



EL DÉFICIT DE LA DAO I LA MIGRANYA

Pseudònim: LLUM

2n BAT

Curs 2020-2021

AGRAÏMENTS

Vull començar agraint a totes aquelles persones que m'han donat suport quan més l'he necessitat i m'han guiat durant tot aquest projecte. No hagués estat possible sense la seva ajuda, ja que m'han motivat, facilitat i transferit tots els coneixements i eines necessàries per poder realitzar aquest treball, que m'ha permès fer recerques, experimentar i sobretot gaudir de la ciència des de diverses perspectives.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies al meu tutor de recerca per tot el temps que m'ha dedicat, orientat, entusiasmat i motivat durant tota la recerca. M'ha donat molt suport i m'ha omplert de nous coneixements. Per tot això, vull remarcar aquest agraïment en majúscules.

També voldria agrair a la meva mare, la qual m'ha donat el més immens suport i ha estat en tot moment al meu costat transmetent-me encara més passió per les ciències. També, per animar-me a tirar endavant el meu projecte, cosa que m'ha facilitat i ajudat molt en tot aquest període de temps.

Finalment, agrair també al meu pare i a la resta de la família que han estat al meu costat en tot moment donant-me ànims i encoratjant-me a fer realitat aquest treball.

Em sento molt afortunada de tota la gent que m'ha acompanyat, recolzat i transmès tota la confiança i suport en tot moment. Sincerament n'estic molt agraïda. Gràcies per acompanyar-me i fer-me gaudir tant del món que més m'agrada, el món científic.

ABSTRACT

A large part of the population suffers or has suffered from headaches at some point in their lives. There are different types of headaches and they can have different origins. Migraine can invalidate the daily activities of an individual's life. Knowing more about this illness can help people who suffer from it to improve their quality of life. One of the migraine triggers can be due to the deficit of Diamine Oxidase (DAO) enzyme, which is the responsible for the degradation of histamine in our body.

This study aims to get further knowledge about the enzyme DAO and know the symptoms that can generate the deficiency of this enzyme, and find appropriate treatments to minimize migraine effects. Specifically, it includes a study of the gene that encodes the such enzyme, centered on its sequences in several species as well as the evolution of this gene over time. The final goal was to make sure that it was really the deficiency of DAO that caused the migraine episodes, and study some of the mutations and the hereditary patterns of its deficiency.

For the manipulation of gene and protein sequences of enzyme, several applications were used, which have made this research easier. From some blood tests I have been able to analyze the enzyme DAO and its activity, as well as the probability of having intolerance to histamine.

It has been possible to see that this deficit can be the cause of some migraines even though sometimes the affected patient is not aware of it, because these values are not frequently analyzed at medical consultations. With the aid of a low histamine diet and some nutritional supplements the effects of this deficit can be diminished.

RESUMEN

Gran parte de la población sufre o ha sufrido dolor de cabeza alguna vez en su vida. De cefaleas hay de tipos diferentes y pueden tener orígenes diversos. La migraña puede llegar a invalidar las actividades cotidianas de la vida de un individuo. Conocer más sobre esta enfermedad puede ayudar a las personas que la sufren a mejorar su calidad de vida. Uno de los desencadenantes de la migraña puede ser debido al déficit de la enzima Diamino Oxidasa (DAO), la encargada de degradar la histamina de nuestro cuerpo.

El objetivo principal de mi trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de la enzima DAO y conocer los síntomas que puede generar sufrir un déficit, pudiendo así buscar los tratamientos adecuados para minimizarlo. También ha sido llevar a cabo un estudio del gen que codifica la enzima de la Diamino Oxidasa, haciendo así una investigación de sus secuencias en varias especies y ver la evolución de este gen a lo largo del tiempo. Y como objetivo final, me he querido asegurar de que sea realmente la deficiencia de la enzima el que me ha provocado los episodios de migraña, y estudiar algunas de las mutaciones y el patrón hereditario de su deficiencia.

Para la manipulación de las secuencias de gen y proteína de la enzima DAO, he utilizado varias aplicaciones que me han facilitado esta investigación. A partir de unas analíticas de sangre hemos podido analizar la enzima y su actividad, así como, la probabilidad de tener intolerancia a la histamina.

Ha sido posible ver que este déficit puede ser el causante de algunas migrañas aunque a veces el paciente afectado no sea consciente de esto, ya que estos valores no son analizados de forma frecuente a las consultas médicas. Con la ayuda de una dieta baja en histamina y con algunos suplementos alimentarios podemos disminuir sus efectos.

RESUM

Una gran part de la població pateix o ha patit mal de cap algun cop a la seva vida. De cefalees n'hi ha de tipus diferents i poden tenir orígens diversos. La migranya pot arribar a invalidar les activitats quotidianes de la vida d'un individu. Conèixer més sobre aquesta malaltia pot ajudar a les persones que la pateixen a millorar la seva qualitat de vida. Un dels desencadenants de la migranya pot ser degut al dèficit de l'enzim Diamino Oxidasa (DAO), l'encarregat de degradar la histamina del nostre cos.

L'objectiu principal del meu treball ha estat aprofundir en el coneixement de l'enzim DAO i conèixer els símptomes que pot generar patir-ne un dèficit, podent així buscar els tractaments adequats per minimitzar-lo. També ha estat fer un estudi del gen que codifica l'enzim de la Diamino Oxidasa, fent així una recerca de les seves seqüències en diverses espècies i veure l'evolució d'aquest gen al llarg del temps. I com a objectiu final, m'he volgut assegurar de que sigui realment la deficiència de l'enzim DAO el que m'ha provocat els episodis de migranya, i estudiar algunes de les mutacions i el patró hereditari de la seva deficiència.

Per a la manipulació de les seqüències de gen i proteïna de l'enzim DAO, he utilitzat diverses aplicacions que m'han facilitat aquesta investigació. A partir d'unes analítiques de sang hem pogut analitzar l'enzim DAO i la seva activitat, així com, la probabilitat de tenir intolerància a la histamina.

Ha estat possible veure que aquest dèficit pot ser el causant d'algunes migranyes encara que a vegades el pacient afectat no en sigui conscient, ja que aquests valors no són analitzats de forma freqüent a les consultes mèdiques. Amb l'ajuda d'una dieta baixa en histamina i amb alguns suplements alimentaris podem disminuir els efectes d'aquest dèficit.

ÍNDIX

JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL	8
INTRODUCCIÓ	10
QUÈ ÉS LA MIGRANYA?	11
1.1 COM ACTUA?	13
1.2. INTRODUCCIÓ A LA HISTAMINA I LA TIRAMINA	17
1.3. LES CAUSES	18
1.4. ELS SÍMPTOMES	19
1.5. FACTORS DE RISC	20
1.6. EL TRACTAMENT	20
L'ENZIM DAO	22
2.1. RELACIÓ ENZIM DAO I HISTAMINA	23
2.1.1. LA HISTAMINA	24
2.1.2. RUTA DE LA HISTAMINA DINS DE L'ORGANISME. EL METABOLISME	27
2.2. L'ALIMENTACIÓ I LA HISTAMINA	30
2.2.1. L'AUGMENT DE LA HISTAMINA EN ELS ALIMENTS	31
2.2.2. COM INFLUENCIEN ELS ALIMENTS EN L'AUGMENT DE LA HISTAMINA	31
2.2.3. ELS ALIMENTS QUE BLOQUEGEN L'ENZIM DAO	34
2.2.4. SUPLEMENTACIÓ DE DAO	35
COS DEL TREBALL	37
OBJECTIUS	37
PART EXPERIMENTAL	38
Metodologia	38
ANÀLISI DE LES SEQÜÈNCIES DE GEN DE L'ENZIM DAO	38

1.1 Obtenció de seqüències de DNA i proteïnes de la base de dades molecular Genbank.	38
1.2 Alineament de seqüències amb el programa BioEdit v7.2	46
1.3 Anàlisi de variabilitat i polimorfismes amb DnaSP v6.12.03	48
1.4 Anàlisi filogenètica amb el programa MEGA X v10.05	54
ANÀLISI DEL DÈFICIT DE LA DAO	55
Resultats	58
1. RESULTATS DE L'ANÀLISI DE VARIABILITAT I POLIMORFISMES	58
2. RESULTATS DE L'ANÀLISI FILOGENÈTICA AMB EL PROGRAMA MEGA	62
3. RESULTATS DE LES ANÀLISIS DE SANG	68
Discussió	70
1. ANÀLISI DE VARIABILITAT I POLIMORFISMES	70
2. ANÀLISI DE FILOGENÈTICA DEL GEN DAO EN VERTEBRATS	72
3. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT DE LA DAO EN UNA MOSTRA DE SANG	73
CONCLUSIONS	76
BIBLIOGRAFIA	76
WEBGRAFIA	78

JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

Primer de tot m'agradaria explicar les meves motivacions per haver escollit el tema del dèficit de l'enzim diamino oxidasa (DAO) i la seva relació amb la migranya. Tenint en compte que m'agraden i m'interessen molt els temes relacionats en les àrees científiques i tecnològiques, com també m'interessa molt tot el tema d'esport i salut relacionat amb l'alimentació i l'exercici físic, vaig decidir orientar el meu treball de recerca a partir d'una experiència personal que es va iniciar fa 3 anys i en la que vaig poder descobrir l'existència d'un enzim, anomenat DAO. També vaig descobrir les conseqüències d'una malaltia, la migranya, molt patida per mala sort per una gran part de població.

Fins que no vam trobar la solució, prenent el complement de DAO i fent una dieta lliure d'aliments que provoquen inflamació, ho vaig passar molt malament, invalidant-me episodis del meu dia a dia i sense que cap medicament dels que els especialistes em donaven em fes cap efecte per calmar la meua migranya. Per mi descobrir aquest enzim i veure que prenent aquest complement em desapareixia el dolor, va ser un miracle. I estic tan agraïda que m'agradaria poder ajudar a altra gent que es pugui trobar en una situació semblant.

Per mi és tota una motivació poder ajudar a difondre informació sobre aquest tema, podent així millorar l'estat de la gent que pateix migranya i pugui ser provocada per un dèficit del DAO sense estar-ne assabentada. Amb tan sols un complement i evitant alguns aliments, poden millorar molt la seva qualitat de vida. En el meu cas particular, el neuròleg no ens va dir en cap moment que podia ser degut a això. La solució ens la va aportar la medicina alternativa i una dietista nutricionista. No obstant, recomano que si alguna persona afectada per migranya llegeix aquest treball, prengui la meua experiència com una orientació i en cap cas com a una solució definitiva. La migranya pot ser deguda a una gran varietat de factors i la seva resolució ha de passar per mans d'un especialista.

Em faig les preguntes de com és i com funciona aquest enzim, com ha evolucionat el gen que el codifica o de si aquest dèficit de DAO podria ser hereditari i per aquesta raó, m'agradaria investigar si realment el tinc ja que no ho hem comprovat mai. Ho hem deduït ja que aquest complement DAO va ser el que em va solucionar tots els dolors i les altres conseqüències provocades per la migranya.

INTRODUCCIÓ

Tres de quatre persones tindran mal de cap en algun moment de la seva vida. Aquest símptoma afecta persones de totes les edats, races, nivells d'ingressos i zones geogràfiques.

El mal de cap també es coneix amb els termes **cefalea o cefalàlgia**. El tipus més comú és la cefalea tensional. És causada per les tensions que es produeixen en els músculs, com per exemple de les espatlles, del coll, del cuir cabellut, o de la mandíbula. En moltes ocasions es pot relacionar amb l'estrès, la depressió o l'ansietat, ja siguin causades per treballar molt, no dormir el temps suficient, no tenir una bona rutina dels àpats, o beure moltes begudes alcoholiques.

Altres formes comunes de cefalees podrien ser la migranya o les causades per una sinusitis. Es poden fer canvis en els hàbits de vida per reduir aquests dolors i sentir-se millor.

La migranya és la **cefalea primària més important i més comuna**, que es caracteritza per l'existència de crisis de cefalea recurrents i molt intenses.

1. QUÈ ÉS LA MIGRANYA?

La migranya és una **malaltia neurològica** que consisteix en mal de cap, habitualment molt intens i incapacitant per a la persona que la pateix. Les migranyes poden durar des de quatre fins a setanta-dues hores. Són **mals de cap crònics** que poden presentar-se només una o dues vegades a l'any, o tan freqüentment com cada dia.

Pot desencadenar-se per l'acció de diversos estímuls com ara aliments (formatge, vi negre, xocolata), olors intenses, llums brillants, canvis de temps, alteracions del ritme del son, variacions hormonals o estrès (Canal Salut, 2017). És freqüent que hi hagi **antecedents familiars**. Aquesta malaltia és tres vegades més comuna en dones que en homes i, generalment, s'inicia abans dels trenta anys i no més tard dels cinquanta.

El dolor és típicament **unilateral** (fa mal una meitat del cap), de caràcter pulsatiu (com un batec), i pot anar acompanyat de nàusees, vòmits i intolerància a la llum i al soroll.

Es distingeixen dues varietats de migranya: *amb aura i sense aura* (Canal Salut, 2017). L'aura és un conjunt de símptomes neurològics, generalment visuals (llums rutilants o visió borrosa), que solen precedir el mal de cap i duren entre quinze i trenta minuts. Altres manifestacions són els trastorns de la sensibilitat i dificultats en l'expressió del llenguatge.

La migranya està en la sisena posició del **rànquing de l'Organització Mundial de la Salut** (OMS) de malalties neuropsiquiàtriques que provoquen discapacitat (Carreño, 2011). En aquest sentit, però la seva incidència a Europa és força menor que a escala mundial (Figura 1).

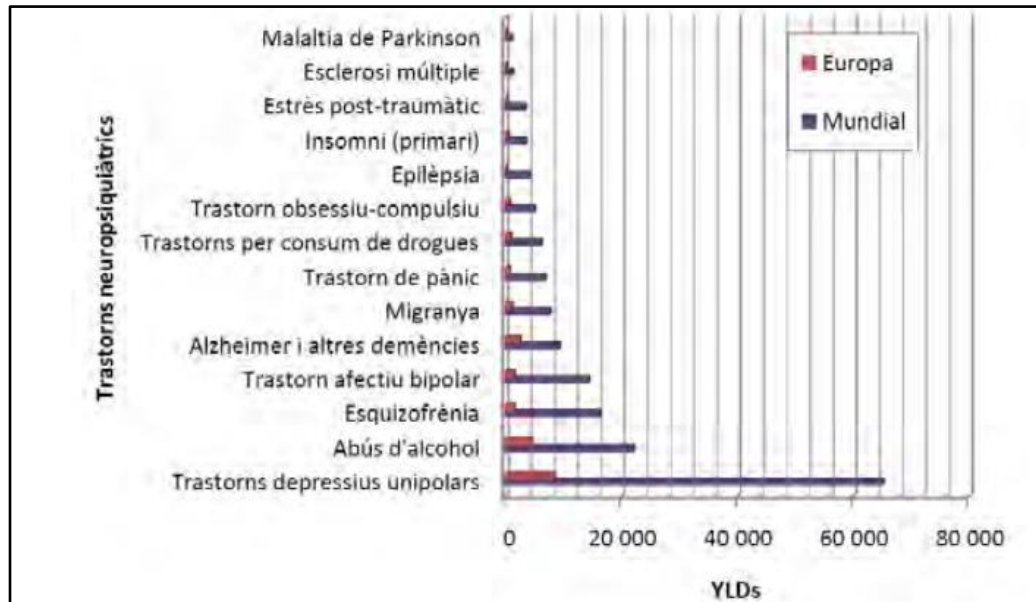


Figura 1. Gràfica basada en les dades de la OMS sobre els anys perduts degut a la discapacitat produïda per diferents les malalties neuropsiquiàtiques en el total de la població analitzada (YLD). (Mathers, Boerma i Fat, 2004)

Més enllà de la vida laboral, la migranya té importants efectes en la qualitat de la vida quotidiana. Ocasionalment causa costos socioeconòmics molt elevats. Repercuteix en les relacions socials i familiars, el rendiment escolar i, fins i tot, la permanència al lloc de treball.

Els aspectes que són repercutits més negativament tenen relació amb l'assistència al treball, amb els estudis i amb el temps lliure. La migranya pot provocar moltes dificultats en tots aquests aspectes. També pot produir efectes adversos en la vida sexual, la situació familiar o la carrera professional. Fins i tot, pot arribar a causar dificultats en les amistats. En el següent gràfic analitzen els efectes de la migranya en diferents aspectes d'una població de Suècia (Figura 2).

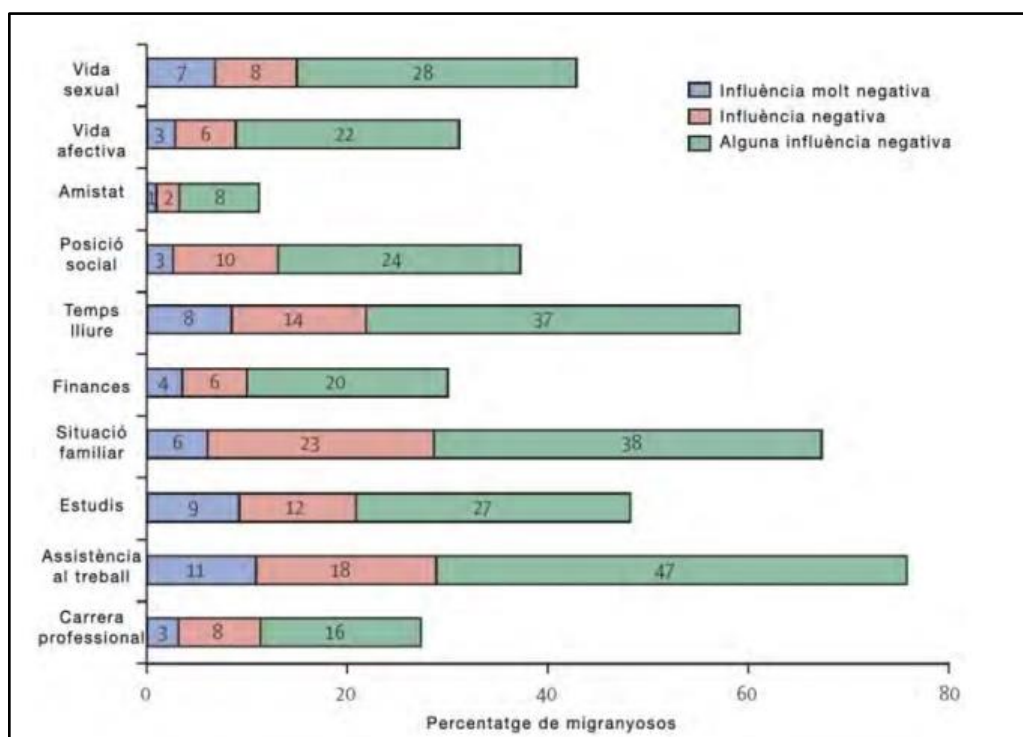


Figura 2. Efecte de la migranya en aspectes importants de la vida. Adaptat de (Jensen i Stovner 2008).

1.1 COM ACTUA?

La migranya és la conseqüència de l'activació o irritació de les fibres del **nervi trigemin**. És un dels 12 parells de nervis cranials que s'originen a la base del cervell. Té tres branques que són les que transmeten la sensibilitat del cap i condueixen les sensacions de les zones superior, mitjana i inferior de la cara.

Aquest nervi capta informació sensorial, tèrmica i nociceptora de la cara i s'encarrega del moviment dels músculs encarregats de la mastiació (a la Figura 3 es pot veure tota la zona relacionada per aquest nervi).

És per això que el dolor de la migranya és intens i sobtat i pot aparèixer als ulls, a la mandíbula, als llavis, a les genives, a les dents, al nas, al front o el cuir cabellut.

Les fibres que provenen de la primera branca, envolten els vasos sanguinis localitzats a les **meninges**. Aquestes estan construïdes per diferents capes de teixit que recobreixen tot el cervell. El cervell en sí no és el que fa mal, sinó que són les estructures que el cobreixen les que causen el dolor.

Durant un atac de migranya es produeix una inflamació de les meninges ja que les substàncies inflamatòries del trigemin són alliberades.

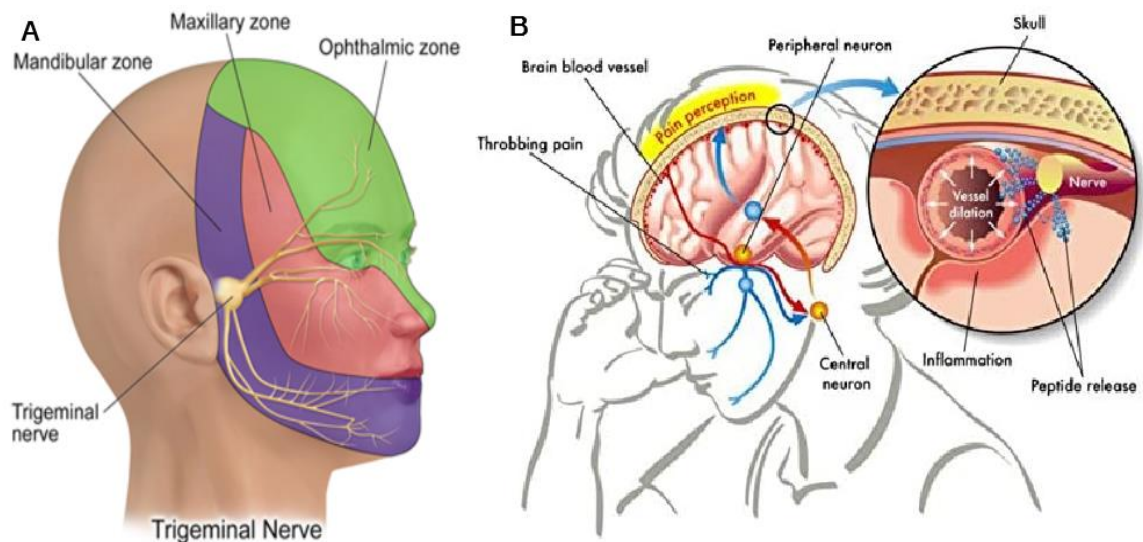


Figura 3. El nervi trigemin. A, Es mostra el nervi i les regions del cap que irradia. Font: <https://neurohonors.wordpress.com/>. B, Mostra com es produeix el dolor. Font: amazon.com

Les **meninges** (Figura 4) estan constituïdes per diferents capes de teixit que recobreixen el cervell i hi arriben terminacions nervioses del dolor. En el teixit nerviós del cervell no hi arriben aquest tipus de terminacions i, com he comentat abans, no hi ha sensació de dolor.

