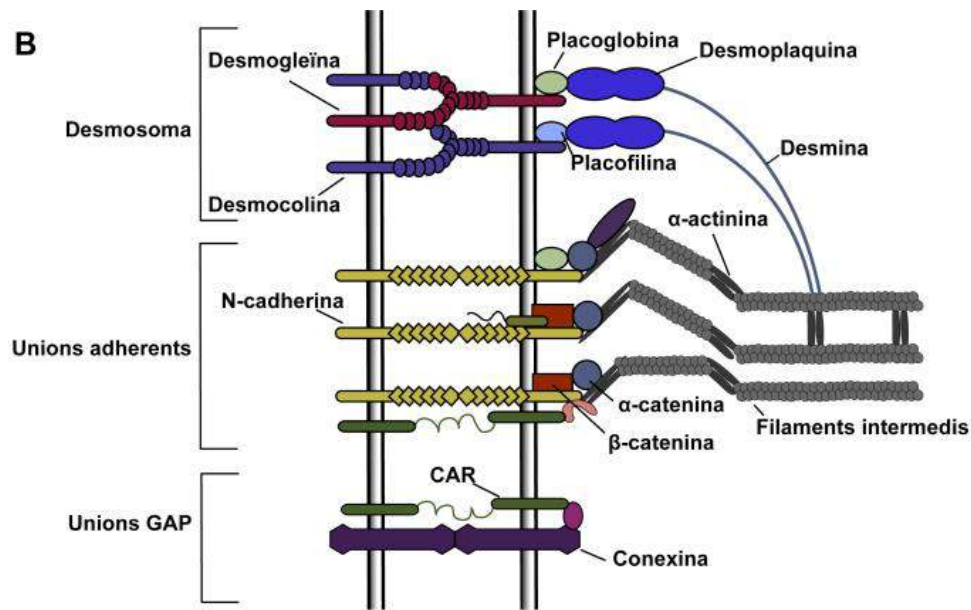


Figura 7: Esquema de les unions que formen part del disc intercalar (Font: Tesi doctoral Mireia Alcalde, 20 de gener de 2016).

4.2.PKP2

El gen *PKP2* proporciona instruccions per fabricar una proteïna anomenada plakofilina-2 (plaofilina-2). Aquesta proteïna es troba principalment a les cèl·lules musculars del miocardi. Dins d'aquestes cèl·lules, la plakofilina-2 és una de diverses proteïnes que formen unes estructures anomenades desmosomes, situades dins dels discos intercalats. Aquestes estructures uneixen cèl·lules entre si, donen rigidesa al miocardi i intervenen en les unions intercel·lulars entre cèl·lules adjacents (*PKP2* gene. Plakophilin 2. (2018 February). Genetics Home Reference, *U.S. National Library of Medicine*).

Les mutacions en el gen *PKP2* són les més habituals; es calcula que el 70% de totes les mutacions associades a la cardiomiopatia aritmogènica estan dins d'aquest gen. El gen *PKP2* està situat en el braç curt del cromosoma 12 (12p11) i, com ja s'ha dit, codifica la plakofilina-2. S'han identificat més de cinquanta mutacions d'aquest gen en les persones que pateixen cardiomiopatia aritmogènica ventricular dreta. Algunes d'aquestes mutacions fan sintetitzar una plakofilina-2 anormalment curta, d'altres alteren la seva estructura traient o canviant alguns aminoàcids. Llavors es codifica una proteïna anòmala que altera la formació i la funció dels desmosomes.

Les cèl·lules del miocardi es separen unes de les altres i es moren, això passa sobretot quan el múscul cardíac es troba en estrès en situacions d'exercici intens. Les cèl·lules del miocardi danyades es van substituint progressivament per grassa i teixit cicatricial. Les parets del ventricle afectat (normalment el dret) es van dilatant i no poden bombejar la sang de manera correcta, provocant alteracions en l'impuls elèctric (arrítmies), sincopes o la mort sobtada.

Aproximadament la meitat dels casos passen en famílies. I la majoria dels casos familiars tenen un patró d'herència autosòmic dominant, amb la qual cosa, una sola còpia alterada del gen en cada cèl·lula és suficient per expressar la malaltia. En casos excepcionals, tenen un patró d'herència autosòmic recessiu en els que les dues còpies del gen en cada cèl·lula estan afectats, on els progenitors son portadors d'una còpia mutada del gen però no mostren signes ni símptomes de la malaltia. (Informació extreta de: Alcalde, M. (2015). *Paper de la Placofilina-2 en la Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret: Bases Genètiques i Mecanismes Moleculars*. (Tesi doctoral). Universitat de Girona. Catalunya).

5.GENÈTICA

5.1.LA DUPLICACIÓ DEL DNA

Per explicar aquest procés es van proposar tres hipòtesis: la hipòtesi semiconservadora, la conservadora i la dispersiva. Finalment gràcies als experiments de Meselson i Stahl l'any 1957 es va poder observar que la hipòtesi certa era la semiconservadora.

La hipòtesi semiconservadora proposa que les dues cadenes del DNA inicial se separen i cadascuna serveix de motlle per a la síntesi, segons la complementarietat de les bases nitrogenades, d'una nova cadena. Per tant, en les dues molècules del DNA de doble hèlix produïdes, un dels filaments seria l'antic, i l'altre, el modern (Jimeno, A, Ugedo, L., Rodríguez, S. (2016). *Biología, Sèrie Observa. Batxillerat 1*. Barcelona: Grup promotor Santillana).

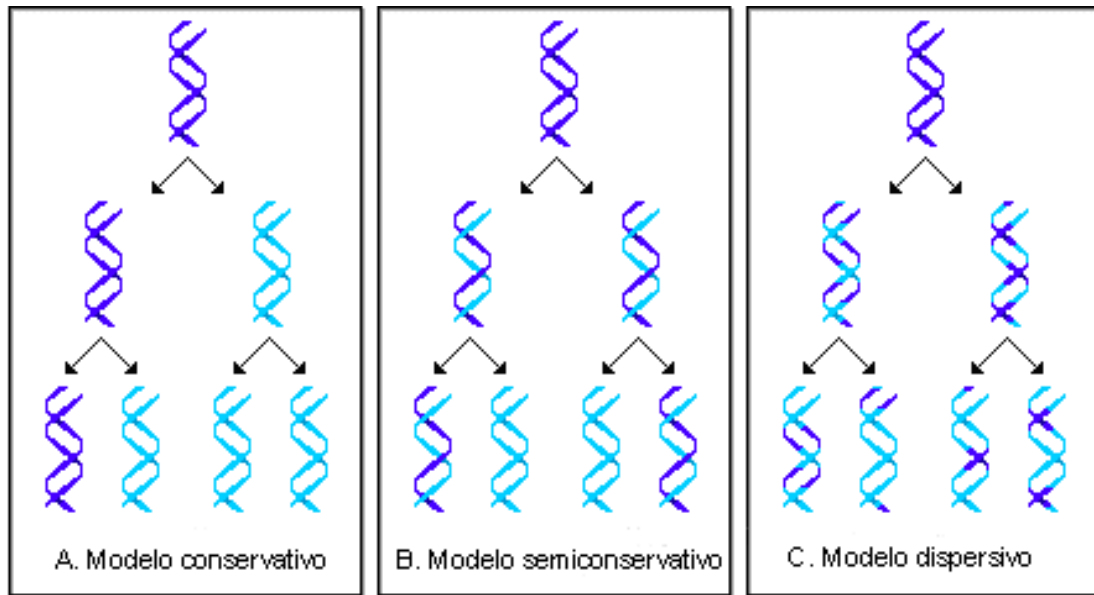


Figura 8: Models clàssics per a la replicació del DNA (Font: maph49.galeon)

blau fosc – filament antic

blau clar – filament nou

5.1.1. EL MECANISME DE LA DUPLICACIÓ DEL DNA EN EUCARIOTES

La duplicació del DNA en eucariotes és semblant al procés que se segueix en els bacteris. Cal destacar-ne dues diferències bàsiques i també uns quants petits detalls:

- La primera gran diferència és que el DNA dels eucariotes està força associat a histones. Durant la replicació, el filament que serveix de patró al filament conductor es queda les histones i tots dos s'enrotllen sobre els octàmers antics. El filament que serveix de patró al retardat i el retardat es caragolen sobre nous octàmers d'histones que arriben als llocs de replicació per formar altres nucleosomes.
- La segona gran diferència és que, tenint en compte que la longitud del DNA d'un cromosoma eucariòtic és molt més gran que el DNA bacterià (uns cinquanta mil·límetres davant d'una mica més d'un mil·límetre) i que, segurament per la presència d'histones, el procés és bastant més lent (unes deu vegades més lent), en cada DNA d'un cromosoma no hi

ha un sol origen de replicació, sinó aproximadament un centenar. S'hi formen unes cent bombolles de replicació que es distribueixen irregularment i així hi ha regions amb moltes bombolles i regions amb molt poques. S'activen de manera coordinada i constitueixen les anomenades unitats de replicació o replicons.

Entre els detalls diferenciables cal destacar que els fragments d'Okazaki són més petits, d'uns cent a dos-cents nucleòtids, i que el procés de replicació es duu a terme durant el període S de la interfase, que dura, aproximadament, de sis a vuit hores.

5.2.LA CORRECCIÓ D'ERRADES EN LA REPLICACIÓ

La vida d'un organisme depèn de l'exactitud i la precisió amb què es transmet la informació, és a dir, de la fidelitat amb què es duu a terme la duplicació del DNA. Malgrat que la duplicació ha de ser exacte, ràpida i fidel, es comet un error cada 10 milions de bases. Això comportaria un nombre d'errades molt elevat en cèl·lules que es dupliquen molt, com poden ser les embrionàries. Per evitar-ho, les DNA-polimerases comproven, amb una lectura de prova, cada nucleòtid que afegeixen a la cadena en creixement. Si troben un nucleòtid aparellat de manera incorrecta, l'eliminen gràcies a una acció exonucleasa en sentit contrari ($3' \rightarrow 5'$) i introdueixen el correcte.