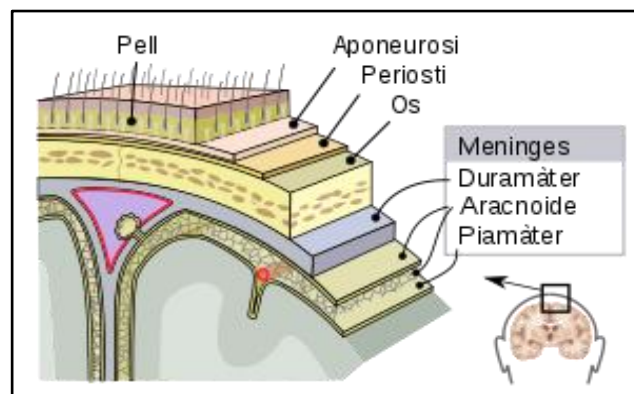


Figura 4. Esquema de les meninges del SNC, que són les capes situades entre l'os i l'encèfal/medulla espinal. Font: Viquipèdia.

Durant un atac de migranya es produeix una **inflamació de les meninges** com a conseqüència de l'alliberament de substàncies inflamatòries del trigemin. Aquesta inflamació o "meningitis" no infecciosa és responsable de provocar el dolor i fa que, quan movem el cap, el dolor empitjori o augmenti. Per aquest motiu, estar en repòs ens alleuja.

Hi ha diferents tipus de meningitis. La **meningitis fúngica**, és deguda a la propagació d'un fong que entra dins del nostre organisme via inhalatòria i a través del torrent sanguini arriba al sistema nerviós central. Diversos fongs que es trobin en sòls on hi ha matèria en descomposició ens poden causar aquesta malaltia ja que entren dintre el nostre organisme per inhalació. No és una malaltia gaire freqüent, però es pot donar en persones que ja tinguin el sistema immunitari compromès.

També hi ha la **meningitis vírica**. En aquest cas és causada per un virus, ja sigui enterovirus, virus de l'herpes simple, virus transmesos per mosquits o VIH. En funció de quin sigui el virus que causa la malaltia es pot propagar de maneres diferents. Els símptomes que causen són rigidesa del coll, febre i mal de cap. Si es tracta d'una meningitis vírica, els símptomes, en la majoria dels casos, no són tan intensos com en la bacteriana. L'origen (víric o bacterià) el podem saber fent una punció lumbar del líquid cefaloraquídi i analitzant-lo.

La **meningitis bacteriana** és causada pel bacteri *Neisseria meningitidis*, l'únic reservori del qual és l'ésser humà. És a dir, és un bacteri que només pot sobreviure dins de l'ésser humà. Una part de les persones que tenen contacte amb aquest microorganisme són colonitzades a la nasofaringe i són portadores asimptomàtiques del mateix. Només en un 1% d'aquestes persones es produeix la malaltia. Es transmet per via aèria, per contacte directe amb la persona a través de petites gotes respiratòries, o per contacte directe amb les secrecions nasals i faríngies de la persona infectada. L'inici d'aquesta malaltia és sobtat amb cefalàlgia, febre, vòmits, fotofòbia i alteració del nivell de consciència.

Finalment, la **meningitis no infecciosa**, la responsable de la migranya, és causada per trastorns que no són infecciosos, fàrmacs o vacunes. Els

més freqüents són aquells trastorns que causen inflamació, com quan el sistema immunitari ataca els teixits del propi cos en els trastorns autoimmunitaris.

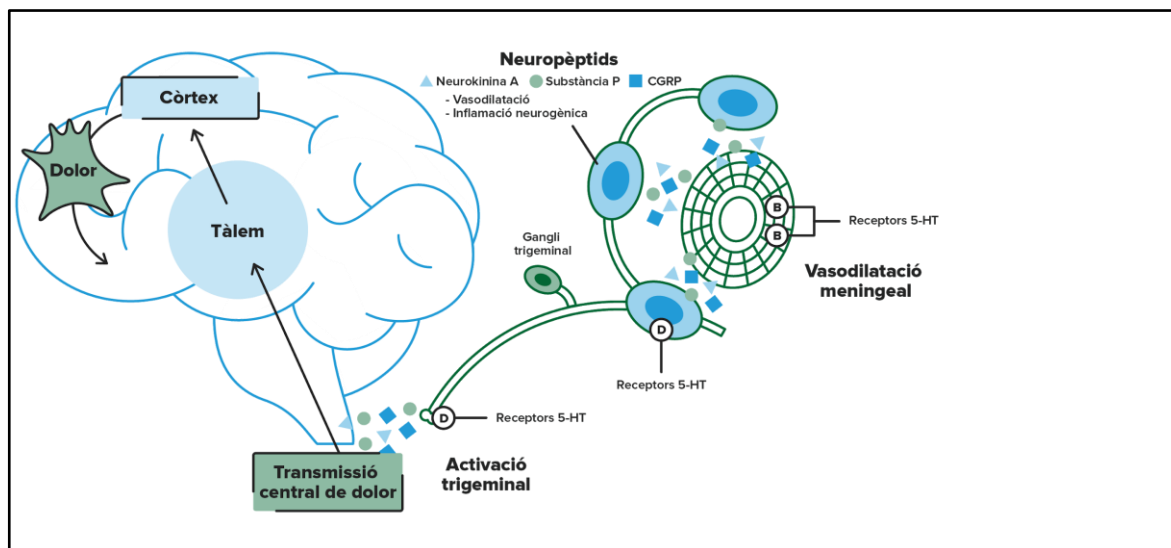


Figura 5. El dolor es localitza a les membranes que envolten el cervell, és a dir a les meninges, on s'ubiquen les terminacions sensibles (anomenades nociceptors) del nervi trigemin. Autors figura: Neus Fabregat i Víctor Obach.

La migranya, com he dit abans, és la **cefalea primària més important i més comuna**, que es caracteritza per l'existència de crisis de cefalea recurrents i molt intenses.

Les cefalees es classifiquen de la següent manera:

- *Primàries* – com **la migranya**, la cefalea de tipus tensional, cefalàlgies autonòmiques trigeminals i altres cefalees no causades per lesions del sistema nerviós.
- *Secundàries* – com a conseqüència de malalties o trastorns que afecten el cervell, dolors facials o atribuïdes a trastorns psiquiàtrics.
- *Neuropaties cranials doloroses i altres dolors facials* – aquí hi ha la neuràlgia del trigemin.

1.2. INTRODUCCIÓ A LA HISTAMINA I LA TIRAMINA

La **histamina** i la **tiramina** són dos compostos que s'han relacionat amb les migranyes. Aquests, pertanyen al grup de les amines i deriven d'aminoàcids que ajuden en la regulació de la pressió arterial. Davant una crisi migranyosa, es produeix l'alliberament d'aquestes substàncies.

Molts aliments, com les nous, el iogurt o el coco, els contenen. Els que són lliures d'aquestes amines són els ous, les verdures, les sopes, els llegums, la carn i el peix frescos.

Per metabolitzar aquesta histamina i tiramina, l'organisme compta amb l'**enzim diamino oxidasa (DAO)**, situat a l'intestí prim. Si n'hi ha grans quantitats o n'hi ha una manca, pot generar efectes adversos com els mals de cap. Sobretot, en el moment en que no es produeixen els suficients **enzims neutralitzadors de la histamina**, els nivells elevats d'aquesta amina en el torrent sanguini augmenten la vasodilatació de les artèries i poden provocar els atacs de migranya.

A la Figura 6, podem observar com gràcies a l'enzim DAO, la histamina pot ser metabolitzada per poder-se eliminar per l'orina sense cap inconvenient.

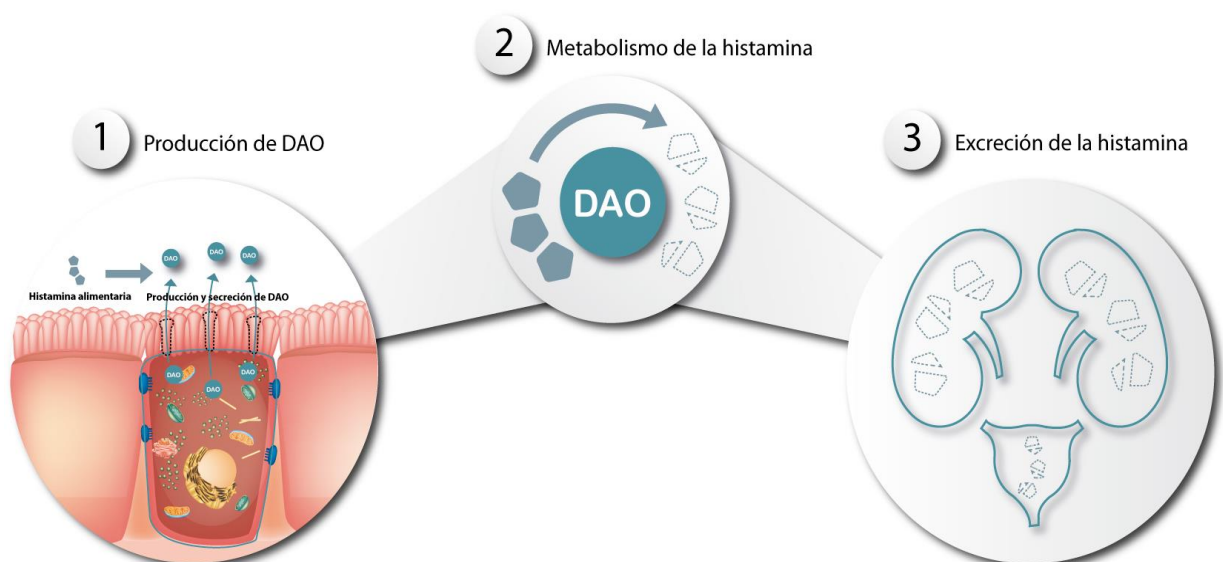


Figura 6. El metabolisme de la histamina. Font: Pàgina web Dr. Healthcare.

1.3. LES CAUSES

La migranya és causada en el moment que hi ha alts nivells d'histamina provocats per un excés d'estrògens en sang, o pel dèficit de l'enzim que permet metabolitzar l'excés d'histamina, el DAO. Això pot ser causat a partir de factors genètics, factors hormonals, factors ambientals o per l'estil de vida.

Un **70%** de les persones que pateixen la malaltia tenen **antecedents familiars**. Per tant una causa molt comuna pot ser associada als factors genètics.

Degut a **l'augment dels nivells d'estrògens** que hi ha abans de la menstruació, són moltes les dones que pateixen migranya en tota la seva vida fèrtil, i deixen de patir-la en arribar a la menopausa. Els medicaments hormonals com els anticonceptius orals i la teràpia de substitució hormonal, també poden empitjorar les migranyes. Algunes dones, però, troben que les seves migranyes es produeixen amb menys freqüència en prendre aquests medicaments.

Els **canvis bruscs de la pressió atmosfèrica**, també s'han associat com una causa freqüent de la migranya.

Finalment, els **aliments i begudes que són rics en tiramina**, com la xocolata, embotits, plàtans, formatges curats, cafè, cervesa, vi negre, alcohol, cafeïna o fàrmacs vasodilatadors, també poden desencadenar crisis de migranya.

A part de tots aquests, l'estrès a la feina o a casa, els estímuls sensorials com les llums brillants i la lluentor del sol, els sorolls forts, les olors fortes (perfum, pintura, fum de segona mà i altres), canvis de son (falta de son o dormir massa) i l'esforç físic intens, també poden causar la migranya.

1.4. ELS SÍMPTOMES

Les migranyes que sovint s'inicien a la infància, a l'adolescència o a la primera edat adulta, poden progressar a través de quatre etapes: prodrome, aura, atac, post-drome. Tot i això, no tothom passa per les quatre.

PRODROME

Un o dos dies abans d'una migranya, es comencen a notar els canvis subtils que adverteixen d'una pròxima migranya. El restrenyiment, el canvi d'humor de depressió a eufòria, els desitjos alimentaris, la rigidesa del coll, l'augment de la set i la micció, i el fregar freqüentment.

AURA

Hi ha persones que l'aura se'ls hi produeix abans o durant les migranyes. Aquest símptoma, reversible del sistema nerviós, sol ser visual. Alguns exemples de l'aura de la migranya serien els fenòmens visuals, com veure formes, taques brillant o flaixos de llum. També la pèrdua de la visió, sensacions d'agulles en un braç o una cama, debilitat o adormiment a la cara o a un costat del cos, dificultat per parlar, sorolls auditius o música, i sacsejades o altres moviments incontrolables.

Cada símptoma sol començar gradualment, s'acumula al llarg de diversos minuts i té una durada de 20 a 60 minuts.

ATAC

La migranya sol durar de quatre a setanta-dues hores si no és tractada. La freqüència amb què es produeixen les migranyes varia d'una persona a una altra. Durant l'atac es pot tenir dolor generalment a un costat del cap, però sovint a banda i banda, sensibilitat a la llum, al so i de vegades a l'olfacte i al tacte, i nàusees i vòmits.

POSTDROME

Després d'un atac de migranya, pots quedar confós o, fins i tot, excitat. El moviment sobtat del cap pot provocar el dolor de nou breument.

1.5. FACTORS DE RISC

Hi ha factors de risc que et fan més propens a tenir migranyes.

- La **història familiar**. Si hi ha parents propers amb migranya, també hi ha moltes possibilitats de desenvolupar-la.
- L'**edat**. Les migranyes poden començar en qualsevol edat, tot i que la primera es produeix sovint durant l'adolescència. Les migranyes acostumen a augmentar durant els 30 anys, i a poc a poc es fan menys greus i són menys freqüents en les dècades següents.
- El **sexe**. Les dones tenen tres vegades més de probabilitat de patir la malaltia.
- Els **canvis hormonals**. Per a les dones que tenen migranyes, els mals de cap poden començar poc a poc després de l'inici de la menstruació, a causa de la variació dels nivells d'estrògens. També poden canviar durant l'embaràs o la menopausa. Les migranyes generalment milloren després de la menopausa.

1.6. EL TRACTAMENT

La migranya no es pot curar. Tot i que sí que pot desaparèixer amb la menopausa o millorar al llarg dels anys. Hi ha tractaments que si són els adequats poden alleugerir el dolor o prevenir-ne l'aparició.

Es pot optar pel tractament no farmacològic, o pel farmacològic (Canal Salut, 2017).

TRACTAMENT NO FARMACOLÒGIC

És important que l'afectat intenti identificar i evitar els **desencadenants específics** de la seva migranya. La **fisioteràpia** pot ser útil en alguns casos.

Apart d'aquests tractaments, una altra manera eficaç i que ajuda en la millora de la migranya és el seguiment d'una dieta que millori els nivells d'estrògens i la funcionalitat hepàtica. També, el seguiment d'una dieta baixa en histamina, utilitzar la suplementació del DAO si hi ha una manca de l'enzim, seguir un horari regular de menjar, i disminuir l'estrès, ajudaran molt en la disminució del dolor i l'aparició de la migranya.

TRACTAMENT FARMACOLÒGIC

Aquí, s'han de diferenciar dos grups de medicaments. Els **simptomàtics**, que s'utilitzen per alleugerir el dolor. Destaquen els antiinflamatoris, paracetamol, ergotamina i els seus derivats. L'altre tipus són els **preventius**, que intenten evitar-ne l'aparició. S'indiquen quan la migranya és molt freqüent o no respon adequadament al tractament simptomàtic. Destaquen alguns antidepressius, antihipertensius, antagonistes del calci, antiagregants, i antiepilèptics.

L'elecció d'aquests tractaments l'ha de fer i controlar un metge. És important evitar l'automedicació per prevenir l'aparició de cefalea crònica diària, que es desencadena per abús de medicació analgèsica.

2. L'ENZIM DAO

La histamina és una amina biogènica que regula moltes funcions fisiològiques de l'organisme. Pot actuar a nivell dels òrgans perifèrics o a nivell de sistema nerviós central com a neurotransmissor. La desregulació d'aquesta amina es relaciona amb importants processos crònics. Quan la histamina es troba elevada de manera crònica en el cos, es parla de histaminosis.

La histamina es pot elevar per diferents mecanismes. El més important és degut a les sensibilitzacions a determinats aliments. Altres serien, per exemple, les al·lèrgies, menjar aliments rics en histamina o patir sensibilitat a altres estímuls com la llum, el soroll, les olors, els canvis de temperatura i substàncies químiques.

En el metabolisme de la histamina hi ha una substància important que és la **diamino oxidasa (DAO)**. És un dels enzims que regula els nivells d'aquesta amina en el nostre cos. Hi ha un percentatge de persones que poden tenir un dèficit de DAO amb el que s'accentuaria el seu problema d'excés d'histamina.

Tenir un dèficit de DAO o una Síndrome de Sensibilitat Central (SSC), o una histaminosis crònica, no és el mateix. És important diferenciar-ho. La SSC és una malaltia que provoca hiperresposta i que es manté en el temps malgrat la desaparició de l'estímul i dóna lloc a una simptomatologia complexa i variada, que es tradueix en una o més d'aquestes malalties; fatiga crònica, fibromiàlgia, cefalea... Podem tenir problemes amb la histamina, però cap dèficit de DAO, i a l'inrevés, podem tenir un dèficit de DAO que pot estar empitjorant el problema d'excés d'histamina (SHC Medical, 2013).

Segons uns estudis realitzats per "SHC Medical", el 26% dels pacients amb SSC, i per tant amb histaminosis crònica, tenen un dèficit de DAO moderat, i tan sols un 7,6% tenen un dèficit sever de l'enzim. Per tant, l'enzim DAO no és el més important ni determinant dins d'aquest quadre.

Segons l'estudi de l'investigador Joan Izquierdo, un alt percentatge de persones que pateixen migranya hi tenen el dèficit DAO associat (Izquierdo, 2013). Però, també cal tenir en compte que no totes les migranyes estan causades per una desregulació de la histamina, ni totes les persones amb SSC tenen migranya.

2.1. RELACIÓ ENZIM DAO I HISTAMINA

La deficiència de DAO produeix una alteració en el metabolisme de la histamina alimentària que apareix quan l'activitat enzimàtica de la diamin oxidasa (DAO) és baixa. És a dir, quan per alguna raó hi ha una deficiència important en l'activitat funcional de l'enzim principal en el metabolisme de la histamina.

El desequilibri entre la histamina ingerida i la histamina alliberada de les cèl·lules d'emmagatzematge de la histamina i la capacitat de degradació de la histamina condueix a l'acumulació d'histamina en el plasma. Aleshores activa l'aparició d'efectes adversos per a la salut.

En persones sanes, la histamina que es pren amb els aliments es degrada ràpidament per l'enzim diamin oxidasa (DAO), però les persones amb baixa activitat funcional de DAO tenen el risc de patir intolerància a la histamina o histaminosis alimentària.

A diferència de l'al·lèrgia alimentària, l'aparició de símptomes o efectes adversos no està relacionada amb la ingesta d'aliments específics: no només es pot relacionar amb una gran varietat d'aliments amb diferents continguts d'histamina, també es poden presentar símptomes fins i tot després de la ingesta de productes amb baixos nivells d'histamina.

La deficiència de l'enzim DAO pot causar efectes adversos en el nostre organisme (Figura 7).



Figura 7. Esquema dels efectes adversos causats pel dèficit DAO. Font: Pàgina web Dr. Healthcare.

No és necessari que es manifestin tots els símptomes, tot i que la majoria de les persones amb baixa activitat funcional de DAO presenten una mitjana de tres d'aquests símptomes, sent la migranya el que predomina. Més concretament, el 20% dels pacients presenta 1 o 2 d'aquests símptomes associats, el 41,3% dels pacients presenta 3 o 4 d'aquests símptomes i el 33,8% en presenta més de 5 (International Society of DAO Deficiency, 2018).

2.1.1. LA HISTAMINA

La histamina és una molècula derivada de la histidina, un aminoàcid essencial. Es produeix per descarboxilació* mitjançant l'enzim L-histidina descarboxilasa.

*DESCARBOXILACIÓ: reacció química en la qual un grup carboxil és eliminat d'un compost químic en forma de diòxid de carboni (CO₂).

La histamina té moltes funcions fisiològiques i fisiopatològiques. Participa en la regulació de la circulació sanguínia local, en la permeabilitat capil·lar, la contracció i la relaxació dels músculs i vasos sanguinis llisos, secreció d'àcid clorhídric a l'estómac, respostes d'hipersensibilitat immediata, processos al·lèrgics i inflamatoris com a part de la resposta immunològica a patògens externs, la curació de teixits, i la seva acció també s'ha observat com a neurotransmissor en el sistema nerviós.

La histamina és produïda per tots els éssers vius i és un component natural dels teixits. La principal font de histamina és el cos humà. La histamina s'elabora a partir d'histidina (Figura 8). S'emmagatzema en els grànuls secretors dels mastòcits, que són cèl·lules del sistema immunitari que es troben als teixits, i dels basòfils, que són cèl·lules granulades de la sang. A causa de determinats estímuls, s'allibera per exocitosi. Després de fer la seva funció fisiològica, s'excreta a través de l'intestí, sent degradada en passar per la mucosa intestinal per la diamino oxidasa, expressada per les cèl·lules d'aquest teixit.

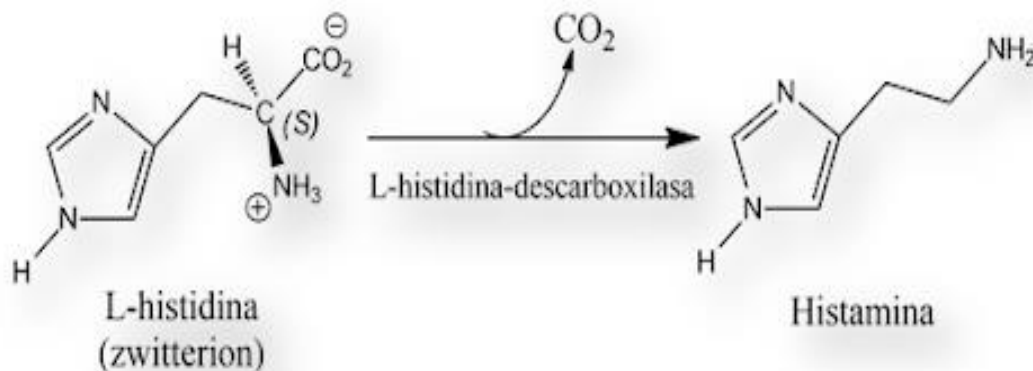


Figura 8. Síntesi de la histamina a partir de la histidina. Autor: Dr. José Manuel López Tricas, 2020.

Una de les principals funcions de la histamina endògena és la seva intervenció en el sistema immunitari, produint reaccions al·lèrgiques..

L'actuació de la histamina dins del nostre cos no és específica, ja que hi ha quatre tipus de receptors de la histamina (H1, H2, H3, i H4) en diferents àrees.

- El tipus **H1** està situat a la membrana de les cèl·lules musculars llises, als vasos sanguinis, bronquis i al tracte intestinal, al teixit de conducció cardíaca, en algunes cèl·lules secretores i en les terminacions nervioses sensorials. El gen que el codifica es troba en el braç curt del cromosoma 3 (3p).
- Els receptors **H2** es troben principalment a la membrana de les cèl·lules parietals a la mucosa gàstrica, a les cèl·lules dels vasos sanguinis, a les cèl·lules miocàrdiques i al nus sinusal, als basòfils i als mastòcits on actuen com autoreceptors. Són codificats per un gen que es troba en el braç llarg del cromosoma 5 (5q).
- Dels **H3** n'hi ha una baixa densitat, però s'ha detectat la presència d'aquest tipus en diversos teixits d'òrgans com el pulmó, l'estómac, l'intestí i el pàncrees. El seu gen es troba en el braç curt del cromosoma 20 (20p).
- Els **H4** estructuralment són molt semblants als receptors H3, però codificats en un lloc diferent (a la regió 11.2 del braç llarg del cromosoma 18, (18q 11.2)). Tenen una distribució més àmplia fora del sistema nerviós central: medul·la òssia, monòcits, limfòcits, granulòcits, melsa, fetge i còlon. Estimulen la quimiotaxis directament d'eosinòfils i cèl·lules encebades, i indirectament de neutròfils i de limfòcits T. Probablement en un futur es puguin trobar formes de modificar l'acció d'aquests receptors per disminuir la inflamació en la resposta al·lèrgica.

El sistema nerviós central (SNC) té els tres receptors a les neurones histaminèrgiques.

La segona font d'histamina és la derivada dels aliments i pot representar més problemes, ja que la seva regulació depèn de la persona. Si es produeix alguna alteració del seu metabolisme i no es mantenen les concentracions normals d'histamina en sang (50-70 mg / l), la lliure circulació d'aquesta amina en concentracions altes desencadena efectes indesitjables, com migranya, fibromiàlgia, astènia i atòpia.

2.1.2. RUTA DE LA HISTAMINA DINS DE L'ORGANISME.

EL METABOLISME

En el **metabolisme de la histamina**, l'enzim DAO hi té un paper important. La histamina és degradada per aquest enzim per convertir-se en N-acetil aldehyd imidazol. L'activitat enzimàtica baixa fa que es produeixi una acumulació d'amina a les cèl·lules de la mucosa intestinal. Aleshores, la histamina que prové de l'aliment i que generalment es considera normal, no es metabolitza, augmenta la seva concentració a la llum intestinal i es produeix l'absorció transepitelial d'aquest excés d'histamina exògena.

Tots els aliments, des del moment que entren per la cavitat oral, estan compostos per substàncies nutritives que requereixen metabolització per a la seva posterior absorció o excreció. La histamina, molècula que es troba en tots els aliments, ja siguin d'origen animal o vegetal, també ha de ser metabolitzada per poder-se eliminar per l'orina sense inconvenient.

Es coneixen dues rutes importants del metabolisme de la histamina en els éssers vius, on participen els enzims histamina-N-metiltransferasa (HMT) i diamino oxidasa (DAO) (Figura 9).

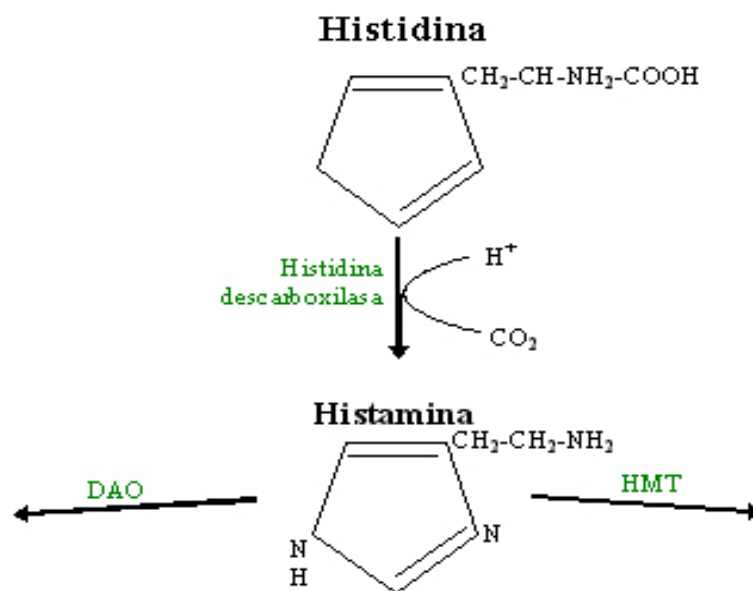
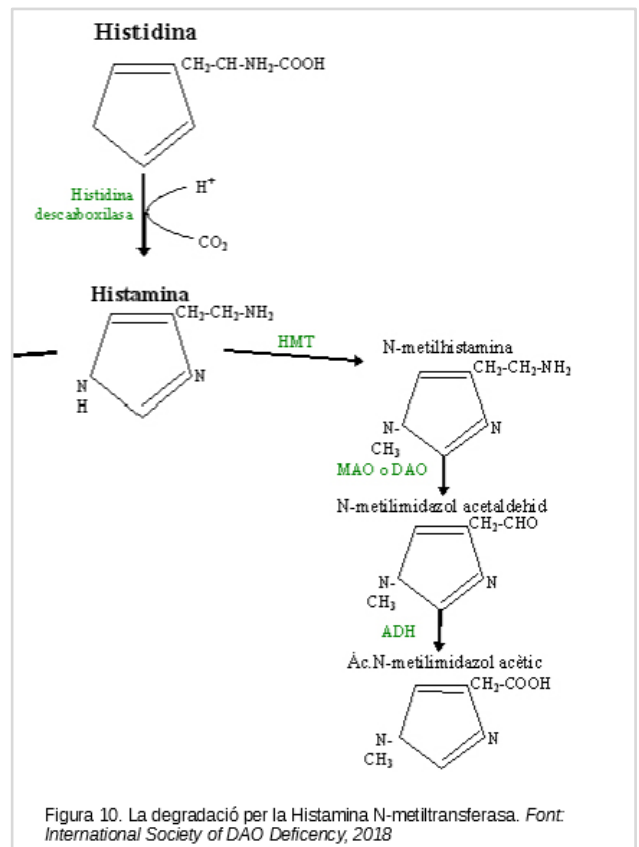


Figura 9. Les dues rutes importants del metabolisme de la histamina. Font: *International Society of DAO Deficiency*, 2018

Degradació per la Histamina-N-metiltransferasa (HMT o HNMT)

L'enzim HMT és el que degrada la histamina en el teixit hepàtic, però també s'expressa en molts altres teixits encara que en menor quantitat. Molts estudis estableixen una escassa relació de la HMT en el metabolisme de la histamina en la mucosa intestinal, ja que la seva activitat és gairebé insignificant comparada amb l'activitat de l'enzim DAO (Figures 10 i 11).

L'enzim HMT modifica l'anell de la histamina. Després, gran part del producte, N-metilhistamina, es transforma per la monoamino oxidasa (MAO) en N-metilimidazol acetaldehid i finalment l'enzim aldehid deshidrogenasa (ADH) el transforma en àcid N-metilimidazol acètic (Figura 10).



La histamina-N-metiltransferasa és una proteïna citosòlica i per tant només pot degradar la histamina a l'espai intracel·lular de les cèl·lules. La seva capacitat per metabolitzar la histamina és menor a la ruta de la diamin oxidasa, la qual juga un paper en la inactivació i eliminació de la histamina extracel·lular. Les patologies relacionades amb elevada concentració d'histamina en sang s'associen al dèficit de DAO i no de HMT.



Figura 11. Funcions de l'enzim HMT. Font: Dr. Healthcare

Degradació per la diamino oxidasa (DAO)

La histamina pateix una desaminació oxidativa catalitzada per la DAO. Els productes són l'àcid imidazol acètic i el seu ribòsid. Els dos metabòlits de la ruta de la histamina, l'àcid imidazol acètic i l'àcid N-metilimidazol acètic (de la ruta de la HMT) tenen poca activitat i són eliminats per l'orina (Figura 12).

La DAO és l'enzim amb major rellevància en el metabolisme de la histamina. També té una petita participació en el teixit hepàtic. Majoritàriament es localitza en l'epiteli intestinal, zona on s'absorbeix la histamina i la DAO realitza la seva degradació. La DAO localitzada al fetge controla el pas de la histamina cap a la circulació sistèmica i quan es troba en el ronyó, on també hi trobem la DAO, degrada la histamina reabsorbida en el túbul proximal.

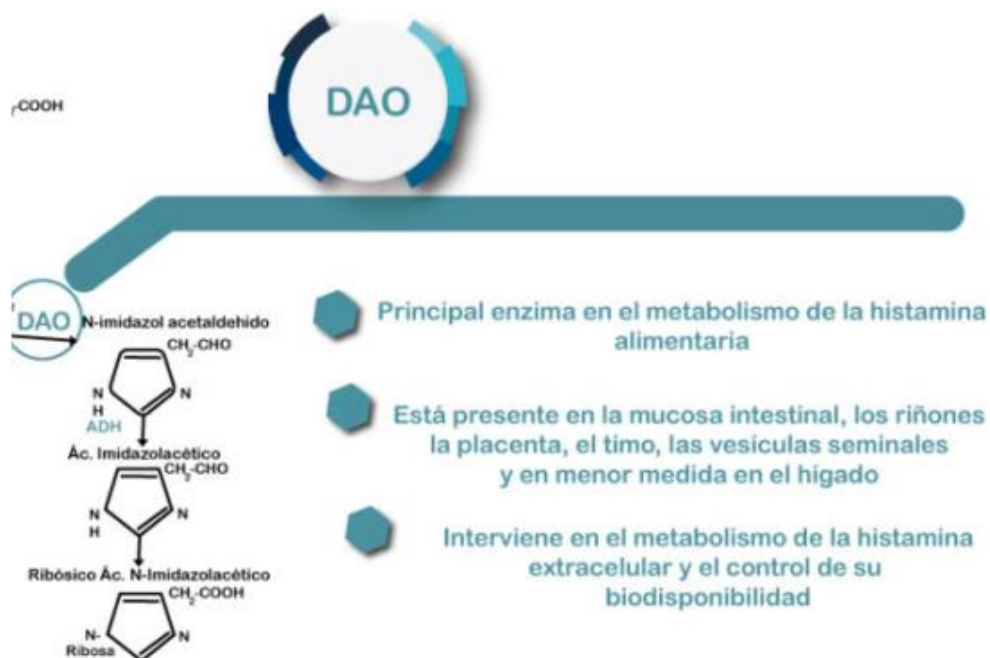
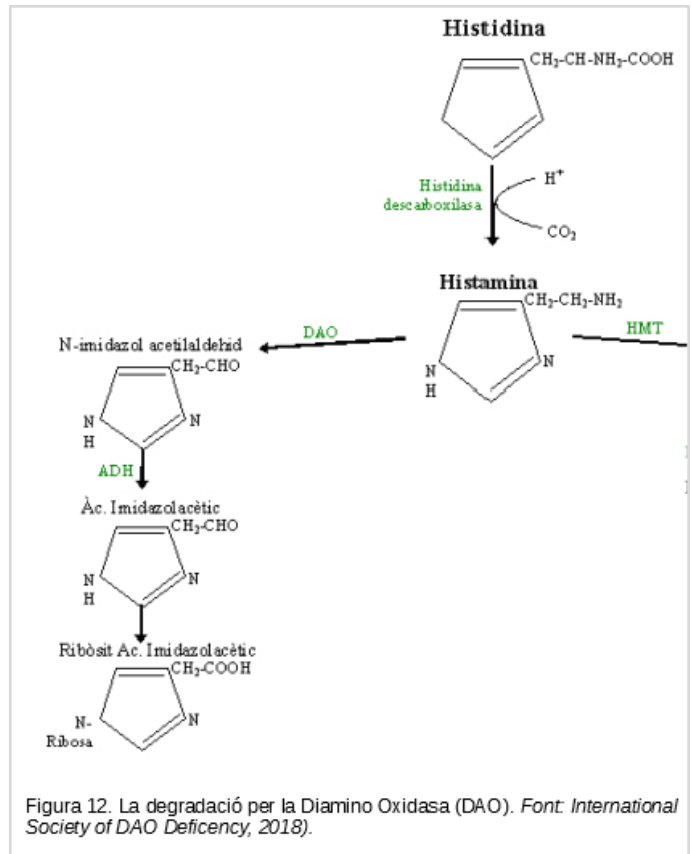


Figura 13. Funcions de l'enzim DAO. Font: Dr. Healthcare

2.2. L'ALIMENTACIÓ I LA HISTAMINA

La dieta s'ha de considerar tenint en compte tant la quantitat d'histamina que contenen cada un dels aliments, com també els que siguin capaços d'alliberar-ne o que continguin altres amines, com putrescina o cadaverina, que competeixen amb la histamina per ser degradades per la DAO. Aquestes amines les podem trobar en productes fermentats, com el formatge, alcohol, carns, o vegetals (Figura 14).

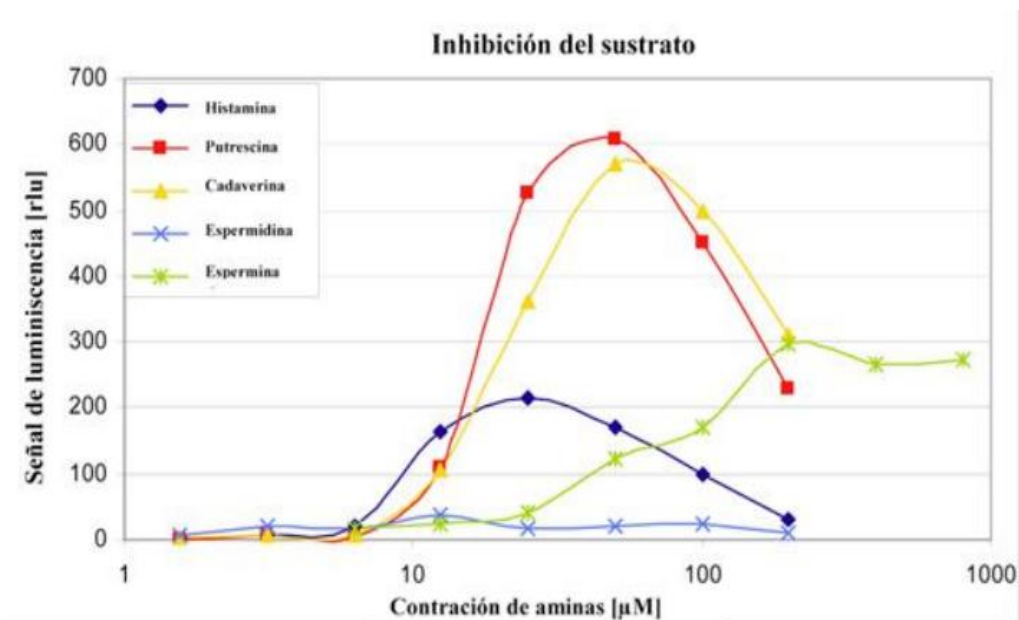


Figura 14. Podem observar les amines més competitives amb la histamina per ser degradades per la DAO, la putrescina i la cadaverina. Font: International Society of DAO Deficiency.

Les substàncies del gràfic (Figura 14) es poden mesurar a partir de la sang del pacient. Ens mostra la inhibició de l'acció de la DAO per competició de cada substrat.

La histamina i les altres amines són **biogèniques**, i aquestes es formen en els aliments a partir d'uns aminoàcids precursors, per l'acció de l'enzim descarboxilasa que prové dels microorganismes. La histamina prové de la histidina, la cadaverina de la lisina i la putrescina de l'ornitina i l'arginina.

2.2.1. L'AUGMENT DE LA HISTAMINA EN ELS ALIMENTS

S'han de complir certes condicions per a que la histamina pugui acumular-se dins dels aliments. Hi ha d'haver el creixement dels microorganismes amb activitat **descarboxilasa**, hi ha d'haver **aminoàcids precursors**, i que les condicions ambientals siguin propícies per la síntesi i l'activació de les **descarboxilases**.

Així doncs, si volem que aquestes amines, en el nostre cas la histamina, apareguin als nostres aliments, és més fàcil si estan crus, que no hagin estat emmagatzemats i refrigerats correctament, o si es produeix la fermentació. En el moment en que couem els aliments, passen a contenir una menor quantitat d'histamina i altres amines com la tiramina.

També hi ha moltes bactèries que poden contaminar el menjar i que són productores d'histamina. D'aquesta manera, l'activitat de la **histidina descarboxilasa**, que és la responsable de la producció de la histamina, continua encara que mori el microorganisme.

2.2.2. COM INFLUENCIEN ELS ALIMENTS EN L'AUGMENT DE LA HISTAMINA

Existeixen aliments rics en histamina, com per exemple el peix blau, amb unes xifres de 15 a 20 mg/kg. N'hi ha altres que són alliberadors de la histamina, com el cas de l'alcohol, cítrics, kiwis, salsa de tomàquet, porc, maduixes, marisc... Alguns altres bloquegen l'enzim DAO, com el cas de l'alcohol. I finalment, hi ha aliments rics en altres amines biògenes com la cadaverina o la putrescina que interactuen més ràpid amb la DAO. Són el formatge, la cervesa o el vi (Figura 15).

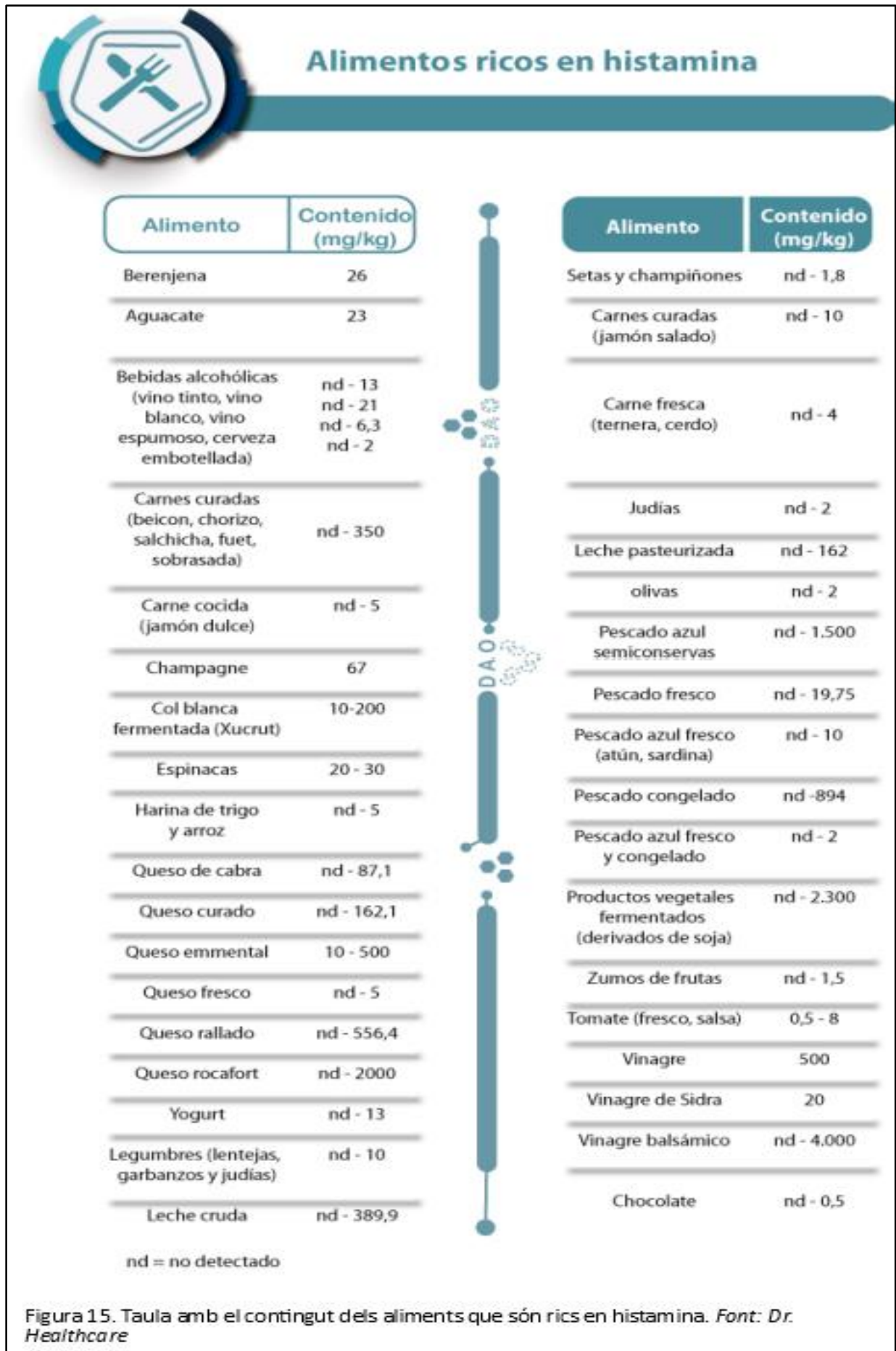


Figura 15. Taula amb el contingut dels aliments que són rics en histamina. Font: Dr. Healthcare

Els aliments els podem distingir segons si produeixen una acumulació d'histamina a l'organisme, o si afavoreixen la seva concentració encara que no siguin rics en histamina.