5.3.CLASSIFICACIÓ DE LES MUTACIONS

Trobem mutacions gèniques, que són en les que ens centrarem, però també hem de tenir present que hi ha mutacions genòmiques i mutacions cromosòmiques.

5.3.1.MUTACIONS GÈNIQUES

Les mutacions gèniques són alteracions en la seqüència de nucleòtids d'un gen. Segons el tipus d'alteració que tingui la seqüència de nucleòtids, poden ser mutacions per substitució de bases, mutacions segons l'efecte en la seqüència de la proteïna i mutacions per pèrdua o inserció de nucleòtids.

1. Mutacions per substitució de bases: són canvis d'una base per una altra. Com que hi ha dos tipus de bases, les púriques (A i G) i les pirimidíniques (T i C), es distingeixen dos tipus de substitucions de bases:

-Transicions: substitucions d'una purina per una altra, o d'una pirimidina per una altra.

-Transversions: substitucions d'una purina per una pirimidina, o a l'inrevés.

Les substitucions provoquen alteració d'un únic triplet de nucleòtids. Només són el 20% de les mutacions gèniques espontànies.

2. Mutacions segons l'efecte en la seqüència de la proteïna

En funció de l'efecte que provoca el canvi nucleotídic en la seqüència de la proteïna podem classificar les mutacions en tres tipus:

Mutacions sinònimes: són mutacions en les quals es produeix un canvi d'un nucleòtid però no hi ha un canvi d'aminoàcid.

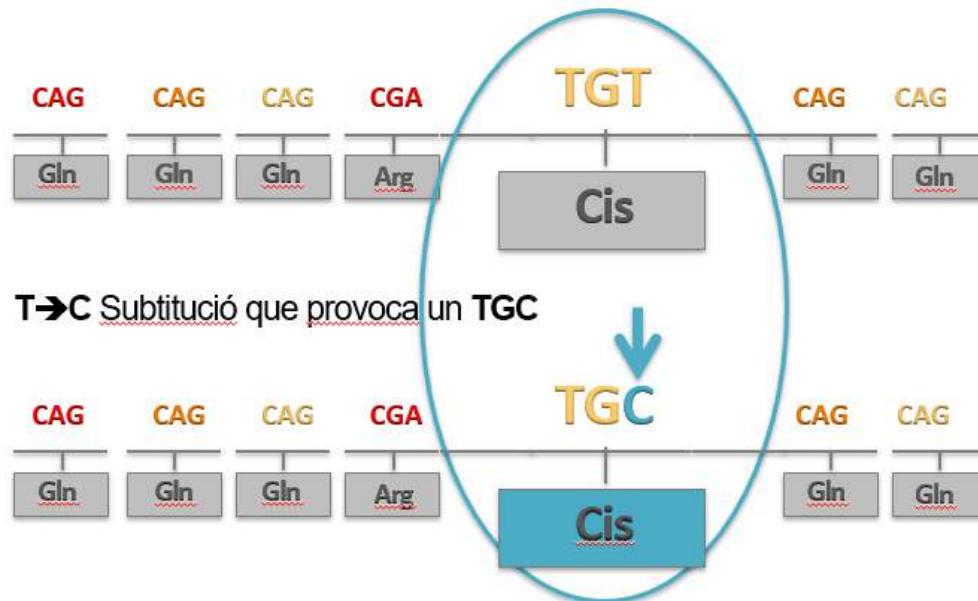


Figura 9: (Font: IDIBGI, 2017)

Mutacions no sinònimes (missense): són mutacions en les quals es produeix un canvi d'un nucleòtid i aquest canvi produeix un canvi d'aminoàcid.

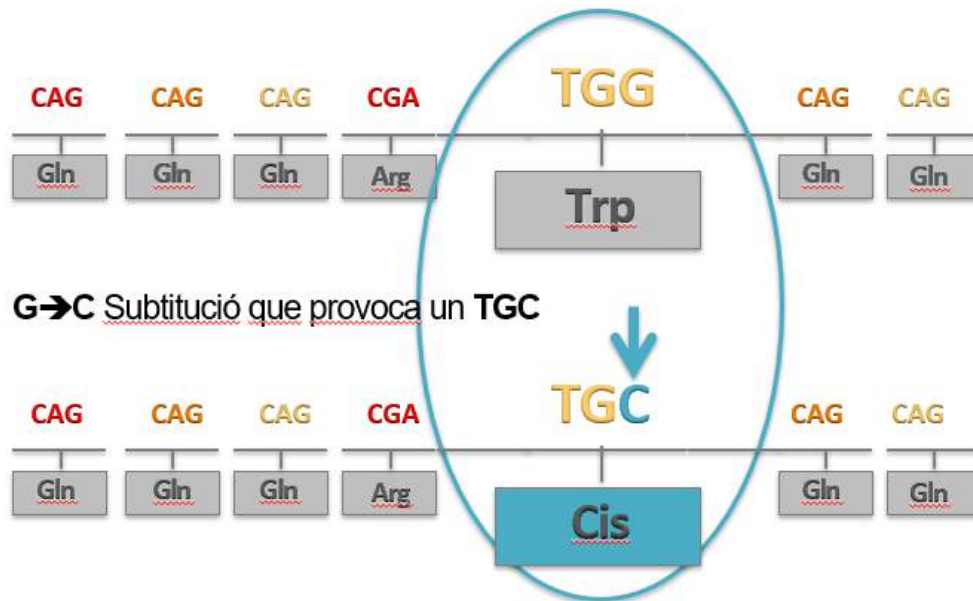


Figura 10: (Font: IDIBGI, 2017)

Mutacions sense sentit (nonsense): són mutacions en les quals es produeix un canvi d'un nucleòtid i aquest canvi provoca un codó stop.

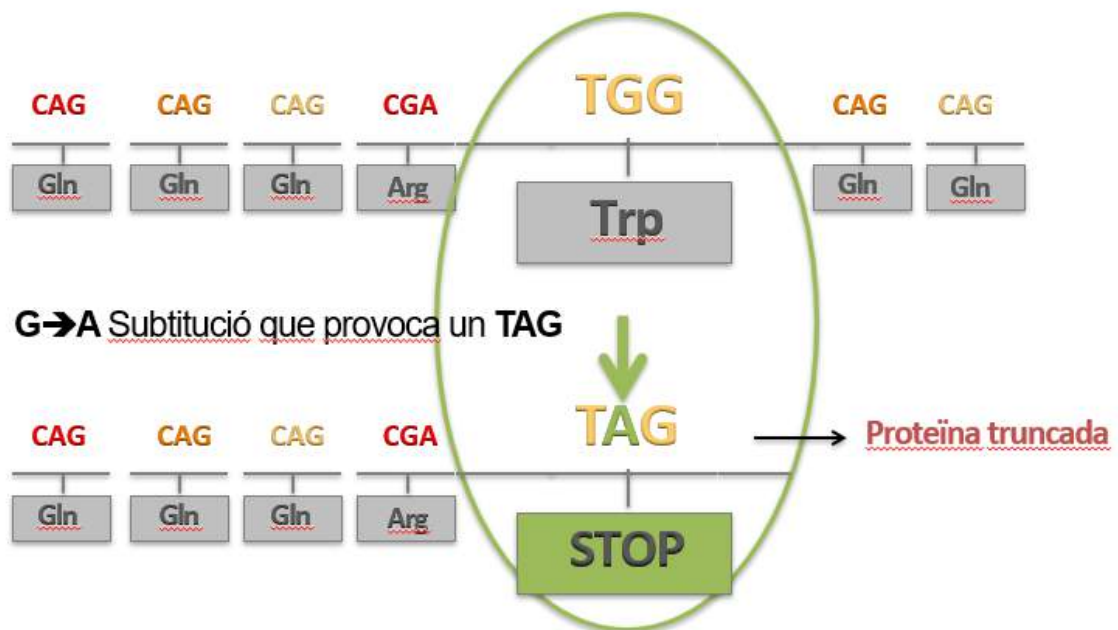


Figura 11. (Font: IDIBGI, 2017)

3. Mutacions per pèrdua o inserció de nucleòtids: aquestes mutacions s'anomenen deleccions o addicions, respectivament.

Com que el missatge genètic es tradueix per codons (triplets de nucleòtids), les deleccions i les addicions (tret que es compensin entre si), produeixen un corriment en la pauta de lectura i, per tant, alteren la traducció de tots els codons següents. (Informació extreta de: Jimeno, A. i altres. (2016). *Biología, Sèrie Observa. Batxillerat 1*. Barcelona: Grup promotor Santillana) i de: Alcalde, M. (2015). *Paper de la Placofilina-2 en la Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret: Bases Genètiques i Mecanismes Moleculars*. (Tesi doctoral). Universitat de Girona. Catalunya).

6. TRANSCRIPCIÓ

Al DNA cel·lular, que en les cèl·lules eucariotes es troba al nucli, es passa d'una seqüència de bases nitrogenades d'un gen a una seqüència de bases nitrogenades complementaries pertanyents a un RNAm. Aquest procés rep el nom de transcripció.

6.1. EL MECANISME DE LA TRANSCRIPCIÓ

La transcripció és el pas d'una seqüència de DNA a una seqüència d'RNA, tant si és RNAm com RNAr o RNAt. Per fer-ho, hi intervenen el DNA, ribonucleòtids, trifosfat de A, G, C i U, les RNA-polimerases (RNAp) i els cofactors. Se'n poden distingir dos mecanismes diferents, segons si es tracta de bacteris o de cèl·lules eucariotes però, com que no treballem en bacteris, només ho explicaré en eucariotes.

La transcripció és la síntesi de RNA a partir d'una seqüència de DNA.

Ho realitzen els enzims RNA-polimerases que utilitzen com a motlle la cadena de DNA.

LA RNA-polimerasa aparella A, G, C i T del DNA amb U, C, G i A del RNA.

Es comença a l'extrem 3' del DNA i es comença formant un extrem 5' del RNA.

Només es transcriu a RNA una de les dues cadenes de DNA:

- La cadena transcrita es diu codificadora.
- La cadena que no es transcriu es diu estabilitzadora.
- Segons el gen la cadena que es transcriu és una o és l'altra.

LA TRANSCRIPCIÓ EN EUKARIOTES

En primer lloc, cal ressaltar que hi intervenen tres tipus de RNA polimerases, segons el tipus d'RNA que s'ha de sintetitzar.

Hi ha regions on el DNA està sempre estès (transcripció contínua).

Intervenien nombroses proteïnes reguladores (factors de transcripció) que interactuen amb la RNA polimerasa.

Els gens estan formats per les regions codificants i no codificants, de manera que sempre cal un procés de maduració en el que s'eliminin les seqüències sense sentit o introns i s'empalmin les seqüències amb sentit o exons.

El DNA està associat a histones formant nucleosomes.

S'ha observat que en gens que es transcriuen contínuament (com els de l'RNAr), el DNA sempre està estès, en d'altres sempre està, aparentment, en forma de nucleosomes, i en d'altres hi ha transició a la forma estesa tan sols durant la transcripció.

La síntesis de mRNA té lloc en 3 etapes:

Iniciació: la RNA-polimerasa II es fixa a la regió del DNA anomenada promotor, que consta de dues zones anomenades seqüències de consens: la CAAT i la TATA. Perquè es pugui fixar l'RNA-polimerasa, abans s'han de fixar en aquestes seqüències unes proteïnes, els factors de transcripció. Tot el conjunt rep el nom de complex d'iniciació de la transcripció.

Elongació o allargament: el procés de síntesi continua en sentit 5' → 3'. Una vegada s'han transcrit uns 30 nucleòtids, s'afegeix a l'extrem 5' una caputxa formada per una metil-guanosina-trifosfat invertida (m⁷Gppp_...).

Un mateix gen pot ser transcrit per diverses RNA-polimerases a la vegada.

Finalització: la finalització de la síntesi de l'RNAm es produeix quan s'arriba a la seqüència TTATTT del DNA. Després hi intervé l'enzim poli-A-polimerasa, que afegeix a l'extrem final 3' un segment de 200 ribonucleòtids d'adenina, l'anomenada cua de poli-A, al transcrit primari o preRNAm, també anomenat RNA heterogeni nuclear (RNAhn).

Un cop sintetitzada la molècula de mRNA, té lloc el procés de maduració

Maduració: la maduració es produeix al nucli i la realitza un enzim anomenat ribonucleoproteïna petita nuclear (RNPpn). Diverses RNPpn s'associen entre sí i amb proteïnes, i formen una estructura gairebé de la mida d'un ribosoma anomenat espliceosoma que és la que separa els introns gràcies al fet que l'RNApn conté unes seqüències que són complementàries de les dels dos extrems dels introns. Quan s'associen, l'intró es corba i es desprèn. A continuació, actuen unes RNA-ligases específiques que uneixen els exons.

L'RNAt i l'RNAr també presenten processos de maduració. En l'RNAt cal destacar l'addició del triplet CCA a l'extrem 3'. La maduració de l'RNAr s'inicia amb l'RNA nucleolar (RNA_n). (Informació extreta de: Jimeno, A, Ugedo, L., Rodríguez, S. (2016). *Biologia, Sèrie Observa. Batxillerat 1*. Barcelona: Grup promotor Santillana).

7. TRADUCCIÓ

7.1. EI CODI GENÈTIC

El codi genètic és el conjunt de regles mitjançant les quals la informació codificada en les seqüències de nucleòtids de RNAm es tradueix a seqüències d'aminoàcids (proteïnes).

Existeixen varis tipus d'RNA, però el que ens interessa és el RNA missatger (RNAm), imprescindible en el procés de transcripció.

L'RNAm és un polímer lineal de quatre nucleòtids diferents i les proteïnes són polímers de 20 aminoàcids. Les cèl·lules descodifiquen l'RNA llegint els seus nucleòtids en grups de tres (triplet o codó), 3 nucleòtids del RNAm determinen

un aminoàcid, per això hi ha 64 combinacions possibles de tres nucleòtids ($4^3 = 64$). L'ordre dels triplets determina la seqüència d'aminoàcids d'una proteïna (Ramos Muntada, M. (2017, desembre 3). Desxifrant el codi genètic. *All you need is biology*).

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Figura 12: Codi genètic del RNA (Font:lucasbrouwers.nl)

Característiques del codi genètic:

Només hi ha un codó d'inici, AUG, que codifica per l'aminoàcid metionina. La posició d'aquest codó d'inici determina el punt on comença la traducció de l'RNAm i el seu marc de lectura.

Hi ha tres codons de stop: UAA, UAG i UGA que no codifiquen per cap aminoàcid. Aquests codons fan que el polipèptid (polímer format per cadenes llargues d'aminoàcids) s'alliberi del ribosoma, lloc on ocorre la traducció.

És degenerat: existeixen més triplets (64) que aminoàcids (20), això significa que hi ha varis triplets per un mateix aminoàcid (codons sinònims). Per exemple, la prolina és codificada pels triplets CCU, CCC, CCA i CCG.

No presenta imperfeccions ja que cada codó només codifica un aminoàcid.

No hi ha encavalcaments ja que els triplets es disposen de manera lineal i contínua, sense espais en blanc entre ells.

No és ambigu ja que cada triplet té el seu propi significat. Tots els triplets tenen sentit, o bé codifiquen un aminoàcid en particular o bé indiquen final de lectura. La majoria dels aminoàcids es codifiquen almenys per dos codons. La metionina i el triptòfan són els únics aminoàcids que es codifiquen només per un codó.

És unidireccional: tots els triplets es llegeixen en sentit 5'-3'.

És universal: gairebé tots els éssers vius l'utilitzen (a excepció d'alguns protozous i els mitocondris). Això és important perquè un codi genètic compartit per tan diversos organismes proporciona una important evidència d'un origen comú de la vida a la Terra (Máxima Uriarte, J. (2019, agosto 7). 10 características del Código Genético. *Características.co.*).

7.2.EL MECANISME DE TRADUCCIÓ

La traducció és el procés de síntesi de proteïnes en què la informació genètica codificada en l'RNAm es tradueix en una seqüència d'aminoàcids en una cadena polipeptídica. Es produeix en una de les dues ubicacions:

- Ribosomes lliures en el citosol de proteïnes intracel·lulars.
- Ribosomes units per ER (és a dir, ER rugosos) per a proteïnes extracel·lulars.

Estructura del ribosoma:

Els ribosomes estan compostos per proteïnes i RNA ribosòmic (RNAr)

Consten de dues subunitats:

La subunitat petita conté un lloc d'unió a l'RNAm

La subunitat gran conté tres llocs d'unió d'RNAt: un lloc aminacil (A), un lloc de peptidil (P) i un lloc de sortida (E).

Els ribosomes poden trobar-se lliurement en el citosol o unir-se a l'ER rugosa (en eucariotes).

El procés de traducció es divideix en tres fases: iniciació de la síntesi, elongació o allargament de la cadena polipeptídica i finalització de la síntesi.

Iniciació de la síntesi

L'RNAm s'uneix a una subunitat ribosòmica petita gràcies a una seqüència inicial anomenada regió líder, que no es tradueix, en la qual hi ha uns deu nucleòtids complementaris a l'RNA ribosòmic.

Després, la subunitat petita es mou respecte a l'RNAm fins que troba el codó d'inici (5'... AUG...3'). Aquest codó d'inici s'uneix a un aminoacil-RNAt iniciador específic, que és complementari (3'...UAC...5') i que s'anomena anticodó i en les cèl·lules procariotes porta l'aminoàcid metionina.

S'estableixen enllaços d'hidrogen entre el codó (5'...AUG...3') i l'anticodó (3'...UAC...5'). A aquest grup de molècules s'hi uneix la subunitat ribosòmica gran i es forma el complex ribosòmic o complex actiu. Aquest procés necessita energia, que és aportada per un GTP i unes proteïnes anomenades factors d'iniciació.

En el complex ribosòmic es diferencien tres llocs d'unió:

- El centre peptidil o centre P, on se situa el primer aminoacil-RNAt.
- El centre acceptor o centre A, on se situen els aminoacils-RNAt següents.
- El centre de sortida o centre E, on se situa l'RNAt sense aminoàcid.

La iniciació de la síntesi presenta algunes diferències entre procariotes i eucariotes.

En les cèl·lules procariotes l'RNAm no experimenta maduració. Fins i tot abans d'acabar-se la síntesi ja comença a traduir.

En les eucariotes, l'RNAm se sintetitza al nucli i abans de sortir experimenta un procés de maduració. A l'extrem 5' porta una caputxa constituïda per una metilguanosa-trifosfat, que permet que els ribosomes la identifiquin, i a continuació es troba l'anomenada regió líder, que no es tradueix.

L'RNAm, si és prou llarg, pot ser traduït per uns quants ribosomes alhora, un rere l'altre. Si s'examinen amb el microscopi electrònic, s'observa una mena de rosari de ribosomes que s'anomena poliribosoma.

Elongació o allargament de la cadena polipeptídica

El primer triplet que es tradueix és l'AUG, que correspon a l'aminoàcid metionina. Al centre A arriba el segon aminoacil-RNAt. El radical carboxil de l'aminoàcid iniciador (metionina) s'uneix amb el radical amino de l'aminoàcid següent per mitjà d'un enllaç peptídic. L'enzim peptidiltransferasa catalitza aquesta unió. Així doncs, el centre P queda ocupat per un RNAt sense aminoàcid.

Aleshores es produeix la translocació ribosòmica i aquest RNAt passa a ocupar el centre E i surt del ribosoma. El dipeptidil-RNAt ara queda al centre P i el centre acceptor A queda lliure en espera d'un nou aminoacil-RNAt.

Aquest procés necessita energia, que aporta un GTP, unes proteïnes anomenades factors d'elongació, i es repeteix en cada un dels codons següents. En els procarïotes es tradueix un codó per dècima de segon.