La culpa, però, no la tenen els aliments, excepte si és el cas d'una intoxicació per histamina que pot aparèixer en productes com la tonyina. El problema està en la persona ja que moltes vegades tenen dèficit DAO o es secreta un excés d'histamina endògena. Per això, l'única manera d'evitar els símptomes relacionats amb l'augment de la histamina és la indigestió d'alguns aliments, controlant els que en tenen. A part d'això, també s'han de considerar aquells aliments que bloquegen l'enzim DAO, o els que alliberen la histamina.

El peix és l'implicat en la majoria de processos de intoxicació per histamina, sobretot la tonyina, el bonítol o verat. Poden arribar a tenir concentracions de fins a 500 mg/kg per peix. Després del peix, va el formatge, molt implicat en alguns quadres clínics per histamina.

L'acumulació de la histamina en els aliments la podem controlar seguint una bona higiene alimentaria per limitar la contaminació dels aliments per microorganismes aminogènics. La temperatura i el temps són el major factor de risc per a la formació de la histamina. Per tant, refrigerar els aliments a temperatures vora els 0° pot ser el mètode més efectiu.

Segons la seva fermentació o conservació, les quantitats de histamina en els aliments varia. Les carns i peixos, o aliments i begudes elaborats per fermentació o maduració, poden presentar uns valors més alts de histamina ja que es deterioren microbiològicament amb facilitat.

Els nivells d'histamina en els aliments es consideren baixos si presenten concentracions de fins a 5 mg/kg de menjar, es consideren moderats de 5-20 mg/kg, i per sobre de 20 mg/kg es considera elevat.

2.2.3. ELS ALIMENTS QUE BLOQUEGEN L'ENZIM DAO

Es tracta d'un grup d'aliments en el que destaquen les begudes alcohòliques; les destil·lades (com els licors, per exemple), el vi, la cervesa i el cava (begudes fermentades). Les begudes alcohòliques contenen unes amines biògenes que són la histamina, la cadaverina o putrescina. Quan es degrada l'alcohol, produeix una sèrie de metabòlits (com l'acetaldehid) que competeixen amb els metabòlits de la histamina (com el N-imidazol) per l'enzim aldehid deshidrogenasa, implicat en la degradació de l'alcohol i la histamina. Els metabòlits de l'alcohol actuen més ràpid, de manera que els metabòlits derivats de la histamina s'acumulen i arriben a inhibir la DAO, augmentant la histamina de la sang.

Això produeix la ressaca, amb cefalea, nàusees, vòmits,... que són símptomes deguts a la histamina encara que la persona expressi la DAO de manera normal.

Alguns altres bloquejadors de la DAO serien el cafè, el té, el cacau, i les begudes energètiques.

Una vegada s'ha diagnosticat el nivell d'histamina, cal indicar els aliments que s'haurien de consumir segons el seu contingut d'histamina. La següent taula (Figura 16) ens mostra el contingut d'histamina en els diferents aliments.

ALIMENTOS	Bajo contenido	Contenido medio	Alto contenido
Lácteos	Queso fresco	Mantequilla	Leche, yogur, quesos fermentados
Cereales	Avena, arroz, resto cereales	Trigo	Pan con levaduras artificiales. Pizza industrial
Legumbres	Todas	-	Soja
Frutas	Manzana, melón sandia, melocotón, ciruela	Fresas, plátano	Cítricos, kiwi
Verduras	Frescas	Calabacín, espinaca, berenjena o tomate	Col fermentada
Pescado	Pescado blanco	Pescado azul	Marisco. atún y anchoas en conserva Salmón ahumado
Carnes	Fresca. Pollo , pavo.	Jamón cocido o de pavo	Embutidos, cerdo
Huevos	Yema	Clara cocida	Clara cruda
Grasas	Aceite de oliva o girasol	Mantequilla	Cacao y frutos secos (nueces, cacahuetes)
Bebidas	Te verde	Zumos cítricos, te negro, bebidas energéticas	Bebidas alcohólicas
Dulces	Repostería casera, edulcorantes	Mermelada	Bollería industrial, azúcar refinada
Otros	Espicias, y hierbas aromáticas	Vinagre de manzana	Vinagre balsámico, mostaza, salsa de soja, curry, glutamato

Figura 16. Taula amb la quantitat d'histamina dels aliments. Font: *International Society of DAO Deficiency*.

Per tant, en el cas de tenir migranya degut a un augment d'histamina exògena, podríem evitar tots aquells aliments amb elevat contingut d'histamina durant unes setmanes, i segons l'evolució tornar-los a incloure a poc a poc i progressivament. També es pot ajudar utilitzant suplements de vitamina C o B, que ajuden a augmentar l'activitat de la DAO. Tot i això, s'ha comprovat que el més efectiu és seguir una dieta lliure d'histamina.

2.2.4. SUPLEMENTACIÓ DE DAO

En estudis sobre la migranya, s'ha comprovat que donant un suplement de DAO es milloren els símptomes. En aquests estudis s'utilitzen unes càpsules de DAO. Aquestes fan que augmenti la seva concentració a l'intestí prim i, per tant, la capacitat de degradar la histamina. Amb això, s'accelera el processament en el tub digestiu de la histamina present en els aliments, que és la desencadenant de tots els símptomes.

Els estudis destaquen que el suplement de DAO no elimina totalment la simptomatologia, però sí que es millora la qualitat de vida dels pacients, en el cas de la migranya. Per tant, destaquen que el millor benefici és utilitzar el suplement DAO juntament amb la dieta baixa en histamina.

A la següent Figura es pot observar com la suplementació de DAO pot disminuir la simptomatologia produïda per l'augment d'histamina.

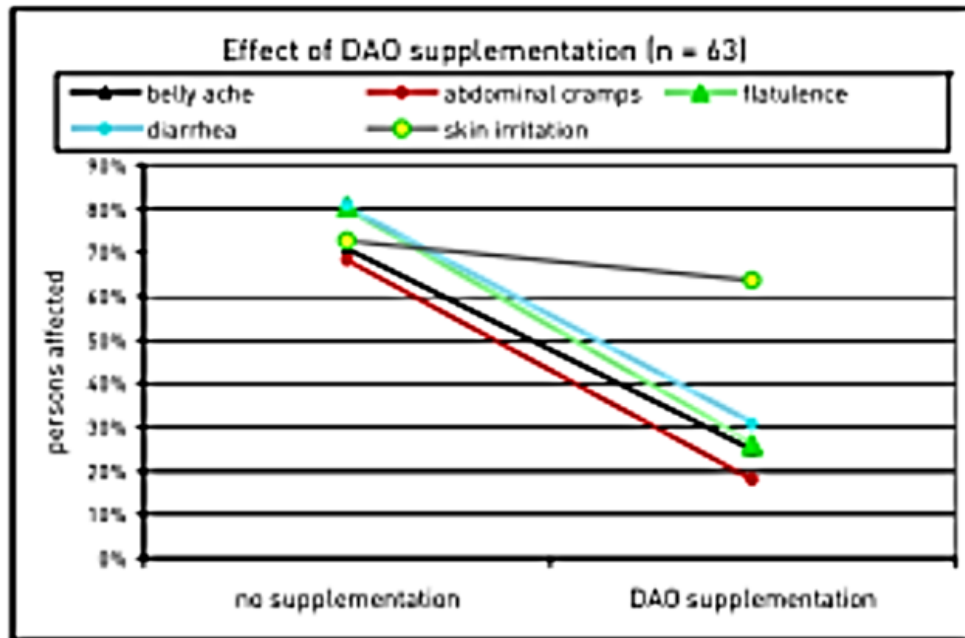


Figura 17. L'efecte del suplement DAO sobre la simptomatologia de la migranya. Font: [Adrian Aduelo](#). Com.

COS DEL TREBALL

OBJECTIUS

En aquest treball m'he proposat consta dels següents objectius:

1. Buscar informació a la base de dades molecular del Centre Nacional d'Informació de Biotecnologia (NCBI) sobre la localització cromosòmica i les característiques estructurals del gen que codifica la DAO.
2. Estudiar la variabilitat de les seqüències del gen DAO en diverses espècies de vertebrats i comprovar si l'evolució del gen es correspon amb la filogènia de les espècies estudiades. És a dir, m'agradaria arribar a saber la importància d'aquesta proteïna en el nostre cos i l'evolució que ha tingut aquest gen al llarg del temps, si hi ha hagut grans variacions o no. També poder observar la variabilitat del gen en espècies molt diferents.
3. Estudiar algunes de les mutacions i el patró hereditari de la deficiència de la DAO a través d'algunes proves realitzades a membres de la meua família. D'aquesta manera podria assegurar-me de que sigui realment la deficiència de la DAO el que m'ha provocat els episodis de migranya.
4. Ampliar els meus coneixements sobre el gen DAO i que això em permeti ajudar a la gent que pateix el dèficit de DAO i no n'és conscient, en aquest cas, especialment la meua família.

PART EXPERIMENTAL

Metodologia

1. ANÀLISI DE LES SEQÜÈNCIES DE GEN DE L'ENZIM DAO

1.1 Obtenció de seqüències de DNA i proteïnes de la base de dades molecular Genbank.

Per estudiar l'evolució del gen DAO he obtingut seqüències corresponents a diferents espècies utilitzant la pàgina web “**Genbank**” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, Figura 18). Es tracta d'una pàgina oficial i gratuïta on hi podem trobar totes les seqüències publicades de gens, de proteïnes i de genomes, que hi han. Són totes públiques. Qualsevol estudi de biologia molecular que es dugui a terme, obligatòriament ha de dipositar la seqüència en aquesta base de dades per a que pugui ser publicat.

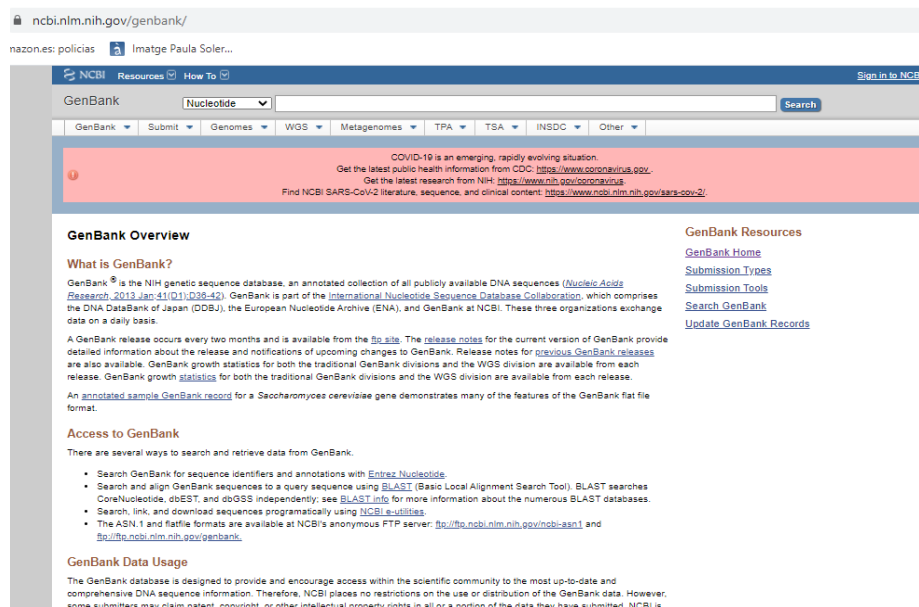


Figura 18. Genbank, la pàgina web que he utilitzat per obtenir les seqüències del gen.

Per a cercar les seqüències del gen DAO, m'he assegurat de que estigui posada l'opció “nucleotide” al costat esquerre del cercador de Genbank. A continuació, com que m'interessa trobar la seqüència d'aquest gen en l'espècie humana, he introduït en el cercador “D-amino acid oxidase” AND “Homo sapiens”. A continuació he anat a “orthologs”, on se m'han obert un gran llistat de diverses espècies.

0 items

Genes Literature

SEARCH THE TAXONOMY TREE

Enter taxonomic name

Craniata

vertebrates

245 genes for: Craniata

Add to cart Protein alignment Download

0 selected.

Species	Gene	Architecture	aa
<input type="checkbox"/> <i>Homo sapiens</i> human	DAO D-amino acid oxidase		347
<input type="checkbox"/> <i>Mus musculus</i> house mouse	Dao D-amino acid oxidase		345
<input type="checkbox"/> <i>Sus scrofa</i> pig	DAO D-amino acid oxidase		347
<input type="checkbox"/> <i>Rattus norvegicus</i> Norway rat	Dao D-amino acid oxidase		346
<input type="checkbox"/> <i>Xenopus tropicalis</i> tropical clawed frog	dao D-amino acid oxidase		368
<input type="checkbox"/> <i>Bos taurus</i> cattle	DAO D-amino acid oxidase		351
<input type="checkbox"/> <i>Macaca mulatta</i> Rhesus monkey	DAO D-amino acid oxidase		347
<input type="checkbox"/> <i>Canis lupus familiaris</i> dog	DAO D-amino acid oxidase		358

RefSeq transcripts (2) RefSeq proteins (2) Architecture aa

Figura 19. La llista d'espècies que et surt després de clicar “orthologs”.

En el cas de la nostra espècie, clicant sobre “Homo sapiens”, apareixen diferents informacions: la longitud del gen (1694 nucleòtids) o la classificació taxonòmica de la nostra espècie, des del gran domini que és Eucariota fins al gènere, en aquest cas, *Homo* (Figura 20).

Homo sapiens D-amino acid oxidase (DAO), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001917.5

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS NM_001917 1694 bp mRNA linear PRI 04-JUL-2020
 DEFINITION Homo sapiens D-amino acid oxidase (DAO), mRNA.
 ACCESSION NM_001917
 VERSION NM_001917.5
 KEYWORDS RefSeq; MANE Select.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM *Homo sapiens*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1694)
 AUTHORS Fragoza R, Das J, Wierbowski SD, Liang J, Tran TN, Liang S, Beltran
 JF, Rivera-Erick CA, Ye K, Wang TY, Yao L, Mort M, Stenson PD,
 Cooper DN, Wei X, Keinan A, Schimenti JC, Clark AG and Yu H.
 TITLE Extensive disruption of protein interactions by genetic variants
 across the DAO gene in human populations

Figura 20. Informacions que et surten al clicar “Homo sapiens”.

Més avall hi apareix la seqüència del gen:

```

1  gcactccagt ccgggctggc ggacagaggg ctggaaacaa gacgctccag aatcaggagc
61  ttccccctcag gaaatagcat cctgtgtccc cgcactgcag ttgtctggtc tctccagcag
121 tttggctactt ccggctgctg caatgcgtgt ggtggtgatt ggagcaggag tcatcgggct
181 gtccaccgcc ctctgcatcc atgagcgcta ccactcagtc ctgcagccac tggacataaa
241 ggtctacgcg gaccgcttca cccactcac caccaccgac gtggctgccg gcctctggca
301 gccctacctt tctgaccca acaaccaca ggaggcggac tggagccaac agaccttga
361 ctatctcctg agccatgtcc attctccaa cgctgaaaac ctgggcctgt tctaatctc
421 gggctacaac ctcttccatg aagccattcc ggacccttcc tggaggaca cagttctggg
481 atttcggaag ctgaccccca gagagctgga tatgttccca gattacggct atggctggtt
541 ccacacaagc ctaattctgg agggaaagaa ctatctacag tggctgactg aaaggttaac
601 tgagagggga gtgaagtctt tccagcggaa agtggagtct tttgaggagg tggcaagaga
661 aggcgcagac gtgattgtca actgcactgg ggtatgggct ggggcgctac aacgagaccc
721 cctgctgcag ccaggccggg ggcagatcat gaaggctggc gcccttggc tgaagcactt
781 cattctcacc catgaccag agagaggcat ctacaattcc ccgtacatca tcccagggac
841 ccagacagtt actcttgag gcatcttcca gttgggaaac tggagtgaac taaacaatat
901 ccaggaccac aacaccattt gggaaggctg ctgcagactg gagccacac tgaagaatgc
961 aagaattatt ggtgaacgaa ctggcttcg gccagtacgc cccagattc ggctagaaag
1021 agaacagctt cgactggac cttcaaacac agaggctatc cacaactatg gccatggagg
1081 ctacgggctc accatccact ggggatgtgc cctggaggca gccaaactct ttgggagaat
1141 cctggaagaa aagaaattgt ccagaatgcc accatccac ctctgaagac tccagtact
1201 gctgcctccc ccacaagaa ctcccttctc ccctcagcca atgaatcaat gtgctccttc
1261 ataagccatt gcttctccct cacttcttct ctcaaagaag catgaggtga gagaaagcca
1321 caaagtcagt gcctggagaa gggttcagcc caacatgggg cccctctcat cactgaaatc
1381 cctctacctt ctctgggtct ggcattataa agaacagctg aggctgtcat tccatgagtc
1441 ttcagaagaa aggacagctc agaaaatcaa agaggccaac tgcccagagc cacagaaaat
1501 ggaggataat tgaggctaag taacctgatt acaagttgta ctaacatatt aaaggttctg
1561 aaaagtcctg cagcaaagac aactatctga tgttggttaa ccagtgctt gctaaacct
1621 tctggctatg gaactctttt gccagagca cccatgaatg ccatgacaca aatctgagaa
1681 aatgctggaa caga

```


Tot i haver-nos dit anteriorment que s'ha obtingut a partir d'una molècula de RNA, podem veure que la seqüència és de DNA ja que té timina (T) en comptes d'uracil (U). Això és degut a que s'utilitza com a conveni la seqüència de DNA de la cadena no motlle, tal com a la Figura 21 es pot veure.

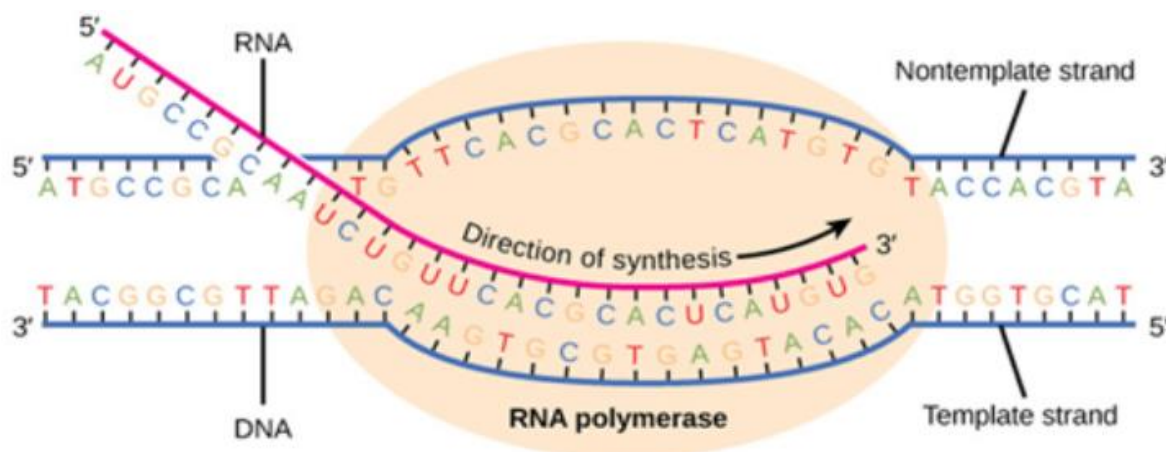


Figura 21. L'esquema mostra les dues cadenes complementàries del DNA, que són les blaves, i la bombolla de transcripció (zona taronja). L'RNA polimerasa està sintetitzant l'RNA missatger. La cadena utilitzada per l'RNA polimerasa com a motlle per fer l'RNA missatger és la de sota, l'orientada de l'extrem 3' al 5'. Aleshores, la que hauria de sortir al Genbank és la rosa, però hi apareix la blava, la seqüència del DNA orientada de 5' a 3' o cadena no motlle. Això és degut a que aquesta web inclou seqüències de DNA. Tot i això, tan sols hi ha el petit canvi de la timina per l'uracil.

Un tros més amunt de la seqüència nucleotídica del gen, hi apareix la seqüència proteica de l'enzim DAO. Cada lletra d'aquestes representa un aminoàcid.

"MRVVVIGAGVIGLSTALCIHERYHSQLPLDIKVYADRFTPLTT

TDVAAGLWQPYLSDPNNPQEADWSQQTFDYLLSHVHSPNAENLGLFLISGYNLFHEAI

PDPSWKDTVLGFRKLTPRELDMFPDYGYGWFHTSLILEGKNYLQWLTERLTERGVKFF

QRKVESFEEVAREGADVIVNCTGVWAGALQRDPLLQPRGQIMKVDAPWMKHFILTHD

PERGIYNSPYIIPGTQTVTLGGIFQLGNWSELNNIQDHNTIWECCCRLEPTLKNARI

GERTGFRPVRPQIRLEREQRLTGPSNTEVIHNYHGGYGLTIHWGCALEAAKLFGRIL

EEKKLSRMPPSHL"

Si tornem a la seqüència nucleotídica original de 1694 nucleòtids que hem vist abans, hem de saber que no tota correspon a aquesta seqüència proteica. Tot i que les regions intròniques han estat eliminades i, per tant, hi queden els exons, encara hi resten fragments no codificants.

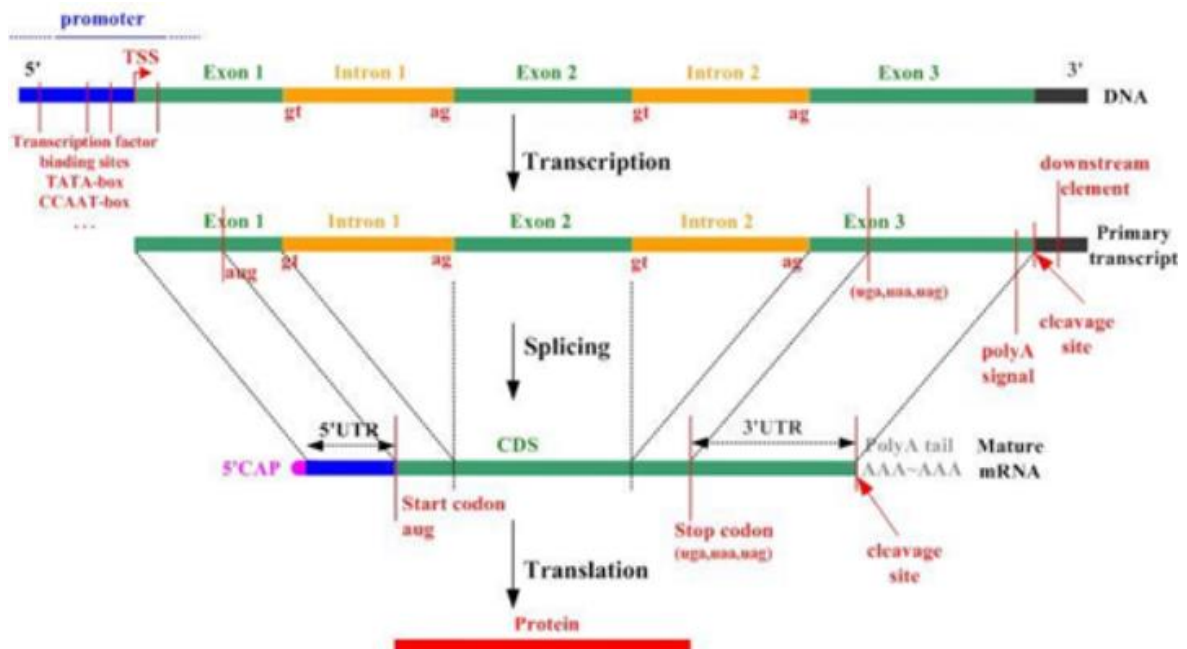


Figura 22. Podem observar les diferents parts que hi ha en una seqüència d'un gen que inclou les regions exòniques (verd) i les intròniques (groc). Una vegada el gen es transcriu, s'obté un RNA heterogeni nuclear (RNAhn) o transcrit primari immadur. Durant el procés de maduració, els introns són eliminats. Si ens mirem la cadena de RNA ja madura (la 3ra començant per dalt), la regió codificant (CDS), és a dir, la part de la seqüència que porta la informació per als aminoàcids està limitada en els extrems per una regió 5' UTR i per una regió 3' UTR, les quals no es tradueixen a proteïna. Simplement són una part de l'RNA que l'hi donen estabilitat i també l'ajuden a sortir del nucli i arribar al citoplasma. Font: *biostars.org*

Per tant, per fer les anàlisis, he utilitzat la seqüència de la regió CDS (Figura 23).

```

ORIGIN
1  gcactccagt cccggctggc ggacagaggg ctggaacaaa gacgtccag aatcaggagc
61  ttccctcag gaaatagcat cctgtgtccc cgcactgcag ttgtctgttc tctccagcag
121  ttgtgtactt cccgctgctg cactgtgtgt agtggatgatt ggagcaggag tcatcgggct
181  gtccaccgcc cctgtcatcc atgagcgcta cactcagtc ctgcagccac tgcacataaa
241  ggtctacgag gacgcttcca cccactcac caccacgcag ttggctgccg gcctctggca
301  gccctacatt tctgacccca acaaccaca ggagcgggac tggagccaac agaccttga
361  ctatctctgt agccatgtcc atttcccaa cgtgaaaaa ctgggctgtg tctaatctc
421  gggtacaaac ccttccatg aagccattcc ggaccttccc tggaaagaca cagttctggg
481  atttcggaag ctgaccccca gagagctgga tatgttccca gattacggct atggctggtt
541  ccacacaagc ctaattcttg aggaaagaa ctatctacag ttgctgactg aaagcttaac
601  tgagagggga gtgaagtctt tccagcgaa agtggagctt tttagagagg tggcaagaga
661  aggcgcagac gtgattgtca actgcactgg agtatggact gggcgctac aacgagaccc
721  cctgtctgag ccaggccggg ggcagatcat gaaggtgac gcccttga tgaagcctt
781  cattctccc catgcccag agagagcct ctacacatcc cctacatca tccacagaa
841  ccagacagtt actcttgag gactctcca gtgggaac tggagtgaac taacaatat
901  ccaggaccac aacacattt ggg
961  aagaattatt ggtgaacgaa ctg
1021  agaacagctt cgcactggac ctt
1081  ctacgggctc accatcact ggg
1141  cctggaagaa aagaattgt cca
1201  gctgctccc cccacaagaa ctc
1261  ataagccatt gcttccctc cac
1321  caaagtcagt gcttggagaa ggg
1381  cctctacatt cctctggctc ggc
1441  ttcagaagaa aggcagctc aga
1501  ggagataat tgagcttaag taa
1561  aaaagtcctg cagcaagac aac
1621  tctgctatg gaactctttt gcc
1681  aatgctgaa caga

//
143..1186
/gene="DAO"
/gene_synonym="DAOA; DAPOX; OXDA"
/EC_number="3.4.3.3"
/codon_start=1
/product="D-amino-acid oxidase"
/protein_id="NP_001088.3"
/db_xref="CCDS:CCDS9122.3"
/db_xref="GeneID:1618"
/db_xref="HGNC:12671"
/db_xref="MIM:124958"
/translation="MRVVVIGAGVIGLSTALCDHERYHSLQPLDIXVYAFRTPLTT
TDVAAGLMQPYLSDPNPQEAQNSQQTFDYLLSHVHSPNAENGLFLISGYNLFHEAI
POPSAKDTVLGFRKLTPRELMPDPYGYGWFHTSLILEGKNYLQNLTERLTERGVKFF
QRKVSFEVAREGADVIVNCTGVWAGALQRDLQPGRGQDHRVDAPMHFIILTHD
PERGIYNSPYIIPGTQTVTLGGIFQLGNHSLNNIQHNTINEGCRLLEPTLNARII
GERTGFRPQIRLEREQRLRQSPNTEVIHNYHGQGLTIHGCALAAKLFGRIL
EEKLSRMPSPSHL"

```

Figura 23. Seqüència del gen amb la part CDS subratllada.

A continuació, he copiat aquest fragment de seqüència i l'he exportat al programa **BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2** (<https://bioedit.software.informer.com/>). Abans, però, m'he apuntat el punt on comença (5' ATG, corresponent al codó d'inici AUG) i acaba (TGA-3' corresponent al codó STOP UGA) la seqüència CDS.

Una vegada he localitzat l'inici i la terminació de la seqüència CDS, he anat a dalt de tot de la pàgina de Genbank que conté la seqüència i he clicat on posa “**FASTA**”. D'aquesta manera he obtingut la part de la seqüència corresponent a la regió CDS, l'he copiat i passat cap al BioEdit.

Homo sapiens D-amino acid oxidase (DAO), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001917.5

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NM_001917.5 Homo sapiens D-amino acid oxidase (DAO), mRNA

```
GCACCTCCAGTCCGGGCTGGCGGACAGAGGGCTGGAAACAAGACGCTCCAGAATCAGGAGCTTCCCTCAG
GAAATAGCATCTGTGTCCCGCACTGCACTTGTCTGGTCTCTCCAGCAGTTTGGTACTTCCGGCTGCTG
CAATGCGTGTGGTGGTATTGGAGCAGGAGTCATCGGGCTGTCCACCGCCCTCTGCATCCATGAGCGCTA
CCACTCAGTCTGTCAGCCACTGGACATAAAGGTCTACGCGGACCGCTTCACTCCACTCACCACACCGAC
GTGGCTGCCGGCTCTGGCAGCCCTACCTTTCTGACCCCAACAACCCACAGGAGGCGGACTGGAGCCAAC
AGACCTTTGACTATCTCTTGAGCCATGTCCATTCTCCCAACGCTGAAACCTGGGCTGTCTCTAATCTC
GGGCTACAACCTCTTCCATGAAGCCATTCCGGACCCCTTCTGGAAGGACACAGTTCTGGGATTCGGAAG
CTGACCCCAAGAGAGCTGGATATGTTCCAGATTACGGCTATGGCTGGTTCACACAAGCCTAATTCTGG
AGGGAAGAATCTCTACAGTGGCTGACTGAAAGGTTAACTGAGAGGGGAGTGAAGTTCTTCCAGCGGAA
AGTGGAGTCTTTTGAGGAGGTGGCAAGAGAAGGCGCAGACGTGATTGTCAACTGCAGTGGGATGAGGCT
GGGGCGCTACAACGAGACCCCTGCTGAGCCAGGCGGGGCGAGATCATGAAGTGGAGCGCCCTTGGGA
TGAAGCACTTCTTCTCACCATGACCCAGAGAGAGGCACTACAATTCCTCCGATACATCCAGGGAC
CCAGACAGTTACTCTTGAGGCACTTCCAGTTGGGAACTGGAGTGAACATAAACAATATCCAGGACCA
AACACCATTTGGGAAGGCTGCTGAGACTGGAGCCCACTGAAGAATGAAGAATTATTGGTGAACGAA
CTGGCTTCCGGCCAGTACGCCCCAGATTCGGCTAGAAAAGAGACAGCTTCGCAGTGGACCTTCAAAAC
AGAGGTATCCCAACTATGGCCATGGAGGCTACGGGCTCACCATCCACTGGGGATGTGCCCTGGAGGCA
GCCAAGCTCTTTGGGAGAATCCTGGAAGAAAAGAAATTTGCCAGAATGCCACCATCCCACTCTGAAGAC
TCCAGTGACTGTGCTCCCTCCCAAGAACTCCCTTCTCCCTCAGCCCAATGAATCAATGTGCTCTTCA
ATAAGCATTGCTTCTCCCTCACTTCTTCTCAAGAAGCATGAGGTGAGAGAAAGCCACAAAGTCAGT
GCCGTGAGAAAGGTTGAGCCCAACATGGGGCCCTCTCATCACTGAAATCCCTCTACCTCTCTGGGTCT
GGCATTATAAAGACAGCTGAGGCTGTCTTCCATGAGTCTTCAGAAGAAGGACAGCTCAGAAAAATCAA
AGAGGCCAACTGCCAGAGCCACAGAAAATGGAGGATAATTGAGGCTAAGTAACCTGATTACAAGTTGTA
CTAACATATTAAAGGTTCTGAAAAGTCTGACGCAAGAGCAACTATCTGATGTTGTTAACCAGTGCTT
GCTAAACCTATCTGGCTATGGAACTCTTTGGCCAGAGCACCCATGAATGCCATGACACAAATCTGAGAA
AATGCTGGAACAGA
```

Figura 24. Seqüència de la regió CDS del gen sencera.

Per poder obtenir les seqüències d'altres espècies he tornat a la pàgina anterior, on hi havia tota la llista de diverses espècies i he fet una tria de les que volia estudiar a partir del seu nom científic i del grup de vertebrats al qual pertanyen (Taula 1, Figura 25). A continuació he clicat en la fletxa de la dreta de tot (marcat a la Figura 25) i se m'ha desplegat un menú on hi ha diverses seqüències de DNA (esquerra) i la seva equivalent de proteïna (dreta).

A Species Gene Architecture aa

0 selected.

Species	Gene	Architecture	aa
<input type="checkbox"/> <i>Homo sapiens</i> human	DAO D-amino acid oxidase		347
<input type="checkbox"/> <i>Mus musculus</i> house mouse	Dao D-amino acid oxidase		345
<input type="checkbox"/> <i>Sus scrofa</i> pig	DAO D-amino acid oxidase		347
<input type="checkbox"/> <i>Rattus norvegicus</i>	Dao		346

B Species Gene Architecture aa

0 selected.

Sequències de DNA

Sequències de proteïna

RefSeq transcript (4)	RefSeq protein (4)	Architecture	aa
NM_001917.5	NP_001908.3		347
XM_005268692.4	XP_005268749.1		325
XM_011538004.2	XP_011536906.1		347
XM_011538005.2	XP_011536907.1		347

Genome Browser InterPro

Figura 25. A, La fletxa marca la pestanya que s'ha de desplegar. B, Menú on hi trobem les seqüències del DNA a l'esquerra, i les seves equivalents de proteïna a la dreta.

Nom vulgar	Nom científic	Ordre	Codi d'accés (Accession number)
Humans	<i>Homo sapiens</i>	Primats	NM_001917.5
Ximpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Primats	AY398971
Ximpanzé pigmeu	<i>Pan paniscus</i>	Primats	XP_003832565.1
Orangutà	<i>Pongo abelii</i>	Primats	XP_024111820.1
Macaco	<i>Macaca mulatta</i>	Primats	XP_001103664.3
Porc senglar	<i>Sus scrofa</i>	Artiodactyla	M27089
Vaca/toro	<i>Bos taurus</i>	Artiodactyla	XP_015330977.1
Ovella	<i>Ovis aries</i>	Artiodactyla	XP_027812452.1
Ós bru	<i>Ursus arctos horribilis</i>	Carnivora	XP_026370843.1

Panda gegant	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Carnivora	XM_034639423.1
Gos	<i>Canis lupus</i>	Carnivora	XP_022266251
Gat domèstic	<i>Felis catus</i>	Carnivora	XP_006938717.2
Rata negra	<i>Rattus rattus</i>	Rodentia	XM_032886623.1
Uombat comú	<i>Vombatus ursinus</i>	Diprotodontia	XP_027720826.1
Coala	<i>Phascolarctos cinereus</i>	Diprotodontia	XP_020863714.1
Cuco	<i>Cuculus canorus</i>	Cuculiformes	XP_009558761.1
Falcó pelegrí	<i>Falco peregrinus</i>	Falconiformes	XP_005236585
Cigne negre	<i>Cygnus atratus</i>	Anseriformes	XM_035565767.1
Gall bankiva	<i>Gallus gallus</i>	Galliformes	XP_015131013.1
Al·ligàtor americana	<i>Alligator mississippiensis</i>	Crocodilia	XP_014454032.1
Llangardaix pirinenc	<i>Lacerta agilis</i>	Squamata	XM_033169378.1
Tortuga verda	<i>Chelonia mydas</i>	Chelonia	XM_007058330.2
Granota	<i>Xenopus tropicalis</i>	Anura	XM_031898383.1

Llampresa de mar	<i>Petromyzon marinus</i>	Petromyzontifo rmes	XM_032947067.1
---------------------	-------------------------------	------------------------	----------------

Taula 1. Llistat espècies estudiades pel gen DAO.

1.2 Alineament de seqüències amb el programa BioEdit v7.2

Un cop oberta l'aplicació Bioedit (<https://bioedit.software.informer.com/>), he seleccionat l'opció “New sequence” i hi he enganxat la seqüència sencera. He marcat que és una seqüència de DNA i li he posat un nom: “Homo sapiens DAO **NM_001917.5**”. Aquest número és el codi de Genbank que ens pot servir de referència si volem tornar a buscar la mateixa seqüència a la base de dades molecular.

Una vegada fet això, he seleccionat “Apply and close”. Per poder editar la seqüència he marcat l'opció “edit”, on hi posa “mode”. Llavors he intentat localitzar les regions que vull eliminar, les 5' i 3' UTR, de manera que quedi la CDS.

El meu objectiu en aquesta part ha estat obtenir la seqüència del gen en diferents espècies i veure com ha evolucionat al llarg de la història. Per exemple, si és una proteïna molt important, s'ha de preveure que en espècies molt diferents no hi hagi gaire variació. Potser, fins i tot ens podem trobar en algun cas concret d'espècie que evolucioni molt ràpid. Això dóna molta informació de sobre com aquesta proteïna ha evolucionat al llarg de la història del grup d'organismes que analitzem, i també ajuda a veure la importància fisiològica que pot tenir.

A continuació, he buscat la seqüència del gen d'una altre espècie al **Genbank**, posant al cercador el nom científic de l'espècie i anant a “Fasta”. Un cop ja he tingut la seqüència de DNA, he seguit el mateix procediment que amb l'anterior i l'he copiat al **Bioedit**, a sota de la de l'*Homo sapiens* (Figura 26).

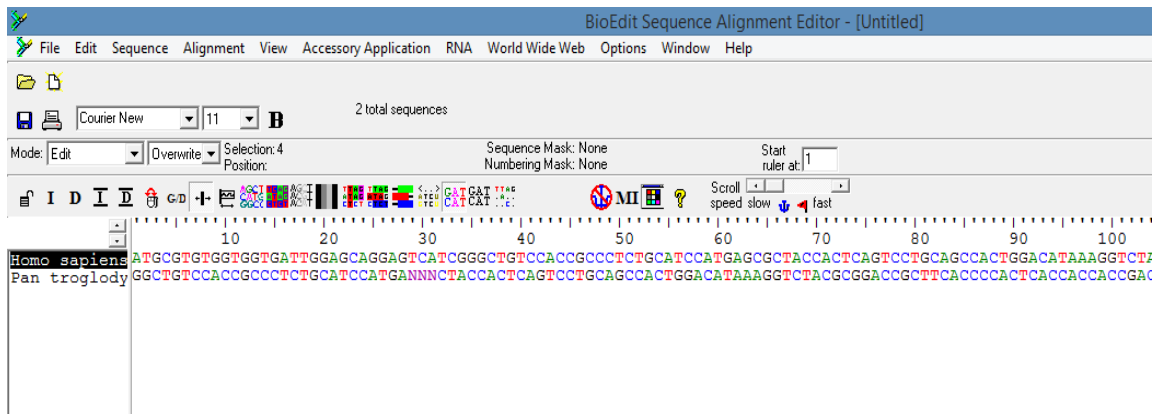


Figura 26. Les dues seqüències de gen d'espècies diferents col·locades al Bioedit.

Un cop he tingut les seqüències del gen introduïdes al Bioedit, m'he assegurat de que es corresponguin a les mateixes posicions l'una de l'altre. Per això he seleccionat les dues seqüències, anant a l'opció **“Accessory Application”** i **“ClustalW Multiple alignment”** (Figura 27). El clustal és un programa que té el Bioedit que serveix perquè les seqüències quedin completament alineades. A continuació seleccionem **“Run ClustalW”**. Ara ja estan alineades. Finalment, he anat repetint aquest procediment amb totes les altres seqüències de les altres espècies que he estudiat.

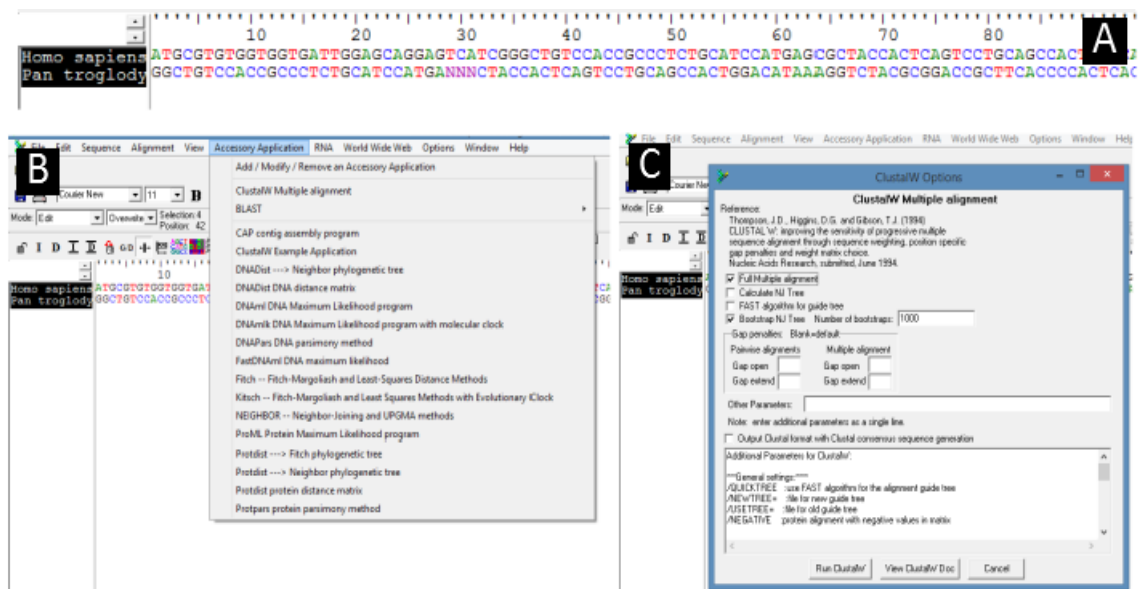


Figura 27. A, Les dues seqüències seleccionades. B, Selecció de **“Accessory Application”**. C, Selecció de **“ClustalW Multiple alignment”**.