Finalització de la síntesi

El final de la síntesi està determinat pels anomenats triplets sense sentit, que són tres: UAA, UAG i UGA (no tenen anticodó complementari). En canvi, són reconeguts pels factors proteïcs d'alliberació (FR), que necessiten consumir GTP per actuar. S'instal·len sobre el centre A i provoquen que la peptidiltransferasa faci interaccionar el darrer grup $-COOH$ amb l'aigua, amb la qual cosa la cadena polipeptídica queda alliberada. A continuació, l'RNAm i les dues subunitats ribosòmiques se separen. (Informació extreta de: Jimeno, A, Ugedo, L., Rodríguez, S. (2016). *Biologia, Sèrie Observa. Batxillerat 1*. Barcelona: Grup promotor Santillana).

MARC PRÀCTIC

8. PLANTEJAMENT DE LA RECERCA

S'estudiaran dues famílies afectades per la AC en les quals es pretén identificar la variant genètica que causa la malaltia, així com identificar quins són els membres de la família que són portadors i que, per tant, estan en risc de patir una mort sobtada.

Per fer-ho es realitzarà una anàlisi genètica de tots aquells gens associats a la AC.

9. TÈCNiques D'INVESTIGACIÓ

9.1. PROVA PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica de duplicació del DNA *in vitro* que s'utilitza per amplificar una regió concreta del DNA patró i, d'aquesta manera, s'obtenen milions de còpies del fragment d'interès.

La PCR utilitza l'habilitat de la DNAPol, un enzim capaç de sintetitzar una nova cadena de DNA complementària a la cadena de DNA patró. La DNAPol ja participa en la duplicació del DNA *in vivo* de les cèl·lules, però s'obté de manera sintètica per utilitzar-la en la PCR *in vitro*.

D'altra banda, ja que la DNAPol només pot afegir nucleòtids al grup OH de l'extrem 3' d'una cadena preexistent, perquè la reacció pugui tenir lloc es necessita un encebador (o *primer*, en anglès, que serà el terme utilitzat a partir d'ara) específic, és a dir un fragment complementari al DNA patró on es col·locarà la DNAPol per afegir els nucleòtids. Aquest requisit fa possible que

es pugui delimitar la regió específica del DNA patró que es vol seqüenciar, en el nostre cas, hem dissenyat 4 parells de *primers*, en el cas de l'exó 5 un *forward* intró 4-5 i un *reverse* a l'intró 5-6; en el cas de l'exó 11 un *forward* a l'intró 10-11 i un *reverse* a l'intró 11-12. Els *forward* son encarregats de la replicació en direcció 5' a 3' i els *reverse* son iniciadors de la replicació en direcció 3' a 5'.

Protocol de preparació de la PCR

El material necessari per dur a terme la PCR és: Aigua lliure de nucleases, la DNApol, els *primers* d'interès, el DNA d'interès, dNTPs, i un *buffer* específic per tal que la reacció pugui tenir lloc.

Primer es prepara la mix per la PCR, la quantitat d'aquests reactius dependrà del nombre de reaccions (N) que es realitzaran . Per cada reacció es necessiten 8,1 ul d'H₂O, 1,25 ul buffer, 1 ul de dNTPs i 0,15 ul de Taq polimerasa. Un cop preparada la mix es divideix el volum total en contingut per el nombre de "pous" (N) que es necessiten. El resultat ha de ser 10,5 ul per tal que quan s'afegeixi 0,5ul de DNA del pacient i 1ul del *primer* (forward + reverse) corresponent, el volum de la mostra sigui 12,5ul. Finalment es col·loca la placa al termociclador utilitzant el programa PCR_60.

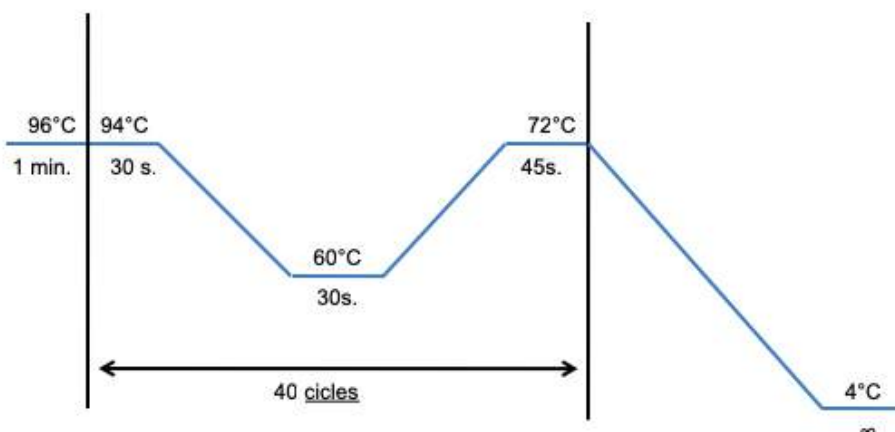


Figura 13: Cicle PCR que passa en el termociclador. (Font: creació pròpia,2019)

La reacció es realitzarà en un termociclador i es basa en un perfil de canvis de temperatura que es repetirà de manera cíclica:

1. Desnaturalització: amb una temperatura de 90 graus aconseguim trencar els ponts d'hidrogen que uneixen les dues cadenes de la doble hèlix de DNA i separar-les.
2. Refredament: els *primers* s'uneixen al seu fragment complementari de la cadena DNA patró a una temperatura de 60 graus.
3. Elongació: la DNA pol necessita una temperatura de 72 graus per actuar i continuar afegint nucleòtids complementaris al DNA patró seguint l'inici marcat pel *primer*.

Aquests tres passos formen un cicle que es repeteix una sèrie de vegades, en el nostre cas són 40 cicles. L'amplificació és exponencial per a cada cicle, això significa que el DNA sintetitzat prèviament serveix com a motlle pels següents, i d'aquesta manera el nombre de molècules de DNA es duplica en cada cicle.

9.2.GEL D'ELECTROFORESIS AGAROSA

L'electroforesi en gel d'agarosa s'utilitza per comprovar que els *primers* funcionen correctament i s'ha amplificat la regió del DNA abans de seguir endavant amb la seqüenciació. Es tracta d'una tècnica on la corrent elèctrica impulsa els fragments de DNA o també altres macromolècules com RNA i proteïnes, a través de la matriu de gel fent que els fragments se separin segons la seva mida. Els fragments de DNA presenten una càrrega negativa i, per tant, es desplacen des del pol negatiu fins al pol positiu. Així doncs, els fragments més petits travessen més ràpid el gel i els fragments de la mateixa longitud formen una banda que, com que el gel conté el marcador de DNA midori green, es pot visualitzar a través d'un equip específic per veure amb llum UV i obtenir-ne una fotografia.

Procediment per a la preparació del gel d'agarosa

En primer lloc es prepara el gel a partir de tampó TBE, agarosa i midori green:

- Afegir 40ml de TBE i 0,48g d'agarosa en un pot de vidre.

- Escalfar la mescla al microones just fins el moment en què comença a bullir, d'aquesta manera ens assegurem que l'agarosa s'ha dissolt completament.
- Deixar refredar el pot de vidre dins d'aigua mentre es barreja el contingut amb l'ajuda d'un agitador magnètic.
- Afegir 1ul de midori green, un marcador que es col·loca entre les bases nitrogenades del DNA.
- Abocar la preparació a la cubeta petita amb la reixa que deixarà els forats per a 11 "pous".
- Esperar 15 minuts mentre el gel solidifica. Es pot comprovar quan està a punt tocant una vora amb una punta de pipeta i veient que aquesta no s'enfonsa.

Protocol per carregar les mostres al gel

Un cop el gel ha solidificat és el moment de carregar les mostres de la PCR:

- Treure la reixa i col·locar el gel a l'aparell d'electroforesi.
- Per cada mostra, afegir 2ul de marcador *loading buffer* amb l'ajuda de la pipeta, procurant que no es formin bombolles d'aire.
- Col·locar els 6ul de preparació dins dels "pous" del gel amb molt de compte i a poc a poc, intentant arribar al fons i que no s'escapi mostra.
- Repetir el procés anterior amb cada un dels "pous" de la placa de la PCR.
- Tapar l'aparell d'electroforesi i programar-lo amb un voltatge de 130V durant uns 20min.

Finalment, un cop observem que la mostra ha corregut i s'ha marcat les bandes del color blau del *loading buffer*, retirem el gel i realitzem un fotografia utilitzant l'equip de llum ultraviolada per observar les bandes obtingudes amb detall.

9.3.EXOSAP

L'Exosap permet eliminar els fragments petits que queden a la reacció de la PCR, com per exemple els *primers* i els dNTPs restants. Els avantatges d'aquest mètode són que, en primer lloc, només tarda 30 minuts per fer la purificació dels productes de PCR i presenta un 100% de recuperació i

purificació dels productes menors de 100 pb i majors a 20 pb, sense perdre mostra ni haver d'utilitzar altres tècniques per completar el procés.

Procediment per a la preparació de l'Exosap

La preparació és relativament senzilla perquè només cal afegir 1ul d'Exosap i 2,5ul de la mostra resultant de la PCR a cada "pou". La placa es tapa amb una làmina d'alumini adhesiva i s'incuba al termociclador seguint el programa anomenat EXOSAP. Aquest programa, primer manté les mostres a 37 graus centígrads durant 15 minuts, després les escalfa a 80 graus centígrads durant 15 minuts i, finalment, les manté a 4 graus centígrads fins que es retira la placa.

9.4.BIGDYE

La *BigDye* és la tècnica utilitzada per preparar les mostres per a la seqüenciació. S'utilitzen una combinació de desoxiribonucleòtids (dNTPs) i dideoxinucleòtids o ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), cada un marcat amb un fluoròfor de diferent. Els ddNTPs actuen amb a terminadors de la cadena ja que, a diferència dels desoxiribonucleòtids (dNTPs), no tenen un grup hidroxil en el carboni 3' i, per tant, no permeten que un nou nucleòtid s'afegeixi a la cadena. D'aquesta manera obtenim múltiples còpies del DNA d'interès en fragments de diferents longituds, depenent del punt on s'incorpora el ddNTP terminador.