Una vegada alineades les seqüències de totes les espècies, he volgut observar com de semblants o diferents són unes espècies de les altres. Així doncs, he clicat la icona de lletres i puntets que hi ha entre totes les eines. D'aquesta manera hi ha lletres que desapareixen i només ens quedem amb les lletres de la cadena on hi trobem la variabilitat, indicant les posicions polimòrfiques (Figura 28).

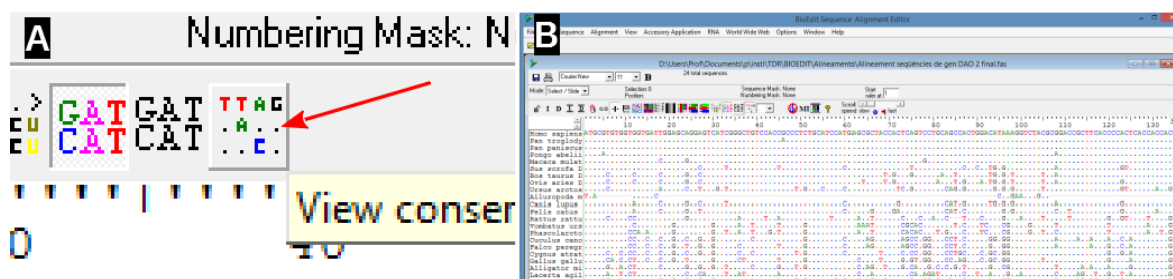


Figura 28. A, Icona que s'ha de clicar. B, Les lletres iguals a la seqüència principal han desaparegut, i les que tenen mutacions s'han mantingut.

1.3 Anàlisi de variabilitat i polimorfismes amb DnaSP v6.12.03

Un cop fets els alineaments del gen i de la proteïna amb el Bioedit, els he estudiat millor analitzant la gran varietat de mutacions que contenen. He utilitzat l'aplicació "**DnaSP** (<http://www.ub.edu/dnasp/>)". Primer de tot me l'he instal·lat (Figura 29).

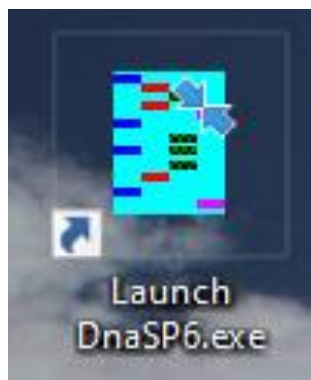


Figura 29.
Aplicació DnaSP
instal·lada.

Una vegada instal·lada, he hagut de tornar a obrir les seqüències de gen i de la proteïna amb el Bioedit ja que per analitzar-les amb el DnaSP necessitava passar-les a format FASTA. Per tant dins del Bioedit he obert l'alineament de seqüències del gen, he anat a “**save as**”, i on hi posa “tipus de fitxer” he seleccionat l'opció de “**Fasta (*.fas, *.fast, *.fsa)**”. Finalment he clicat “**Desa**”. Després he repetit el mateix amb l'alineament de proteïnes.

Una vegada he tingut els fitxers amb el format correcte, ja el he pogut estudiar amb el DnaSP. Per tant, he obert l'aplicació i he seleccionat on hi diu “**File**”, “**Open Data File...**”. Una vegada oberta, ens ha sortit un seguit d'informacions: número de nucleòtids que té la seqüència (1378), total de seqüències analitzades (24) i altres dades sobre el fitxer que no són rellevants pel meu estudi (Figura 30).

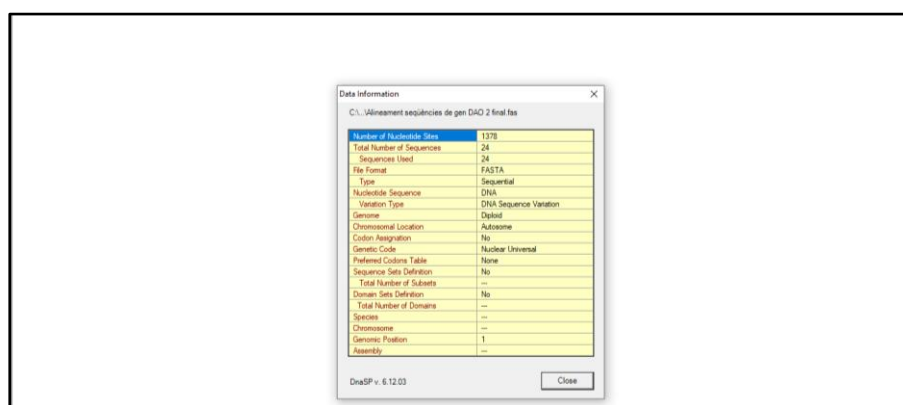


Figura 30. Informació que surt al obrir el fitxer de seqüències amb el DnaSP.

A continuació, he tancat aquest requadre i he anat cap a “**Data**”. He clicat l'opció “**Format**”. Se m'ha obert un altre requadre. Aquí m'he assegurat que tingués marcada les opcions “DNA”, “Diploid” i “Autosome”. Un cop he verificat que està bé, he clicat “**OK**”.

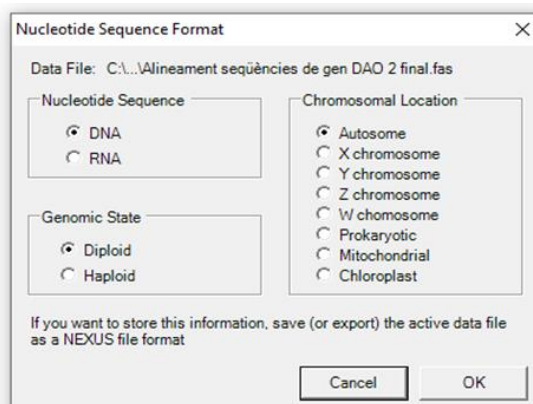


Figura 31. Requadre amb les opcions “DNA”, “Diploid” i “Autosome” marcades.

Lavors he tornat a clicar “Data”, i dins d’aquí “Assign Coding Regions”. En aquest requadre li he marcat al programa que és una regió codificant, és a dir, és una regió que porta informació per sintetitzar una proteïna. Comença en la posició número 1 i acaba en la 1378. A sota dona l’opció a marcar si correspon o no al primer nucleòtid del primer triplet, és a dir, el primer codó és l’ATG i si les altres seqüències comencen per ATG podem dir que totes comencen pel primer triplet del gen i per un nucleòtid de desoxiadenosina monofosfat (A). Per tant he marcat l’opció “1”. Finalment cliquem “OK” (Figura 32).

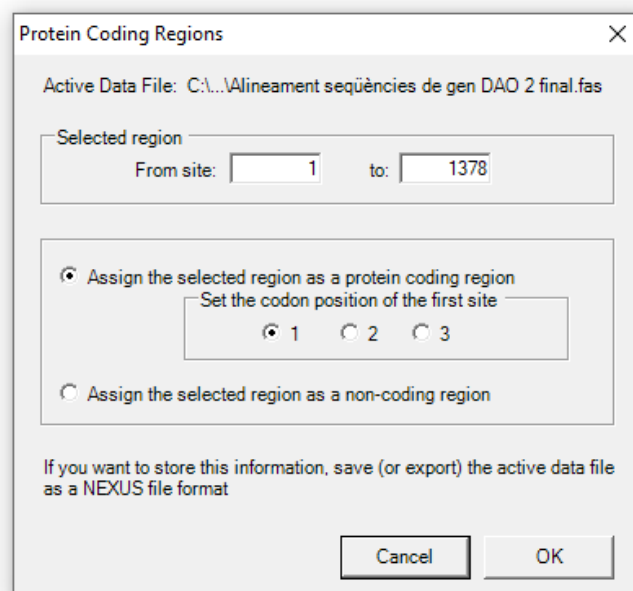


Figura 32. Requadre amb on indica la posició on comença i acaba la cadena, i l’opció “1” marcada.

He tornat a anar a “Data”, a l’opció de “Assign Genetic Code”. Aquí, per si vull després fer una anàlisi a nivell de proteïnes, li he dit que el codi genètic que faig servir és el del genoma nuclear universal, l’opció “Nuclear Universal” que ja ve per defecte. A l’esquerra del requadre hi ha les equivalències entre els triplets i aminoàcids que els hi corresponen (Figura 33).

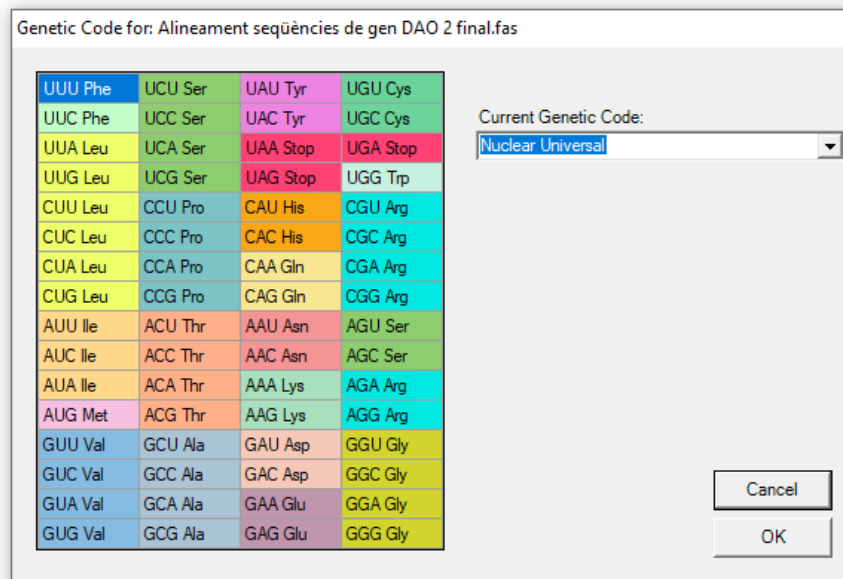


Figura 33. Requadre amb l'opció "Nuclear Universal" marcada, i a la part esquerra les equivalències entre els triplets i aminoàcids que els hi corresponen.

Després d'haver fet tots aquests passos, ja he donat les ordres necessàries al programa perquè analitzi les seqüències correctament.

Seguidament he anat cap a "Display", i he clicat l'opció "View data". Se m'ha obert una pestanya amb totes les espècies que he posat a la columna esquerra, amb les seves respectives seqüències. En aquest alineament, es marca amb punts les posicions nucleotídiques que són idèntiques a la seqüència de referència humana. Si la lletra o part de la seqüència no hi és perquè falta s'hi posa una ratlla, i si hi ha una lletra, indica un canvi de nucleòtid (polimorfisme) respecte la seqüència humana (Figura 34).

Una altra informació que s'obté de la Taula és que per cada tres bases ens mostra l'aminoàcid corresponent a la seqüència humana (a la primera fila).

	Coding/Non Coding	Met	A	g	Val	Val	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Leu
1 Homo	a	t	c	g	t	c	t	g	t	g	a	t	t	g	g	a	c	a	c
2 Pan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 Pan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 Pongo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Monaca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 Sus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 Bos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 Ovis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 Ursus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 Alluropoda	t	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 Canis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 Felis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 Rattus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 Vombatus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 Phascolarctos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 Cusculus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 Falco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 Cygnus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19 Gallus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 Alligator	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Selected position: Site: 1
Sequence name: Pan
Site state: Variable (polymorphic), 2 variants

Genome/Species info: Absolute/Genomic position: 1
Chromosome: Chr2L
Species: Drosophila subobscura

Select Sites/Codons...
Codons

Figura 34. Taula de les diferents espècies amb les seves respectives seqüències. Utilitza punts, lletres o ratlles per indicar-nos les diferències de cada seqüència respecte la "Homo sapiens", que és la humana, i la que s'utilitza com a referència.

Seguidament he tancat aquesta pestanya i me n'he anat cap a fer l'anàlisi. Per fer-ho, he clicat “analysis”, i “Polymorphic Sites...”. L'hi he dit que ens ha d'incloure totes les 24 seqüències (n=24) i tota la longitud. He clicat “OK”.

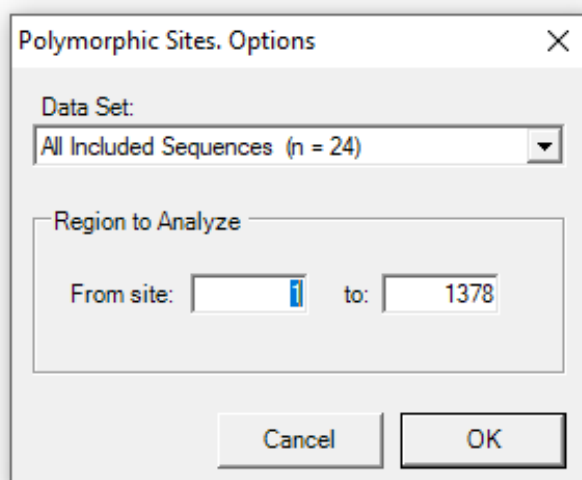


Figura 35. Requadre amb l'opció “All Included Sequences (n=24) marcada, i també la longitud de la seqüència.

Un cop he clicat OK, surt un requadre. M'ha sortit una dada a “Total number of sites” que és un 858. Aquest nombre vol dir que de les 1378 posicions, que és el nombre que ens mostra a sobre d'aquest i inclou tots els llocs que tenim (“lletres, guions i interrogants”), doncs aquí posa només aquelles posicions que es sap del cert que hi ha una A, T, G o C. En les que hi ha hagut deleccions no es tenen en compte (Figura 36).

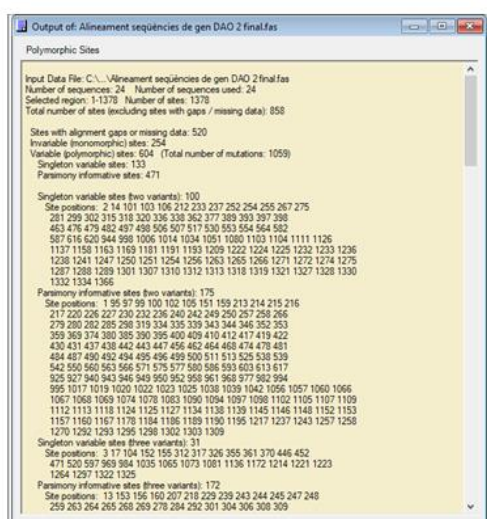


Figura 36. Requadre on t'informa de les posicions on hi pots trobar timines, guanines, citosines, i adenines.

A continuació he anat a “**Analysis**”, dins de “**DNA Polymorphism**”. Aquí he indicat al programa si a l'hora de calcular els valors que em sortien, volia incloure o no les posicions on hi han deleccions (guions). Si vull que n'hi hagin, clico a “Nuc. Diversity (gaps/missing data)”, i si no les vull incloure, aleshores no selecciono aquesta opció. De moment no l'he clicat (Figura 37).

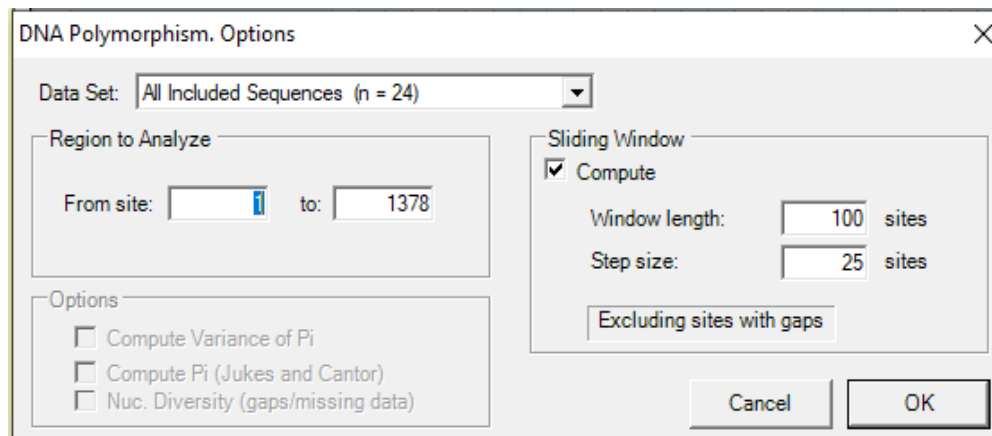


Figura 37. Requadre on he indicat si volia o no incloure les deleccions a l'hora de calcular els valors de polimorfisme.

Després, he marcat la pestanya on hi diu “**Compute**”, dins d’ “Sliding Window”, i “**OK**”. M’ha sortit dos nous requadre.

Després d’això, he tornat a “**Analysis**”, on diu “**Synonymous and NonSynonymous Substitutions...**” ja que també m’interessa per obtenir més informacions de les seqüències i em facilita i m’ajuda amb l’estudi de la seva variabilitat. Se m’han obert dues pestanyes noves on m’indiquen els canvis sinònims i no sinònims de les seqüències.

Un **canvi sinònim** és que hi ha una mutació en el DNA però no implica canvi d’aminoàcid.

Un **canvi no sinònim** serà un canvi en la seqüència del DNA, però que implicarà canvi d’aminoàcid.

1.4 Anàlisi filogenètica amb el programa MEGA X v10.05

Una vegada he fet totes les anàlisis necessàries amb el **DnaSP**, he continuat amb el programa “**MEGA X**” (<https://www.megasoftware.net/>), una altra aplicació que m’ha servit per obtenir informació filogenètica de les seqüències del gen DAO.

He entrat al programa **MEGA X**, he clicat “**File**”, “**Open a file**”, i he obert el document. Un cop obert, demana si s’ha d’alinejar o no la seqüència. He posat “**Analyze**” directament ja que les seqüències ja les teniem alineades del **Bioedit**.

Després m’ha sortit un requadre on m’he assegurat de que la informació que ens dona dels interrogants (posicions indeterminades), guions (delecions) i punts (posicions idèntiques a la seqüència de referència) era correcta, i seguidament he marcat “**Nucleotide Sequences**”. Per acabar he clicat “**OK**”.

A continuació, l’aplicació pregunta si aquestes seqüències de DNA són regions codificants, és a dir, si codifiquen per una proteïna. He marcat “**Yes**”.

Finalment m’ha demanat quin codi genètic vull utilitzar. He marcat “**Standard**” (Figura 38).

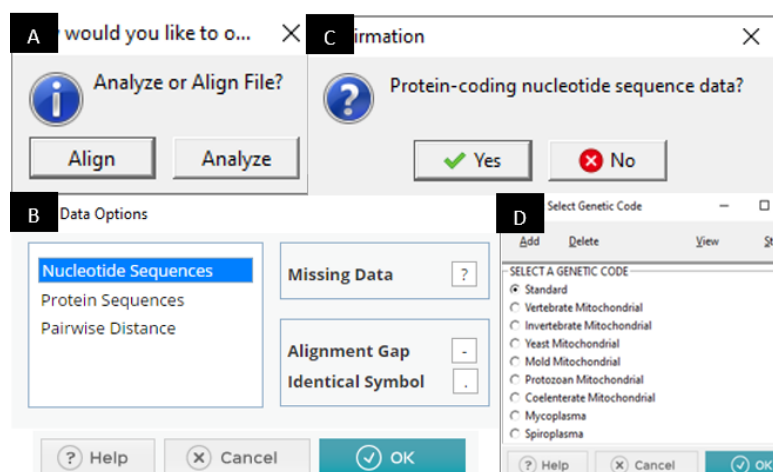


Figura 38. Ordenat de la A a la D de les pestanyes que se’ns obren quan seleccionem el fitxer.

A continuació he anat a “**Models**” i he clicat on posa “**Compute Nucleotide Composition**”. He marcat l’opció “**Yes**” de la pestanya que se m’ha obert i

s'ha obert un nou requadre. Aquí l'aplicació permet guardar els resultats al disc dur (si l'hi dic), o els ensenya en un fitxer Excel, marcant l'opció **"Display Results"**.

A continuació, he canviat d'apartat i he anat cap a **"Phylogeny"**. El programa permet escollir entre diferents algorismes de reconstrucció filogenètica (Maximum Likelihood, Neighbor-Joining...).

He escollit el mètode de Neighbor-Joining ja que és més ràpid d'analitzar. Dins de **"Construct/Test Neighbor-Joining..."**, he clicat **"Yes"**, i s'ha obert una pestanya. Primer de tot m'he mirat que a **"Test of Phylogeny"** estigués marcada l'opció de **"Bootstrap method"**. Després m'he fixat en el valor 500. Això vol dir que farà aquest anàlisi 500 vegades, o els cops que l'hi posi. Això serveix perquè si ho féssim només un cop podria ser que ens sortís un resultat a l'atzar. Per tant, he posat **"500"**.

Aquest anàlisi agafa les seqüències, elimina unes quantes posicions a l'atzar i t'analitza i et treu l'arbre. Llavors ho va fent i te n'elimina unes altres fins a 500 vegades. Finalment fa un recull de tots els 500 arbres que m'ha fet, els posa en un de sol i em diu de cada agrupament que hi ha la seva robustesa estadística.

Tota la resta de dades de moment les he deixat iguals i he clicat a **"OK"**. Amb pocs segons m'ha calculat 500 arbres i he obtingut un arbre consens de tots plegats.

1. ANÀLISI DEL DÈFICIT DE LA DAO

Per tal de poder assegurar-me si tinc o no el dèficit de DAO, ja que anteriorment no m'ho he mirat, m'he informat de la manera de saber-ho. També m'interessaria poder aconseguir saber si familiars meus el tenen o no, per poder buscar resposta a una de les preguntes inicials, sobre si el dèficit de la DAO és hereditari o no.

Buscant i cercant per internet, he trobat un seguit d'informacions i pautes que m'han permès saber que sí que és possible.