Procediment

Primer es prepara la mix per la reacció de *BigDye* amb H₂O lliure de nucleases, *BigDye* i *buffer*. La quantitat dels reactius dependrà del nombre de "pous"(N) que utilitzem a la placa. Per cada "pou" es necessita 1,25ul d'H₂O, 0,75ul de *buffer* i 0,5ul de *BigDye*, i un cop la mix està preparada dividim el volum total per nombre de "pous". Llavors s'afegeix 1ul de la mostra de DNA obtinguda de l'Exosap i 0,5 ul del *primer* corresponent, ja sigui *forward* o bé *reverse* per separat, segons la planificació de la placa que fem prèviament a la preparació. Així doncs, el volum final de mostra a cada "pou" és de 4ul. Per últim, la placa es col·loca al termociclador seleccionant el programa BIGDYE.

La reacció en el termociclador es produeix segons un cicle de canvis de temperatura que es repeteix fins a 25 vegades:

- 96 °C durant 10 segons – Desnaturalització del DNA
- 50 °C durant 5 segons – Unió del *primer*
- 60 °C durant 4 minuts – Elongació

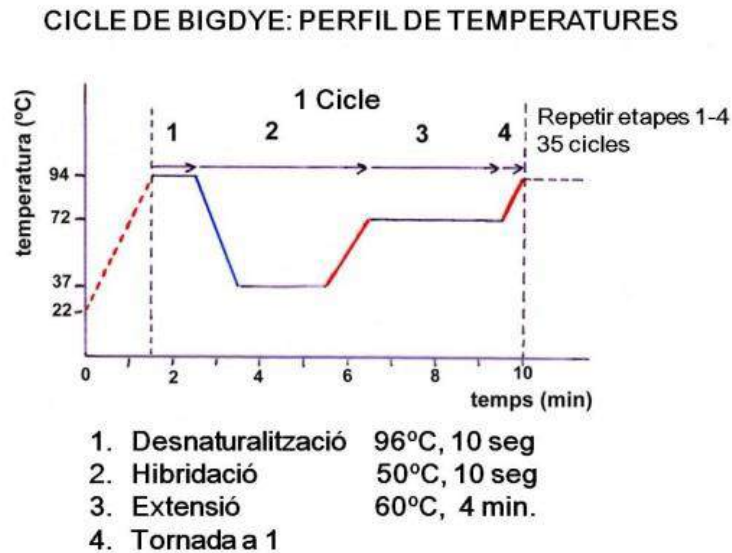


Figura 14: Cicle de Bigdye que passa en el termociclador. (Font: IDIBGI, 2017)

Aquest procés té una durada aproximada de dues hores i, un cop ha finalitzat, el mateix termociclador manté la mostra a 4 graus fins que es retira la placa.

9.5.PRECIPITACIÓ

La precipitació és l'última tècnica que cal dur a terme abans de seqüenciar el DNA. Serveix per netejar i purificar la mostra de DNA fent que aquesta precipiti a la part de baix del "pou" on arribaran els capil·lars del seqüenciador.

Procediment:

- Afegir 70ul d'etanol acetat (guardat a la nevera a 4 graus) a cada "pou".
- Tapar la placa amb un fil transparent i deixar reposar durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar la placa a 2000rpm durant 45minuts.
- Retirar el líquid restant amb un cop sec a la pica.
- Col·locar la placa boca avall sobre un paper absorbent i centrifugar amb un spin (tant sols 5 o 6 segons fins arribar a les 1000rpm).

- Deixar assecar la placa durant 10 minuts a temperatura ambient
- Tapar la placa amb fil transparent i centrifugar a 2000rpm durant 10minuts.
- Afegir 120ul d'etanol 70% a cada "pou".
- Retirar el líquid restant amb un cop sec a la pica.
- Col·locar la placa boca avall sobre paper absorbent i centrifugar un spin.
- Deixar assecar la placa durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 10ul de formamida (guardada a -20 graus centígrads) a tots el "pous" fins a completar la columna, encara que estiguin buits. El nombre de columnes plenes sempre ha de ser parell perquè el seqüenciador té 16 capil·lars.
- Posar la placa al termociclador utilitzant el programa INCUBATION_95 sense tancar la tapa. El programa té una durada de 7 minuts a 95°C.

Un cop s'acaba de precipitar la mostra ja està a punt per portar-la a seqüenciar.

9.6.SEQÜENCIACIÓ SANGER

La seqüenciació de DNA és el procés que determina la seqüència de nucleòtids (A, T, C, G) d'un fragment de DNA. La seqüenciació Sanger permet seqüenciar regions del DNA de fins a 900 pb. Prèviament, amb la reacció de BigDye, s'han obtingut moltes còpies de diferents longituds del DNA d'interès, totes elles amb un ddNTP fluorescent que actua com a terminador de cadena.

En el seqüenciador, els fragments de DNA passen a través dels capil·lars i, mitjançant un procés d'electroforesi, s'il·luminen amb un làser que detecta el pigment fluorescent dels nucleòtids i, per tant, ens permet determinar de quina base es tracta. El fragment més petit, que acaba just en un nucleòtid després del primer, serà el primer en passar pel làser, seguit pel pròxim fragment més petit, de dos nucleòtids després del primer, i així successivament. D'aquesta manera es pot conèixer la seqüència nucleòtid a nucleòtid. Les dades obtingudes es mostren a través d'una sèrie de pics en el cromatograma.

(Informació proporcionada per IDIBGI i Bermejo, A. (2017). *El gen SCN5A i la mort sobtada cardíaca*. (TDR). Institut Josep Bruguat. Catalunya).

10.PROGRAMES D'ANÀLISI I BASES DE DADES

SEQUENCING ANALYSIS 5.3.1

Sequencing analysis és un programa informàtic que, un cop feta la seqüenciació del DNA, permet analitzar les dades obtingudes.

Aquest programa ens proporciona una seqüència on a cada nucleòtid li correspon un color. Diem que la seqüència és neta quan observem de manera clara tots els pics i diem que la seqüència és bruta quan tenim dificultat a l'hora de fer una bona lectura.

Podem identificar mutacions en la seqüència que ens mostra el programa quan trobem un doble pic solapat.

Observem la mutació com a un doble pic perquè es troba en heterozigosi. És a dir, els dos al·lels són diferents i per això els hi correspon dos pics diferents.

ENSEMBL

L'ensembl és una base de dades pública que es va crear l'any 1999 després del Projecte Genoma humà.

En aquesta base de dades es recullen genomes de diferents espècies i s'utilitza per comparar la seqüència obtinguda al laboratori amb la seqüència consens publicada.

ARVCDATABASE

L'ARVCDATABASE és una base de dades pública que serveix per mirar si la mutació dels pacients estudiats ja s'havia trobat anteriorment.

11. ANÀLISI DE LES SEQÜÈNCIES

11.1. ELECTROFOROGRAMA FAMILIA 1

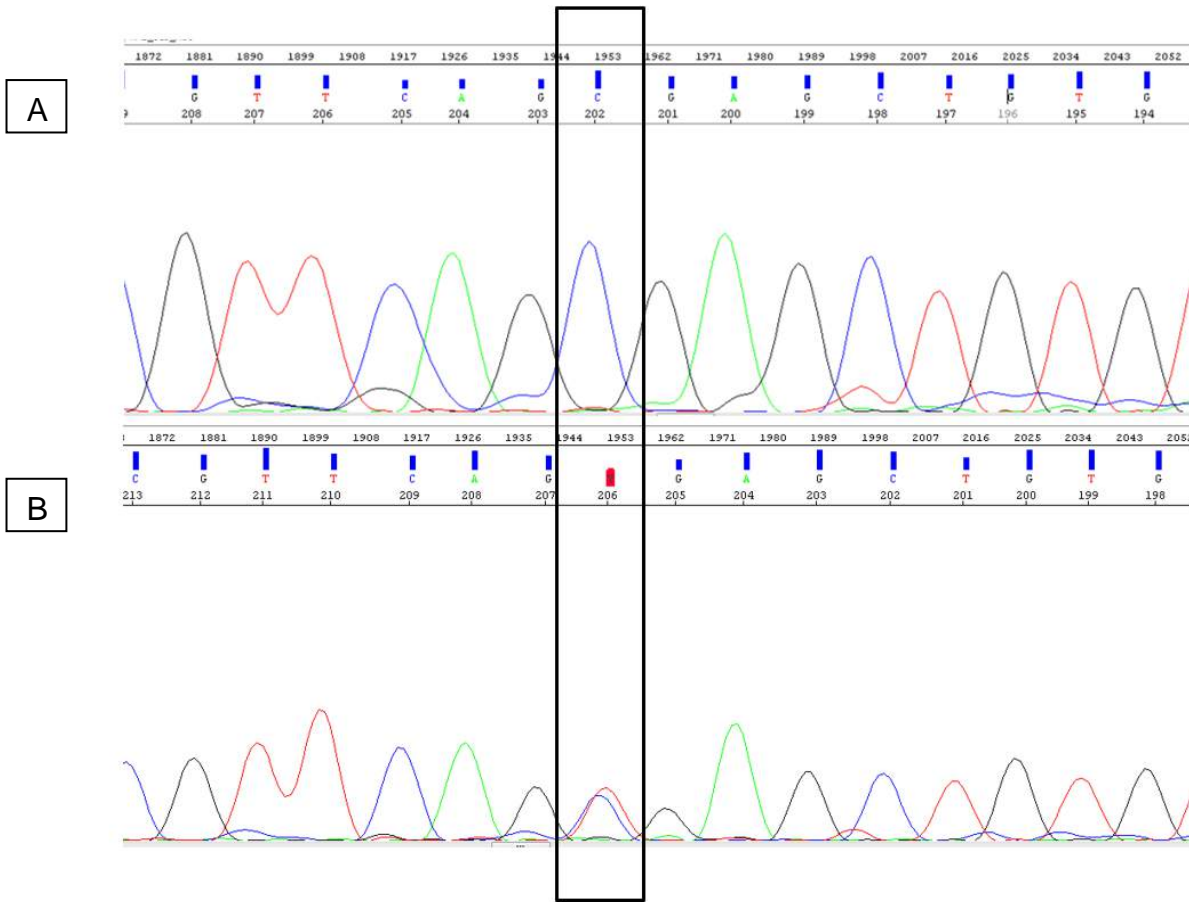


Figura15: A- Electroforograma individu sa per gen *PKP2* exó 5.

B- Electroforograma corresponent a individu afectat per regió *PKP2* exó 5 portador de la variant *PKP2* c.1237 C>T. (Font: IDIBGI,2019)

```

1321 AAAAGTTCAGAATGAAGACGTTCAAGCAGCTGTGTGTGGGGCCTTGAGAACTTAGTATT 1380
1212 AAAAGTTCAGAATGAAGACGTTCAAGCAGCTGTGTGTGGGGCCTTGAGAACTTAGTATT 1271
404 --K--V--Q--N--E--D--V--Q--R--A--V--C--G--A--L--R--N--L--V--F 424
    
```



Figura 16: És la seqüència consens de DNA i proteïna per la regió d'interès del gen *PKP2* (Font: ensembl, 2019)

11.2.ELECTROFOROGRAMA FAMILIA 2

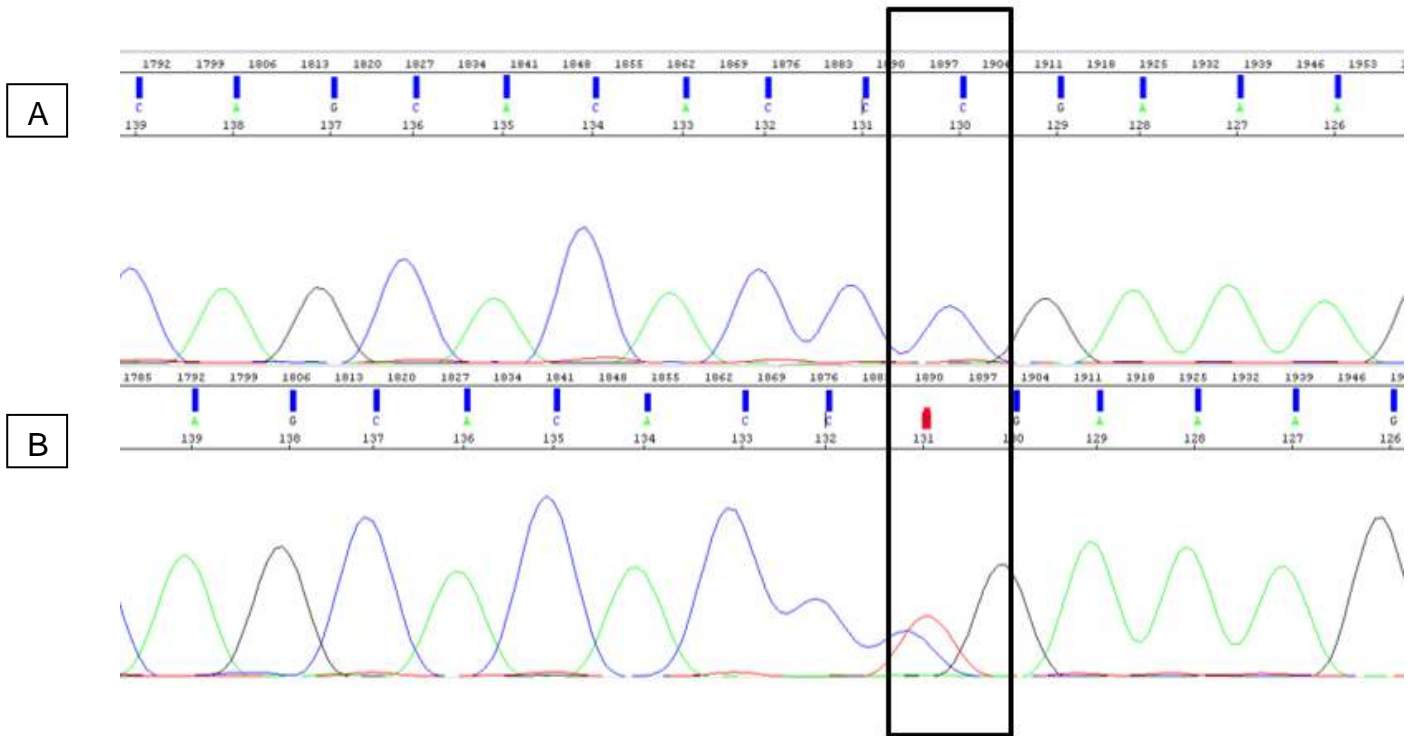


Figura 17: A- Electroforograma d'un individu sa per gen *PKP2* exó 11.

B- Electroforograma corresponent a individu afectat per regió *PKP2* exó 11 portador de la variant *PKP2* c.2203 C>T. p. R735X. (Font: IDIBGI, 2019)

S**RYSBR R R K * K R** K * *** RY R Y HR
 2221 GCACACCCGAAAGATGCTGCAAGTTGGTGACCCAGTGTGAAAAAGACAGCCATCTCGCT 2280
 2196 GCACACCCGAAAGATGCTGCAAGTTGGTGACCCAGTGTGAAAAAGACAGCCATCTCGCT 2255
 732 --H--T--R--K--M--L--H--V--G--D--P--S--V--K--K--T--A--I--S--L 752



Figura 18: és la seqüència consens de DNA i proteïna per la regió d'interès del gen *PKP2*. (Font: ensembl,2019)

11.3. VALORACIÓ VARIANTS

En primer lloc, a l'hora de fer una bona valoració de les nostres variants agafem les seqüències genètiques dels individus estudiats i les comparem amb les seqüències de referència que es troben a la base de dades genètiques ensembl (font: <https://www.ensembl.org/index.html>)

De totes les variants que trobem en els nostres pacients, consultem la freqüència que té aquella variant en la població general. Descartem totes aquelles variants comunes en la població general, que són totes aquelles que tenen una freqüència al·lèlica superior a l'1%. Les variants rares identificades són totes aquelles que presenten una freqüència inferior a l'1%; aquestes últimes seran les que considerarem possiblement patogèniques i per tant, les estudiarem amb més deteniment.

Un cop feta aquesta selecció, mirarem a la base de dades *arvcdatabase* (<https://molgenis136.gcc.rug.nl/>) si aquesta variant havia estat associada prèviament a AC.

12. RESULTATS

12.1. ESTUDI FAMILIAR

Una vegada hem analitzat els individus d'una família i sabem quins són portadors, quins estan afectats i quins estan sans, aleshores creem un pedigrí.

Un pedigrí és un document que analitza les relacions genealògiques d'un ésser viu per tal de determinar com una certa característica s'hereta i es manifesta.

Es representa amb un diagrama de pedigrí que és un gràfic semblant a un arbre genealògic on es detalla, mitjançant una simbologia consensuada, l'aparició d'un determinat tret o malaltia al llarg de diverses generacions d'una família, indicant els individus que manifesten la característica i els que són portadors.

LLEGENDA PEDIGRÍ



Home sa



Dona sana



Home no analitzat



Dona no analitzada



Home mort



Dona morta



Home afectat



Dona afectada



Provant



Home portador



Dona portadora

FAMILIA 1 – *PKP2* R-413X

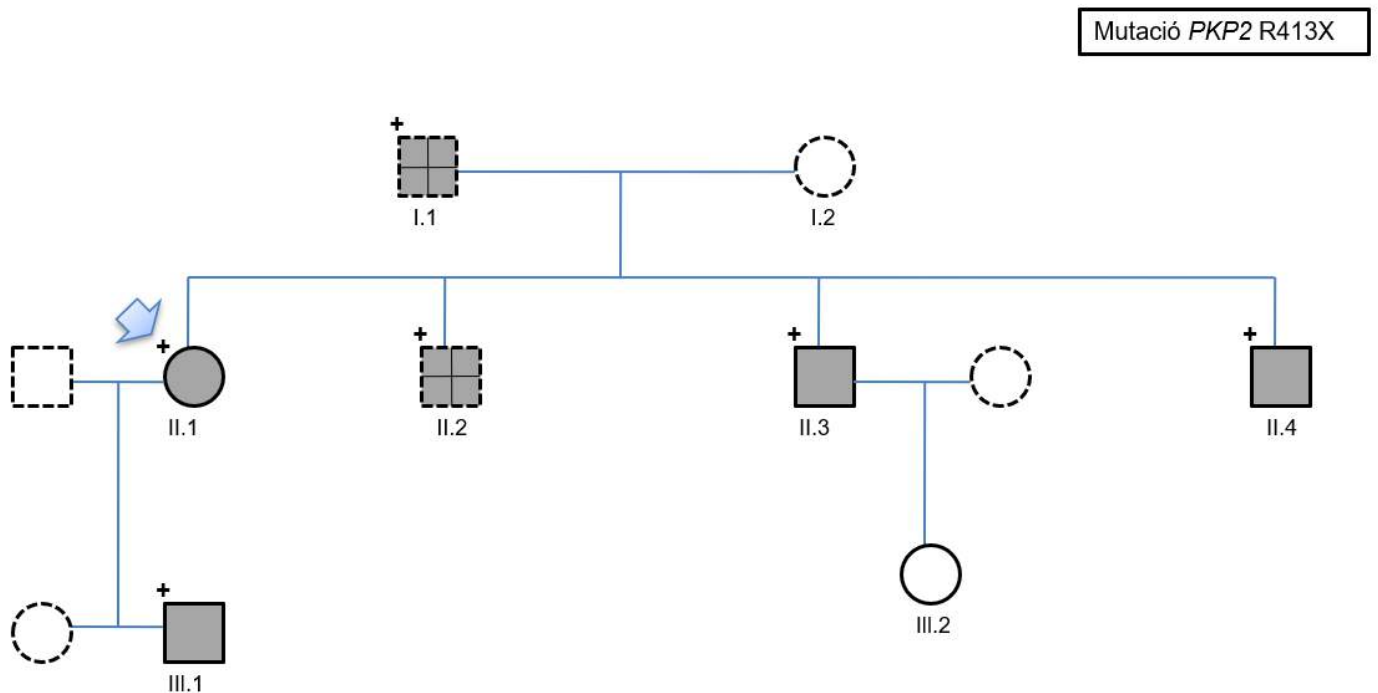


Figura 19: Pedigrí família 1 (Font: Creació pròpia)