Hi ha dues maneres d'analitzar-ho, mitjançant un test de saliva o una anàlisi de sang. El primer, consisteix en un estudi genètic no invasiu de l'activitat de la DAO. Es tracta d'un test que realitza un genotipat d'alta sensibilitat de les variants genètiques més rellevants del gen AOC1 (DAO) a partir d'una mostra de saliva (*Dr. Healthcare*).

Es pot realitzar tant a casa com a la farmàcia, no fa mal, i pot indicar a la vegada la probabilitat de l'existència de variants genètiques associades al dèficit de la DAO dins de la família, degut a la seva naturalesa probablement heretable.

Els nivells d'expressió de la DAO presenten una gran variació interindividual. Pel gen que codifica la proteïna DAO/ABP1 (AOC1), s'han descrit variants de tipus SNP (variants d'un sol nucleòtid), algunes d'elles associades a nivells reduïts de l'activitat de la DAO. En aquest test s'analitzen 3 d'aquestes variants de l'AOC1.

Després d'informar-me del test de saliva, he volgut trobar més informació sobre l'anàlisi, de manera que he anat a una farmàcia propera a la meua zona i he tingut la sort de parlar amb una especialista en medicina alternativa i complementària.

Ella m'ha informat molt més sobre les possibilitats que tinc per fer-me aquesta prova. Per mesurar l'activitat de l'enzim DAO també es pot fer una analítica. Té un cost d'uns 80€ aproximadament, i a la farmàcia no es pot fer, ja que cal fer-la en un laboratori d'anàlisis. Amb aquesta analítica em poden dir el grau d'activitat que tinc d'aquest enzim (que és el responsable de degradar la histamina).

Si l'activitat surt normal, no hi ha problemes de resposta histaminèrgica (mals de cap, picor, urticàries, etc.). Com menys activitat tingui, més histamina acumulada hi ha al cos i per tant, més simptomatologia.

El test de saliva sí que els puc fer a la farmàcia a través d'un laboratori de genètica com Synlab o similars, a diferència de l'anàlisi de sang. Tot i això, la farmacèutica m'ha informat de que amb el test de saliva pots saber si tens dèficit de l'enzim DAO, en canvi si ho mires en sang pots saber a més a més

la seva activitat. És a dir, amb la mostra de sang pots precisar molt més el diagnòstic.

Després he trucat als laboratoris CERBA per tal d'informar-me més sobre la prova i assegurar-me que aquests laboratoris pels quals treballa el Gabinet Mèdic de la meua zona realitzen aquesta prova. M'han dit que havia d'enviar un correu demanant aquesta informació i el seu cost. M'han respost amb les informacions següents (Figura 39).

DIAMINOXIDASA (DAO) ACTIVIDAD, SUERO		CÓDIGO PRUEBA:	16868
Método:	Radioinmunoanálisis.		
Montaje:	Plazo de entrega:12		
Muestra:	1 mL Suero (-8 ºC - Congelar)		
Transporte:	Temperatura congelada.		
Interpretación:	Actividad Reducida DAO: 40.00 - 80.00 Actividad Normal DAO : Sup.a 80.00 Actividad muy Reducida DAO: Inf.a 40.00		
PRESUPUESTO:			
petición	Descripción	Tarifa_Aplicada	Euros_Cliente
16868	DIAMINOXIDASA (DAO) ACTIVIDAD, SUERO	8009-8009 - PRIVAT BARCELONA	136,00
9988	Extracción y Proceso Privado	8009-8009 - PRIVAT BARCELONA	6,00
			142,00€

Figura 39. Informació que m'ha proporcionat els laboratoris CERBA sobre les proves del dèficit DAO.

Aquesta analítica no es realitza a través de la seguretat social. Es coneixen varies analítiques que diuen que miren el nivell d'enzim DAO, per només una d'elles determina quina és l'activitat funcional de l'enzim en el plasma en aquell precís moment, és a dir, si realment la quantitat que tenim d'enzim és activa o no. Les unitats de l'analítica són en HDU/ml (unitats degradants de l'histamina) o U/ml. En canvi, altres analítiques miren el nivell total de l'enzim en el torrent sanguini (la concentració), sense tenir en compte si aquest té funció biològica.

S'han detectat casos en que l'analítica ha donat falsos resultats. Per això, recomanen complementar l'analítica amb l'estudi genètic molecular que identifica variants seleccionades del gen que codifica la proteïna DAO/ABP1 (AOC1).

Per tant, sabent tot això, he decidit fer-me les proves mitjançant una anàlisi de sang. Així d'aquesta manera també podré saber l'activitat de l'enzim, fet que em permetrà ampliar encara més la meva recerca.

Com que fer les analítiques a tota la família és una mica difícil degut al temps i a alguns altres factors, la meva intenció és fer-la a un membre de cada generació de la meva família (jo, la meva mare i la meva àvia) per poder tenir més dades i poder saber amb més fiabilitat si pot ser hereditària o no.

Per tant, he anat al Gabinet Mèdic de la meva zona per tal de poder-me'ls fer. Allà, he hagut de donar el document amb les opcions marcades del que m'havien d'analitzar als laboratoris.

Al cap de dues setmanes he sabut els resultats.

Resultats

Després de tot aquest procés he aconseguit extreure una sèrie de resultats.

Amb l'aplicació DnaSP i a partir de les seqüències que he buscat i alineat amb l'ajuda del Genbank i el Bioedit, he obtingut el següent.

1. RESULTATS DE L'ANÀLISI DE VARIABILITAT I POLIMORFISMES

He obtingut aquesta taula que em mostra un seguit d'informació que m'ha ajudat a entendre la variabilitat de la seqüència del gen DAO. És a dir, el nombre de mutacions, de llocs invariables (llocs on la lletra que hi ha en els humans és la mateixa per a totes les espècies), la diversitat nucleotídica, llocs polimòrfics (tots els llocs on hi ha mutacions)... tal com es mostra a la Taula 2.

Número total de posicions nucleotídiques que inclouen deleccions	520	
Llocs invariables	254	
Llocs polimòrfics	604	
Tipus de llocs on hi poden haver mutacions		
	Singletons (si només hi ha una sola mutació entre totes les espècies en una posició nucleotídica determinada):	133
	Llocs on tenen informació parsimoniosa (si tenim més d'una mutació en una columna)	471
Llocs on hi ha dues mutacions		
	Singletons	100
	Parsimonioses	175
Llocs on hi ha tres		

mutacions		
	Singletons	31
	Parsimonioses	172
Llocs on hi ha quatre mutacions		
	Singletons	2
	Parsimony	124

Taula 2: Paràmetres de variabilitat de la seqüència del gen DAO extrets de l'anàlisi amb DNAsp.

El número total de mutacions que hi ha en les seqüències del gen DAO analitzades és de **1059**, i la diversitat nucleotídica (P_i) és de **0,25750**. Aquest paràmetre indica la quantitat de variació que hi ha amb les seqüències que estic analitzant. Fa una mitjana del nombre de mutacions comparant cada parell de seqüències i en treu aquest valor. Si aquest valor és proper a 1 hi ha molta més diversitat, i si és proper a 0 menys diversitat.

La variabilitat que hi ha al llarg de la seqüència del gen es resumeix a continuació. Entre la posició 1 i 272, la diversitat nucleotídica (P_i) és de 0,2772 i més o menys es manté igual entre la posició 153-297. Però entre la posició 323-422, baixa (Figura 40).

Window	Midpoint	Pi	Theta	S
1-272	222	0.27721	0.20352	76
153-297	247	0.27018	0.17942	67
223-322	272	0.30272	0.19816	74
248-347	297	0.27333	0.18477	69
273-372	322	0.25322	0.17942	67
298-397	347	0.25036	0.18477	69
323-422	372	0.21174	0.16067	60
348-447	397	0.23518	0.16603	62
373-472	422	0.23616	0.16603	62
398-497	447	0.23768	0.17138	64
423-522	472	0.25536	0.18745	70
448-550	497	0.25960	0.19013	71
473-575	522	0.25112	0.18745	70
498-600	550	0.25554	0.18210	68
523-625	575	0.23913	0.16335	61
551-650	600	0.21040	0.14996	56
576-675	625	0.23014	0.14728	55
601-700	650	0.22786	0.14461	54
626-728	675	0.26496	0.16335	61
651-753	700	0.26417	0.16603	62
676-778	728	0.26801	0.17674	66

Figura 40. Taula que ens mostra la variabilitat que hi ha al llarg de la seqüència del gen.

He clicat a “DnaSP Graph” i surt un gràfic d’aquestes dades. Relaciona per cada posició la diversitat nucleotídica que hi ha. A l’eix de les x ens posa la longitud del gen, i a l’eix de les y el valor de Pi. Com més elevat és el valor de Pi, més canvis/ mutacions hi ha. Com menys elevat, menys mutacions. La primera part de la seqüència d’aquest gen és força variable i després hi ha algunes parts que la variabilitat baixa. I cap al final torna a pujar. És a dir, l’interval de posicions de la seqüència que és més variable és el de [1100-1200] aproximadament. Al contrari, l’interval de posicions de la seqüència que és menys variable és el de [600-950] aproximadament (Figura 41).

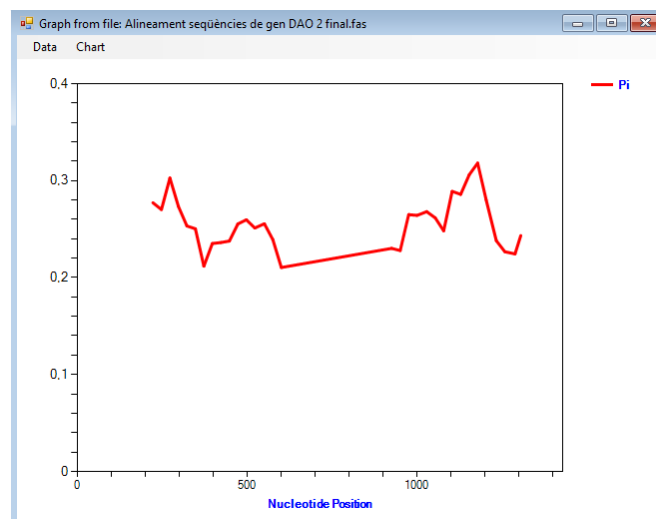


Figura 41. Gràfic que relaciona la posició amb la diversitat nucleotídica.

He continuat analitzant altres paràmetres com per exemple els valors de diversitat nucleotídica amb canvis sinònims i no sinònims. La Pi en canvis sinònims és de 0,1922, i en els canvis no sinònims és de 0,2780. Per tant, hi ha més mutacions en els canvis no sinònims que en els canvis sinònims.

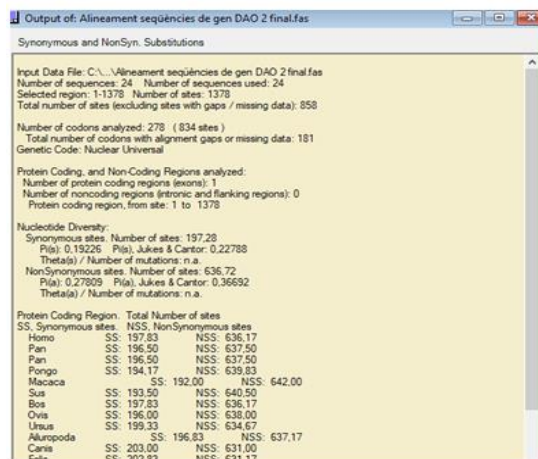


Figura 42. Dades sobre els valors de diversitat nucleotídica amb canvis sinònims i no sinònims.

2. RESULTATS DE L'ANÀLISI FILOGENÈTICA AMB EL PROGRAMA MEGA

L'anàlisi de la composició nucleotídica m'ha donat el percentatge que hi ha de timines, citocines, adenines i guanines per cada seqüència de cada espècie. Si hi hagués la mateixa quantitat de cada un dels nucleòtids, hi hauria d'haver un 25% de cada una. Però a la Taula 3 es veu que no són aquestes proporcions exactes.

En el primer cas, a la seqüència de referència de l'*Homo sapiens*, per exemple, tinc un 19,73% de timina , 28,63% de citosina , 25,19% d'adenina i 26,43% guanina . Hi ha una mica de desviació, sobretot en la timina.

La taula amb totes les dades és la següent:

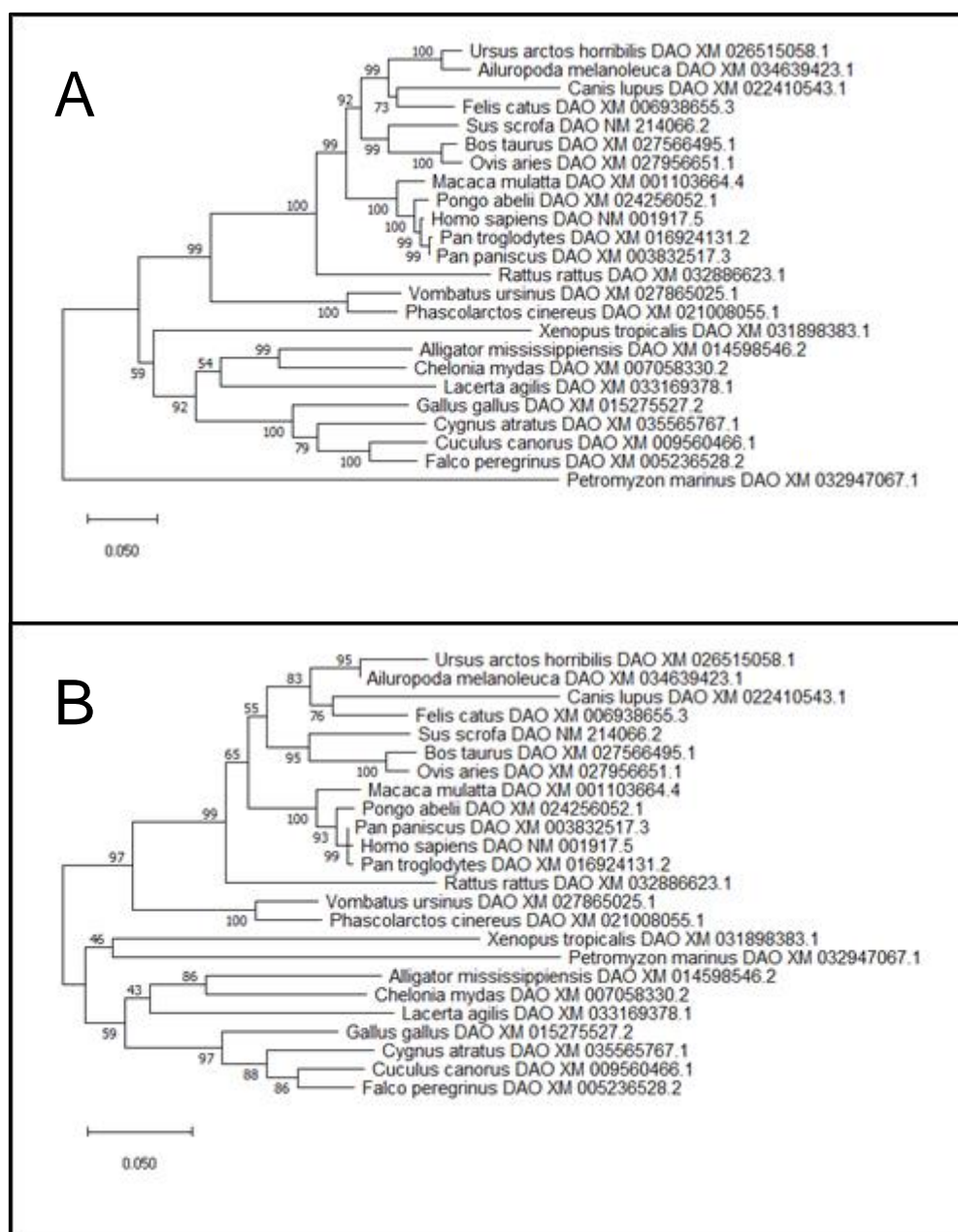
	T(U)	C	A	G
<i>Homo sapiens</i> DAO NM 001917.5	19,73	28,64	25,19	26,44
<i>Pan troglodytes</i> DAO XM 016924131.2	20,11	28,16	25,48	26,24
<i>Pan paniscus</i> DAO XM 003832517.3	20,11	28,25	25,38	26,24
<i>Pongo abelii</i> DAO XM 024256052.1	20,69	27,68	25,48	26,15
<i>Macaca mulatta</i> DAO XM 001103664.4	20,88	27,39	25,38	26,34
<i>Sus scrofa</i> DAO NM 214066.2	21,65	26,91	24,42	27,01
<i>Bos taurus</i> DAO XM 027566495.1	21,29	27,52	23,49	27,71
<i>Ovis aries</i> DAO XM 027956651.1	20,98	27,78	23,75	27,49
<i>Ursus arctos horribilis</i> DAO XM 026515058.1	20,78	27,78	23,47	27,97

<i>Ailuropoda melanoleuca</i> DAO XM 034639423.1	21,40	25,82	25,14	27,63
<i>Canis lupus</i> DAO XM 022410543.1	21,60	27,79	23,75	26,85
<i>Felis catus</i> DAO XM 006938655.3	20,91	26,49	24,33	28,27
<i>Rattus rattus</i> DAO XM 032886623.1	21,71	27,76	23,34	27,18
<i>Vombatus ursinus</i> DAO XM 027865025.1	22,45	27,46	23,41	26,68
<i>Phascolarctos cinereus</i> DAO XM 021008055.1	22,93	27,07	23,41	26,59
<i>Cuculus canorus</i> DAO XM 009560466.1	20,02	28,45	22,13	29,41
<i>Falco peregrinus</i> DAO XM 005236528.2	20,11	27,68	23,08	29,12
<i>Cygnus atratus</i> DAO XM 035565767.1	16,49	31,12	20,39	32
<i>Gallus gallus</i> DAO XM 015275527.2	20,48	27,54	22,03	29,95
<i>Alligator mississippiensis</i> DAO XM 014598546.2	19,64	27,49	24,71	28,16
<i>Lacerta agilis</i> DAO XM 033169378.1	23,08	25,09	26,15	25,67
<i>Chelonia mydas</i> DAO XM 007058330.2	22,41	23,47	27,11	27,01
<i>Xenopus tropicalis</i> DAO XM 031898383.1	25,38	19,83	29,98	24,81
<i>Petromyzon marinus</i> DAO XM 032947067.1	22,04	26,43	23,38	28,15
Mitjana	21,12	27,06	24,35	27,47

Taula 3: Composició nucleotídica de les seqüències del gen DAO per a cada espècie analitzada.

Amb això he pogut veure el tipus de composició que hi ha en cada cadena de DNA de les diferents espècies.

Per acabar, he obtingut els arbres filogenètics de les seqüències de DNA del gen DAO que es mostren a la Figura 43. En aquests arbres es mostren les relacions filogenètiques de totes les espècies que he analitzat (veure Taula 1 de l'apartat de Metodologia). A continuació he comparat els arbres per mirar si tots segueixen la mateixa estructura o hi ha diferències en la posició de determinades espècies.



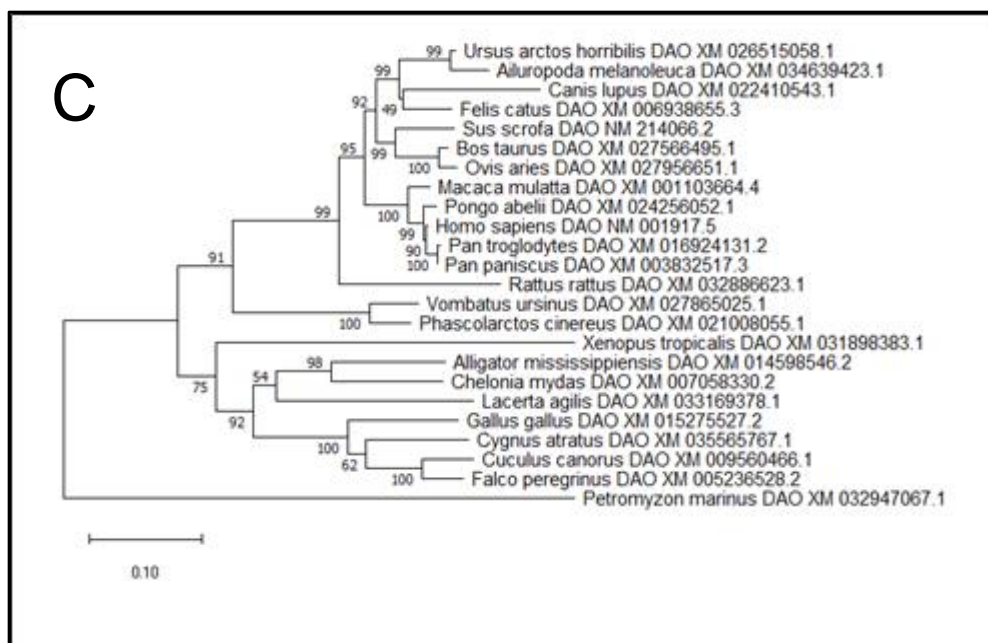


Figura 43. Arbres filogenètics de les seqüències de DNA estudiades. A: Tenint en compte les posicions 1 i 2 de cada codó. B: Tenint en compte la posició 3 de cada codó. C: Tenint en compte totes les posicions de cada codó.

Tot i que en aquests diagrames d'arbre he analitzat les mateixes seqüències, en cada anàlisi no he tingut en compte totes les posicions nucleotídiques.

En els tres arbres filogenètics obtinguts a partir de les seqüències de DNA del gen DAO he observat que les diferents espècies analitzades estan incloses en el grup de vertebrats que els correspon.