	NÚM. FAMILIAR	PORTADOR	AFFECTAT	EDAT	SEXE	
FAMILIA 1 R. 413X	II.1	Sí	Sí	46	femení	provant
	II.3	Sí	Sí	35	masculí	
	II.4	Sí	Sí	29	masculí	
	III.1	Sí	Sí	15	masculí	
	III.2	No	No	2	femení	

Taula 1: Informació família 1 (Font: Creació pròpia)

La pacient II.1 és una dona de 46 anys i és la provant de la família 1. Aquesta dona presenta la mutació 413X en el gen *PKP2*; aquesta mutació ha estat identificada en 3 dels 4 familiars analitzats (II.3, II.4 i III.1). Segons la informació que tenim, l'individu I.1, pare del pacient (II.1), va ser el primer afectat i portador de la mutació causant de la malaltia en aquesta família; es va realitzar l'estudi genètic dels germans del pacient provant i es van identificar tots els individus com a positius. Així doncs, en aquesta família tots els quatre fills presenten

manifestacions clíniques de la malaltia. A la tercera generació ens trobem que, dels dos individus analitzats, un (III.1) té la mutació i l'altre no.

Es tracta d'una mutació potencialment severa degut a la introducció d'un codó stop. Diem que segueix un patró d'herència autosòmic dominant ja que els individus afectats són heterozigots.

FAMILIA 2 – *PKP2* R.735X

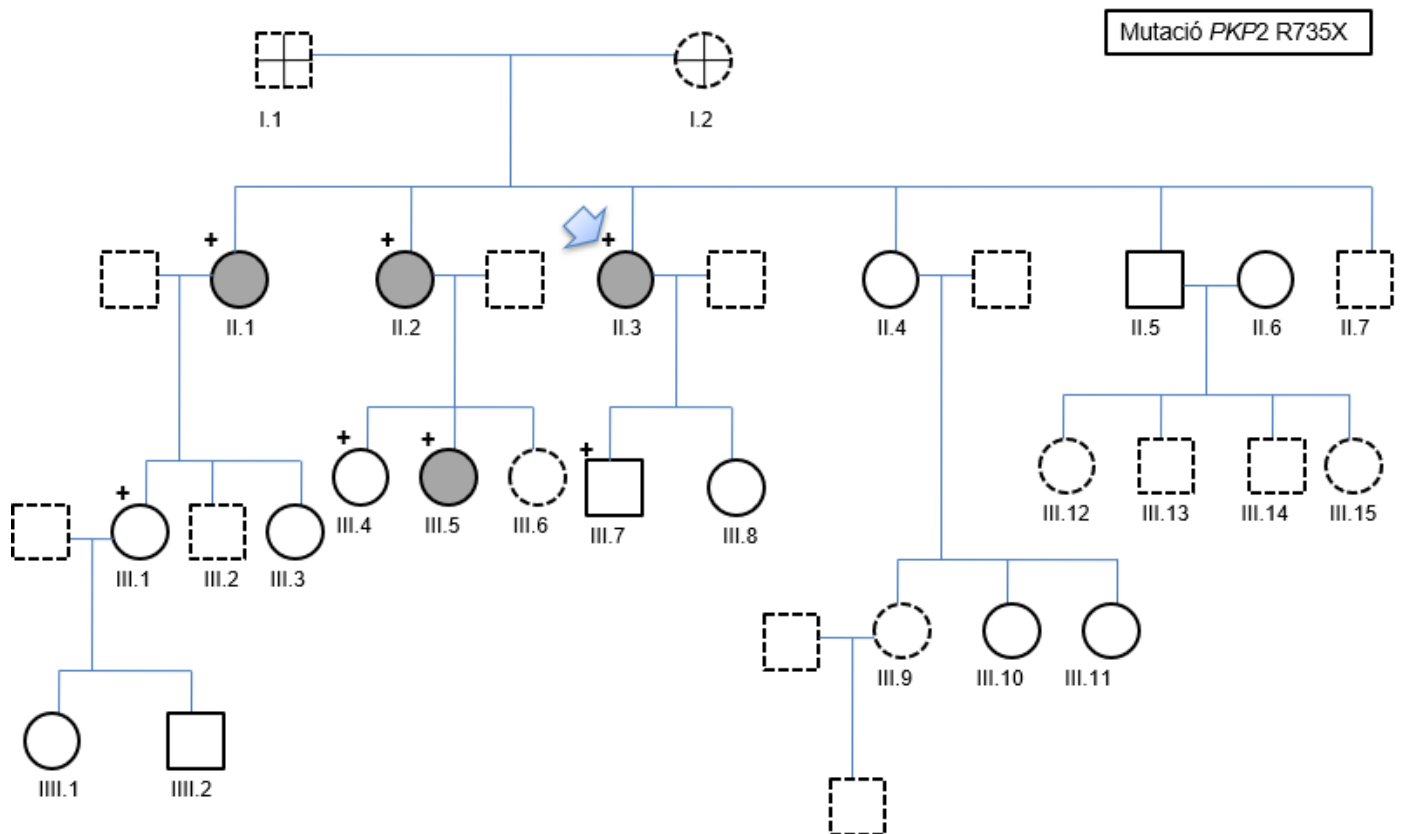


Figura 20: Pedigrí família 2 (Font: Creació pròpia)

	NÚM. FAMILIAR	PORTADOR	AFFECTAT	EDAT	SEXE	
FAMILIA 2 R. 735X	II.1	Sí	Sí	58	femení	provant
	II.2	Sí	Sí	55	femení	
	II.3	Sí	Sí	52	femení	
	II.4	No	No	50	femení	
	II.5	No	No	45	masculí	
	II.6	No	No		femení	
	III.1	Sí	No	36	femení	
	III.3	No	No	33	femení	
	III.4	Sí	No	27	femení	
	III.5	Sí	Sí	25	femení	
	III.7	Sí	No	20	masculí	
	III.8	No	No	17	femení	
	III.10	No	No		femení	
	III.11	No	No		femení	
	IIII.1	No	No		femení	
	IIII.2	No	No		masculí	

Taula 2: informació família 2 (Font: Creació pròpia)

La pacient (II.3) és una dona de 52 anys i és la provant de la família 2. Presenta una mutació 735X en el gen *PKP2*, aquesta mutació ha estat identificada en 3 dels 15 familiars analitzats (II.1, II.2 i III.5). Segons la informació que tenim, un cop fet l'estudi genètic de quatre dels cinc germans de la provant, dos són portadors i tenen la malaltia (II.1 i II.2) i els altres dos estan sans (II.4 i II.5). No podem saber si el pare o la mare de la provant eren portadors o estaven afectats perquè no hi ha l'anàlisi fet i són morts, per tant no sabem si la provant és la primera portadora.

A la tercera generació observem que, de 17 individus, se n'han analitzat 8, i d'aquests 8 hi ha 4 persones que ni són portadores ni estan afectades, 3 individus portadors asimptomàtics (III.1, III.4 i III.7) i només una persona portadora simptomàtica (III.5) que li prové de la branca materna; és a dir que la persona portadora i afectada representa 1/8 del total de persones analitzades d'aquesta tercera generació. A la quarta generació s'han analitzat 2 de les 3 persones i cap d'elles és portadora ni està afectada. Cal fer constar que l'individu III.5 que és simptomàtic no té descendència.

Es tracta d'una mutació potencialment severa degut a la introducció d'un codó stop. Diem que segueix un patró d'herència autosòmic dominant ja que els individus afectats són heterozigots.

13.DISCUSSIÓ

El diagnòstic genètic té una gran importància perquè és vital per poder identificar els individus asimptomàtics portadors que encara no han manifestat la malaltia i, per tant, estan en risc de patir una mort sobtada.

FAMÍLIA 1 (413X)

En la família 1, portadora d'una variant sense sentit al codó 413, s'observa que 4 individus de la família són portadors. Per tant, és aconsellable que tots ells es facin revisions cardiològiques periòdiques per fer-ne una bona caracterització clínica i valorar-ne els riscos. En aquesta família, tots els individus portadors ja han presentat, prèviament, algun tipus de símptoma associat a la AC. La identificació de la variant també permetrà a les futures generacions saber quins individus podrien estar potencialment en risc des de petits i així fer un seguiment preventiu.

FAMÍLIA 2 (735X)

En aquesta família, amb la nostra investigació hem fet una gran feina perquè hem descobert que uns individus concrets (III.1, III.4 i III.7) són portadors de la mutació però encara no han expressat cap símptoma.

En aquest cas, la nostra recerca és molt important ja que, gràcies a aquests resultats genètics el cardiòleg podrà fer una valoració clínica exhaustiva per tal de valorar-ne l'estat mèdic i el risc potencial que tenen aquests individus.

Tots els resultats genètics es transmetran a la família en qüestió a través d'un equip de consell genètic professional per tal que els pacients sempre puguin prendre les decisions de manera informada. En el cas dels portadors

asintomàtics molt probablement es farà un seguiment continu de com evoluciona el seu cor.

La AC és una malaltia incurable, de totes maneres existeixen diferents mesures a prendre que decidirà el cardiòleg en funció de les característiques estructurals i funcionals del cor.

Entre les mesures, una de les més habituals és la restricció de l'activitat esportiva d'alt rendiment i en casos excepcionals s'implanta un desfibril·lador (DAI) i quan l'aparell detecta que el cor no funciona correctament, emet unes descàrregues elèctriques per reanimar-lo.

CONCLUSIONS

Una vegada acabada la recerca he arribat a les següents conclusions:

1r objectiu: Seqüenciar els gens majoritaris associats a cardiomiopatia aritmogènica (AC).

Pel que fa al primer objectiu, al laboratori hem seqüenciat els principals gens que estan associats a la cardiomiopatia aritmogènica: *PKP2*, *DSP*, *DSG2* i *DSC2* de manera més ràpida i efectiva.

2n objectiu: Identificar les variants potencialment causants de AC en cada cas.

Pel que fa al segon objectiu, en el cas de la família 1 hem descobert que la variant causant de la cardiomiopatia aritmogènica és la 413X i en la família 2 és la 735X. Totes dues variants es troben en el gen *PKP2*.

3r objectiu: Estudi genètic dels familiars per identificar els individus potencialment en risc de patir una mort sobtada.

Pel que fa al tercer objectiu, un cop fet l'estudi genètic de les dues famílies, hem pogut identificar els individus que tenen un risc potencial elevat de patir una mort sobtada. A la primera família hem pogut veure que un tant per cent molt alt dels individus presenten la mutació i per tant, segueix un patró d'herència autosòmic dominant. Ha estat en l'estudi de la família 2 on hem

identificant tres individus asimptomàtics que tenen un risc molt gran de patir aquesta malaltia.

Finalment, acceptem la nostra hipòtesi: “*Variants als gens associats a la cardiomiopatia aritmogènica són els responsables de la malaltia en les dues famílies estudiades*” perquè en el cas de la família 1 tots els individus portadors tenen la mateixa variant: 413X i el mateix pel que fa a la família 2 que tenen la mateixa variant 735X. Per això, podem confirmar que, almenys en les dues famílies analitzades, la cardiomiopatia aritmogènica és una malaltia hereditària.

BIBLIOGRAFIA

Alcalde, M. (2015). *Paper de la Placofilina-2 en la Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret: Bases Genètiques i Mecanismes Moleculars*. (Tesi doctoral). Universitat de Girona. Catalunya.

Bloc Impulso vital. Las cifras de la enfermedad cardiovascular. (2018, septiembre 28). *Fundación Española del Corazón*. Recuperat de <https://fundaciondelcorazon.com/blog-impulso-vital/3264-las-cifras-de-la-enfermedad-cardiovascular.html>

Brent Mitchell, L. (1899) L. Canalopatías cardíacas. *Manual MSD. Merck and Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA*. Recuperat de https://www.msmanuals.com/es/hogar/trastornos-del-coraz%C3%B3n-y-los-vasos-sangu%C3%ADneos/arritmias/canalopat%C3%ADas-card%C3%ADacas#v27416164_es

Castell, A. (s.d.). *Pàgina web interactiva de biologia cel·lular i tissular. Múscul Cardíac. Discos intercalars*. Recuperat de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/Doc/Tutorial/tejidos_archivos/Page2901.htm

Cor (2019, setembre 26). A viquipèdia. Recuperat el setembre 2019 de: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Cor>

Desmosoma (2018, gener 19). A viquipèdia. Recuperat el juliol 2019 de: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Desmosoma>

Enfermedades cardiovasculares. (2017, mayo 17). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperat de: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Félix Castillo Saavedra, F.E. (2006). Perfil cardíac. Múscul cardíac. *Monografias.com*). Recuperat de: <https://www.monografias.com/trabajos41/perfil-cardiaco/perfil-cardiaco.shtml>

Fernández, I., altres. Muerte súbita y cardioprotección en España. *Sociedad Española de Cardiología. Fundación Española del Corazón*. Recuperat de: https://fundaciondelcorazon.com/images/muerte_subita_digital.pdf

Fernández Esteban, M.A. i altres. *BiG Biología i Geología 3*. Vicens Vives (2015).

Gil de Bernabé i Ortega, E. *Atlas d'Anatomía*. Barcelona: Editorial Edibook, SL

Histología general. Tejido muscular. *Tipos de tejido muscular. Discos intercalares*. Recuperat de: <http://publicacionesmedicina.uc.cl/Histologia/paginas/mu33773.html>

Jimeno, A, Ugedo, L., Rodríguez, S. (2016). *Biología, Sèrie Observa. Batxillerat 1*. Barcelona: Grup promotor Santillana).

Máxima Uriarte, J. (2019, agosto 7). 10 características del Código Genético. *Caracteristicas.co*. Recuperat de: <https://www.caracteristicas.co/codigo-genetico/>

Miocardiopatia (2019, gener 23). *MayoClínic*. Recuperat de: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/cardiomyopathy/symptoms-causes/syc-20370709>

Morales, F. (2018, septiembre 29). Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en España. *Expansión*. Recuperat el juliol 2019. Recuperat de: <https://www.expansion.com/sociedad/2018/09/29/5bafb9d4e2704ed8838b45c2.html>

Muerte Súbita (I) (1999). Epidemiología de la muerte súbita cardíaca en España. *Revista Española de Cardiología*. 52 (9), 717-725. Recuperat de: <https://www.revespcardiol.org/es-muerte-subita-i-epidemiologia-muerte-articulo-X0300893299001740?redirect=true>

Muerte súbita cardíaca. (2015, septiembre 25). *Cuídate Plus*. Recuperat de: <https://cuidateplus.marca.com/enfermedades/enfermedades-vasculares-y-del-corazon/muerte-subita-cardiaca.html>

Notas de Prensa (2018, diciembre 19) Defunciones según la causa de muerte. Año 2017. *INE*. Recuperat el juliol 2019. Recuperat de: https://www.ine.es/prensa/edcm_2017.pdf

“Noticias” España (2018, septiembre 26). Salud. Cada año se producen en España unos 30.000 casos de muerte. *RTVE.es/AGENCIAS*. Recuperat el juliol 2019. Recuperat de <http://www.rtve.es/noticias/20180926/30000-personas-mueren-cada-ano-espana-muerte-subita/1807156.shtml>

(*PKP2* gene. Plakophilin 2. (2018 February). Genetics Home Reference, *U.S. National Library of Medicine*: Recuperat de: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PKP2>

Pruebas genéticas – Cardiomiopatía ventricular derecha aritmogènica. (Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy) – Genes *PKP2*, *C TNNA3*,

DES, DSC2, DSG2, DSP, JUP, LMNA, PLN, RYR2, TGFB3, TTN y TMEM43. Instituto Valenciano de Microbiología. Recuperat el juliol 2019. Recuperat de: <https://www.ivami.com/es/pruebas-geneticas-mutaciones-de-genes-humanos-enfermedades-neoplasias-y-farmacogenetica/1102-pruebas-geneticas-cardiomiopatia-arritmogena-del-ventriculo-derecho-displasia-arritmogena-del-ventriculo-derecho-genes-pkp2-dsp-dsc2-dsg2-jup-ryr2-tmem43>

Quan el cor diu prou: Mort Sobtada Cardíaca (2017, abril 10). *Mutualitat Catalana de Futbolistes*. Recuperat de: https://www.mcf.cat/wp_mcf/2017/04/10/quan-el-cor-diu-prou-mort-sobtada-cardiaca/

Ramos Muntada, M. (2017, desembre 3). Desxifrant el codi genètic. *All you need is biology*. Recuperat de: <https://allyouneedisbiology.wordpress.com/2017/12/03/codi-genetic/>

Rodríguez, M. Muerte Súbita (2017) *Fundación Española del Corazón*. Recuperat de: <https://fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/muerte-subita.html>

Sistema circulatori (2019, setembre 24). A Viquipèdia. Recuperat el setembre de 2019 de: https://ca.wikipedia.org/wiki/Sistema_circulatori

Stop-Gain Mutations in PKP2 Are Associated with a Later Age of Onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (2014, juny 16). *PLOS/ONE*. Recuperat de: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0100560>

Texas Heart Institute. *Cardiomiopatia*). Recuperat de:
<https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/cardiomiopatia/>

Tomé Esteban, M, García-Pinilla, J.M, McKenna, W.J. (2004). Actualización en miocardiopatía aritmogènica del ventrículo derecho: genética, diagnóstico, manifestaciones clínicas y estratificación de riesgo. *Update in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Genetic, Clinical Presentation and Risk Stratification. Revista Española de Cardiología*. 57 (8), 757-767. Doi: 10.1157/13064828.

<https://www.revespcardiol.org/es-actualizacion-miocardiopatia-arritmogénica-del-ventriculo-articulo-13064828>

ANNEX

TIPUS D'HERÈNCIES

HERÈNCIA DOMINANT

En una malaltia autosòmica dominant el fill pot heretar el gen anormal tot i que només un dels progenitors el tingui. Parlem d'herència dominant quan un gen anormal d'un dels progenitors pot causar la malaltia; això passa encara que el gen compatible de l'altre pare sigui normal perquè el gen anormal domina.

HERÈNCIA RECESSIVA

Algunes malalties són hereditàries de forma recessiva. Això vol dir que perquè una persona tingui la malaltia ha d'heretar dues còpies mutades del mateix gen (una de cada progenitor). Si una persona hereta una còpia del gen mutat i una de normal, en la majoria dels casos serà una persona sana portadora perquè el gen anormal és recessiu.

AL-LEL

Un al·lel és cadascuna de les formes alternatives que pot presentar un gen que ocupa el mateix lloc en un cromosoma determinat o en dos cromosomes homòlegs i que expressa de forma diferent un mateix caràcter.

HETEROZIGOT

En genètica, un heterozigot és un individu que per a un gen donat, té en cada un dels dos cromosomes homòlegs un al·lel diferent que té dues formes diferents; cadascuna heretada de cadascun dels progenitors.

HOMOZIGOT

En genètica, un heterozigot és un individu que, respecte a un gen específic té dues còpies idèntiques d'aquest gen per a una característica donada en els dos cromosomes homòlegs.