En els arbres que inclouen les posicions 1 i 2 dels codons i totes les posicions, a la base hi ha la seqüència del gen DAO de la llamprea (*Petromyzon marinus*) (Figura 43A i C). En l'arbre basat en la tercera posició del codó, aquesta espècie de peix s'uneix amb la granota africana (*Xenopus laevis*) amb un suport de *bootstrap* baix (46) (Figura 43B). En els arbres basats en les posicions 1 i 2 i les seqüències completes, les seqüències de rèptils i d'aus s'agrupen amb valors de *bootstrap* elevats (92) (Figura 43A i C). En canvi, en l'arbre basat en la posició 3 del codó, la seva robustesa és més baixa (bootstrap de 59) (Figura 43B). Val a dir que en els tres casos, aquest grup es divideix clarament en les branques corresponents a rèptils (llangardaix [*Lacerta agilis*], tortuga marina [*Chelonia mydas*] i alligator

[*Alligator mississippiensis*]) i aus (gallina [*Gallus gallus*], cigne [*Cygnus atratus*], cucut [*Cuculus canorus*] i falcó pelegrí [*Falco peregrinus*]). En els tres arbres, els agrupaments de les aus tenen major robustesa (*bootstraps* de 97-100) que els dels rèptils (*bootstraps* de 43-54).

En els tres arbres, les seqüències de marsupials (uombat [*Vombatus ursinus*] i el coala [*Phascolarctos cinereus*]) i placentaris (la resta de mamífers) s'agrupen amb valors de *bootstraps* elevats (99,97,91) (Figura 43). Dins dels placentaris, començant per la zona superior dels arbres, hi ha els carnívors agrupats amb els artiodàctils. En els arbres basats en les posicions 1 i 2 i les seqüències completes, tenen valors de *bootstraps* elevats (92) (Figura 43A i C). En canvi, en l'arbre basat en la posició 3 del codó, la seva robustesa és més baixa (*bootstrap* de 55) (Figura 43B). A continuació hi trobem els primats, que agrupats amb la resta de placentaris (carnívors i artiodàctils). En els arbres que inclouen les posicions 1 i 2 dels codons i totes les posicions s'agrupen amb valors de *bootstraps* elevats (99 i 95) (Figura 43A i C). A diferència de l'arbre basat en la tercera posició del codó, que té una robustesa més baixa (*bootstrap* de 65). L'única espècie de rosegador inclosa, la rata negra (*Rattus rattus*) queda unida externament totes les espècies anteriors que he descrit. En els tres arbres les espècies de placentaris s'agrupen amb valors de *bootstraps* molt elevats (100 i 99) (Figura 43). En els tres casos, el grup es divideix clarament en les branques corresponents a marsupials (uombat [*Vombatus ursinus*] i el coala [*Phascolarctos cinereus*]) i placentaris (rosegadors (rata negra [*Rattus rattus*]), carnívors (ós bru [*Ursus arctos horribilis*], panda gegant [*Ailuropoda melanoleuca*], gos [*Canis lupus*] i gat domèstic [*Felis catus*]), artiodàctils (porc senglar [*Sus scrofa*], vaca [*Bos taurus*] i ovella [*Ovis aries*]) i els primats (macac [*Macaca mulatta*], orangutà [*Pongo abelii*], humans [*Homo sapiens*], ximpanzé [*Pan troglodytes*], ximpanzé pigmeu [*Pan paniscus*])).

A continuació he repetit el mateix procediment, però amb la seqüència de proteïna. I l'arbre filogenètic que m'ha sortit és el següent:

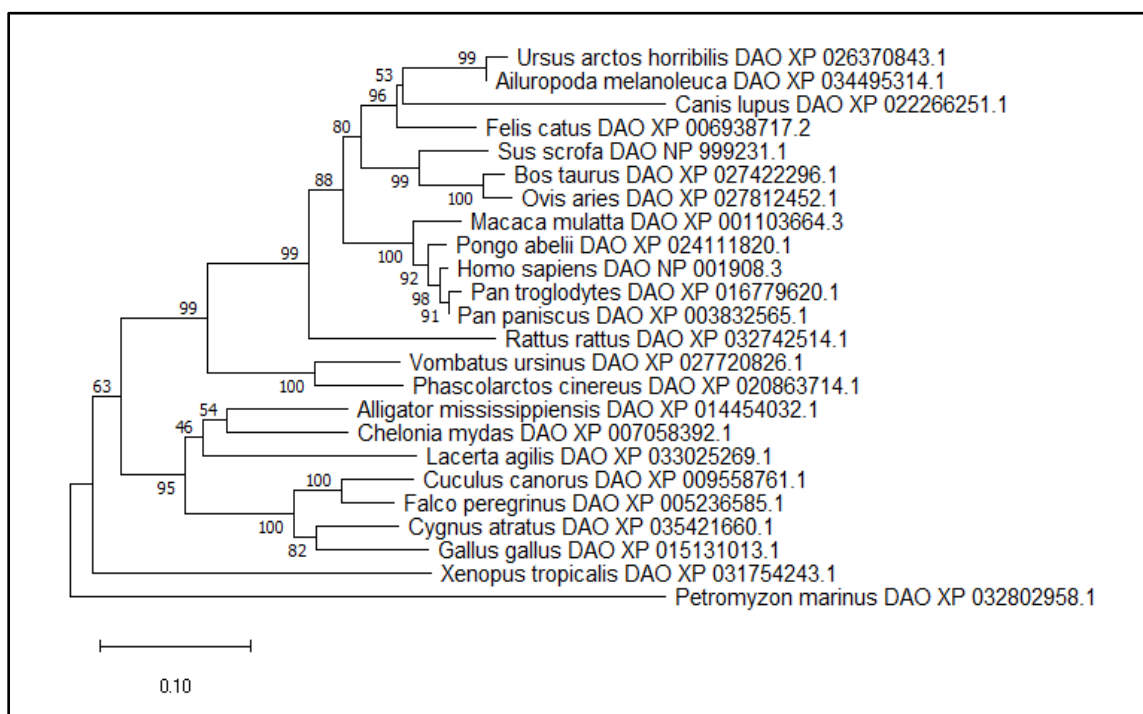


Figura 44. Diagrama d'arbre de proteïna.

En l'arbre filogenètic obtingut a partir de les seqüències de proteïna del gen DAO he observat que els agrupaments de les diferents espècies analitzades, són molt semblants als arbres filogenètics de les seqüències de nucleòtids, tret d'algunes corresponents al anurs, rèptils, aus i peixos que canvien l'ordre dins dels seus grups corresponents.

En l'arbre de la seqüència de proteïna, les seqüències de rèptils i d'aus s'agrupen amb valors de *bootstraps* elevats (95) (Figura 44). Són uns valors similars als arbres de les seqüències de DNA basats en les posicions 1 i 2 i les seqüències completes (Figura 43A i C). En canvi, són diferents als de l'arbre basat en la posició 3 del codó, ja que la seva robustesa té un valor de 59 (Figura 43B).

Analitzant les seqüències dels mamífers, en la seqüència de proteïna, els marsupials i els placentaris tenen una robustesa molt elevada (*bootstrap* 99). En aquest cas, és similar als tres arbres de les seqüències del DNA, ja que també tenen uns valors molt elevats (*bootstraps* 99,97 i 91) (Figura 43).

En la Figura 45 es pot veure l'agrupament de les espècies, indicat amb el nom, dels quals he estat parlant anteriorment.

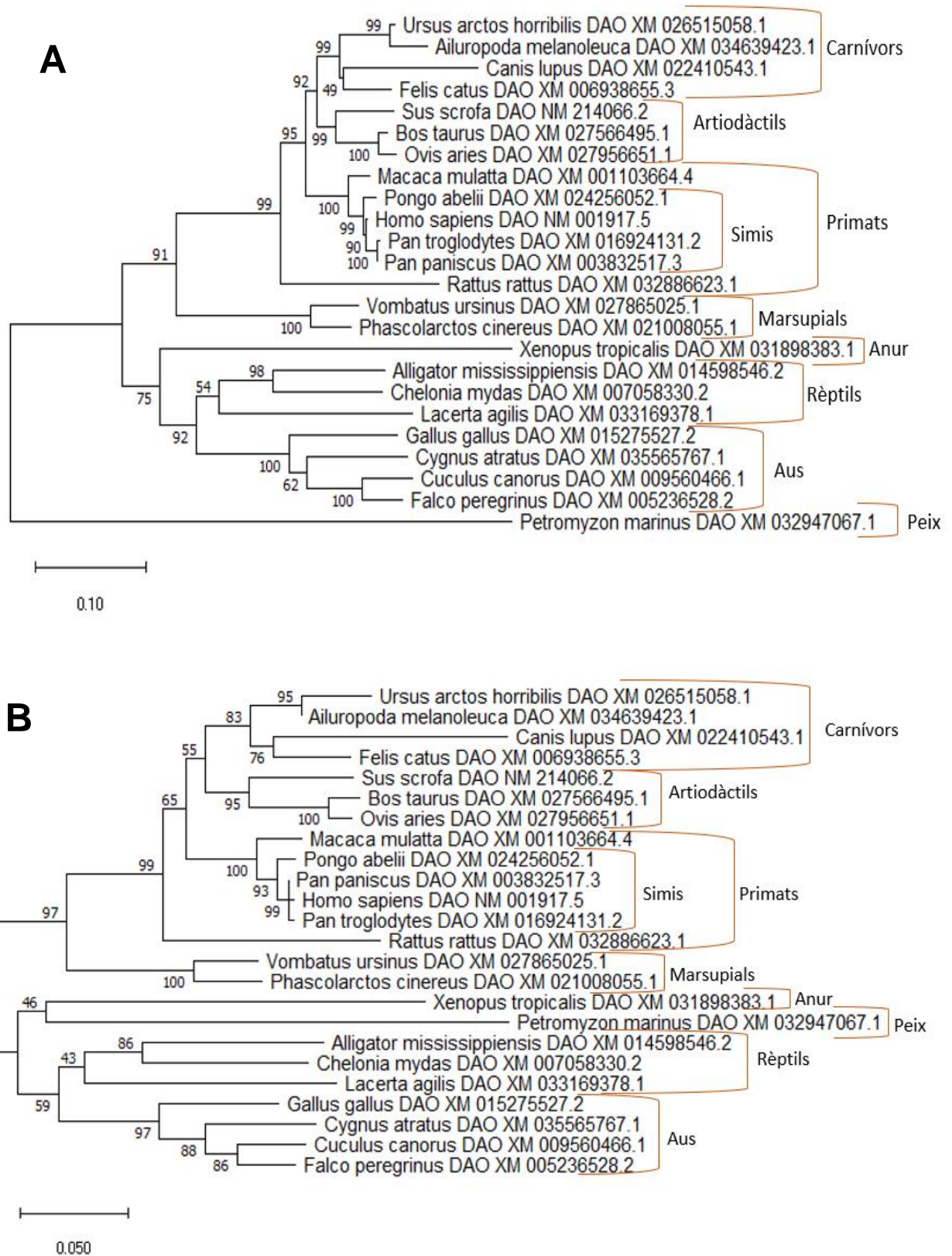


Figura 45. Indica l'ordre al qual pertanyen les espècies. A, Arbre filogenètic de les seqüències 1 i 2 de DNA del gen DAO. B, Arbre filogenètic de la seqüència 3 de DNA del gen DAO.

3.RESULTATS DE LES ANÀLISIS DE SANG

Finalment, he pogut realitzar la prova del dèficit DAO, mitjançant l'anàlisi de sang només a la meva mare i a mi degut a la falta de temps, per tal de comprovar si l'enzim s'expressa i quina activitat té. Els resultats obtinguts són els següents.

	Resultat	Interval del resultat	Interpretació
Els meus resultats	3,7 kU/L	menys de 3,74 kU/L	Alta incidència d'intolerància a la histamina, activitat molt reduïda del DAO
Els de la meva mare	8 kU/L	De 3,74 a 12,54 kU/l	Probable incidència d'intolerància a la histamina

Taula 4. Resultats de l'activitat de la DAO a partir d'anàlisis de sang.

Els valors superiors a 12,54 kU/l determinarien INTOLERÀNCIA A LA HISTAMINA POC PROBABLE

La seqüència genètica del DAO es troba en un fragment localitzat en el cromosoma 7 (7q34-Q36) del genoma humà i està compost per 5 exons i 4 introns.

S'han trobat moltes diferències entre la seqüència d'exons i introns d'aquest gen que són degudes al polimorfisme genètic.

Segons dades del Centre Nacional d'Informació Biotecnològica (NCBI), hi ha 85 variants d'un sol nucleòtid (SNP) localitzats i identificats en el gen humà del DAO (AOC1). 17 d'aquests SNP es troben en els exons, dels quals 7 produeixen substitució dels aminoàcids, i poden causar alteracions en la capacitat metabòlica de l'enzim.

De tots els polimorfismes que s'han trobat en la seqüència del gen AOC1, 3 d'aquests produeixen baixa activitat enzimàtica en la metabolització. Tenen de referència rs1015611, rs1049742 i rs1049793 (International society of DAO deficiency).

Les persones que són portadores d'aquests polimorfismes presenten una menor activitat de la DAO que els individus no portadors. Els estudis indiquen que aquest tipus de polimorfismes ocorren amb una freqüència global aproximada del 10 al 13 percent, afectant especialment a dones de mitjana edat. Altres polimorfismes estudiats de substitució d'aminoàcids en el gen de la DAO no mostren canvis en la seva activitat enzimàtica.

Discussió

1. ANÀLISI DE VARIABILITAT I POLIMORFISMES

L'apartat de l'anàlisi de variabilitat i polimorfismes m'ha servit per entendre com ha canviat el gen DAO al llarg de 500 milions d'anys, des de l'aparició dels peixos més primitius (agnats). De la interpretació del gràfic obtingut a la Figura 41, podem dir que la seqüència del gen DAO ha evolucionat de manera diferent depenent de quina part es consideri. Hi ha parts més conservades i regions que han variant més al llarg d'aquest temps, com les dels intervals de les posicions de la seqüència [300-500] i [1000-1200] aproximadament. La regió més important pel bon funcionament de la proteïna i, per tant, la més conservada, dedueixo que és la del pic més baix

de diversitat nucleotídica (0,2), localitzada al voltant de la posició nucleotídica 600 aproximadament.

A partir dels resultats que he obtingut de l'anàlisi de la composició nucleotídica sobre els quatre nucleòtids, timina, citosina, adenina i guanina, he pogut concloure el següent. Tal com he dit anteriorment a l'apartat dels RESULTATS, hauria d'haver obtingut un valor del 25% per a cada nucleòtid si hi hagués hagut la mateixa quantitat de cada nucleòtid en cada seqüència de les diferents espècies. Però he obtingut tota una sèrie de percentatges de cada nucleòtid en cada espècie diversos i diferents a un 25%, , com s'ha vist en la Taula 2. Per exemple, en el cas de l'*Homo sapiens* eren : 19,73% de timina , 28,63% de citosina , 25,19% d'adenina i 26,43% guanina.

He tingut en compte que aquests nucleòtids s'uneixen de dos en dos a les cadenes complementàries de la següent manera: timina amb adenina, i citosina amb guanina. De manera que seguint aquesta relació, hi hauria d'haver la mateixa (o similar) quantitat dels dos nucleòtids de cada parella en totes les espècies. També he parat atenció en les possibles mutacions que poden fer variar aquestes xifres, però tot i això no vol dir que no hagin de tenir uns percentatges similars.

En funció que hi hagi més G/C o A/T té una certa relació amb l'estabilitat de la unió de les dues cadenes que formen la doble hèlix de DNA. És a dir, si faig les sumes de G amb C i A amb T em surt que hi ha més contingut de G/C, la qual cosa vol dir que aquesta seqüència és més estable ja que la unió d'aquestes dues bases es realitza amb tres ponts d'hidrogen i això pot provocar que hi hagi menys mutacions. En canvi, la T i la A fan unions amb dos ponts d'hidrogen i són més inestables.

En general tots tenen uns nombres semblants. Amb el cas de la timina i la adenina, però, amb diferències d'un 1% fins a un 6%. Això, com he dit abans, pot ser degut a mutacions diverses que hi poden haver en els gens a causa de la inestabilitat dels dos ponts d'hidrogen que uneixen aquestes base nitrogenades.

Amb la citosina i la guanina, en canvi, les diferències són molt menors i tenen valors molt més semblants. Els percentatges entre les diferents

espècies varien d'un 1% a un 2% aproximadament en la majoria dels casos. Tot i això, n'hi ha que quasi no varien, i contràriament n'hi ha un o dos que varien fins a un 5%. En aquest cas, la major estabilitat és deguda a que fan unions de tres ponts d'hidrogen, i per tant redueix el nombre de possibles mutacions.

Per tant, podem considerar aquestes cadenes força estables degut a la major quantitat dels ponts d'hidrogen, ja que en quasi tots els casos hi ha més quantitat de G/C que de T/A, encara que per poca diferència els uns dels altres.

2. ANÀLISI DE FILOGENÈTICA DEL GEN DAO EN VERTEBRATS

La següent part d'on també n'he pogut extreure molts resultats és amb les anàlisis filogenètiques. La Figura 46 representa les relacions filogenètiques dels principals grups de vertebrats. El grup més ancestral és representat pels peixos. A continuació hi trobem els amfibis, els rèptils i les aus. En el grup dels mamífers hi ha els marsupials que són el grup germà dels placentaris (els rosegadors, els carnívors, els perissodàctils, els artiodàctils, les mones de sud Amèrica, les mones vell món i els simis).

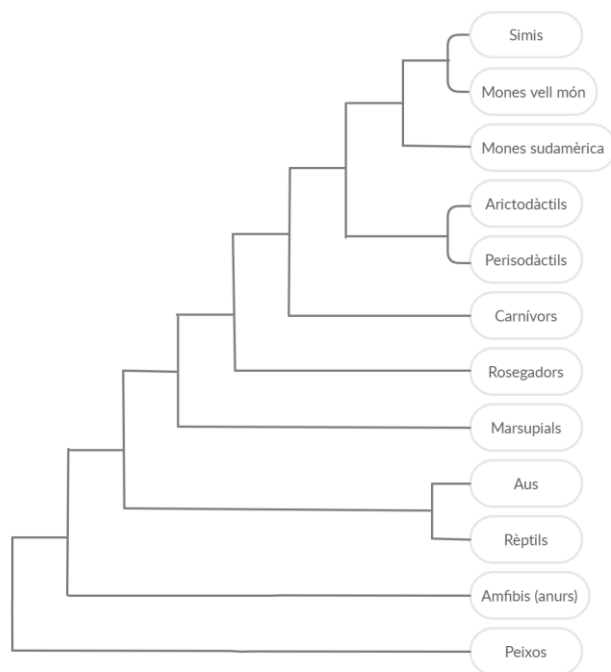


Figura 46. Arbre filogenètic de les espècies.

Comparant-ho amb els resultats dels arbres filogenètics obtinguts de les seqüències de DNA i proteïna del gen DAO (Figura 43), es pot veure que les filogènies del gen segueixen el mateix patró que la filogènia de les espècies. Són unes filogènies consistents amb la de la Figura 46. En cas que no l'haguessin seguit, indicaria que la filogènia d'aquest gen seria independent de la filogènia de les espècies, és a dir, el gen i les espècies haurien tingut una història evolutiva independent.

També he pogut observar que aquest gen és molt antic ja que apareix en llamprees, que pertanyen al grup de vertebrats més antic conegut. Les llamprees formen part del grup de peixos més primitiu que són els agnats. Els primers agnats van aparèixer fa uns 510 milions d'anys i van ser molt abundants fins que la majoria de les seves espècies van desaparèixer fa uns 370 milions d'anys. Per tant, això vol dir que fa 510 milions d'anys o més que existeix el gen DAO. El fet que les llamprees el tinguin i siguin uns representants tan primitius dins els peixos (agnats) demostra que el DAO es un gen important en la història evolutiva dels vertebrats.

3. ANÀLISI DE L'ACTIVITAT DE LA DAO EN UNA MOSTRA DE SANG

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de sang podrien explicar una determinada base genètica ja que, en el meu cas, ha sortit una activitat reduïda de la DAO i a la meua mare una possible deficiència de la DAO.

La causa principal de la disfunció enzimàtica de la DAO és per un origen genètic. (ADD. *Adriana Duelo Dietistas*) La migranya no és hereditària, ja que el que s'hereta és el dèficit de la DAO. No s'ha estudiat exactament l'alteració que rep l'enzim o què és el que provoca la seva falta o baixa activitat en els pacients amb migranya, però podria estar relacionat amb el polimorfisme genètic d'un nucleòtid de l'enzim DAO (en els exons del cromosoma 7 del gen AOC1 (DAO). Tenen de referència rs1015611, rs1049742 i rs1049793) .

El valor que determina l'existència d'una activitat funcional baixa de DAO es troba per sota dels 80 HDU/ml (Unitats de Degradació d'Histamina). Aquest nombre, s'ha arribat a comprovar que és el mínim per a que es pugui garantir el correcte metabolisme de la histamina per evitar els efectes adversos, entre ells la migranya.

Hi poden haver diversos motius que portin a un dèficit d'aquest enzim, que poden agreujar el dèficit i fins a arribar als símptomes. Un dels factors pot ser **genètic**, que com he dit anteriorment pot estar relacionat amb el polimorfisme genètic, malgrat que no se n'hagi estudiat exactament l'alteració.

Un altre pot ser **farmacològic**, degut a alguns fàrmacs existents implicats en el dèficit o en la baixa activitat de l'enzim Diamino Oxidasa. El que fan és bloquejar o inhibir enzims implicats en la metabolització de la histamina, sobretot la DAO, o alliberen histamina endògena. Aquest risc és de gran importància, ja que hi ha medicaments d'ús comú que hi estan involucrats com per exemple el "naproxén".

Per tant, a partir dels resultats de la meva anàlisi, podria ser que jo hagués heretat el dèficit de DAO de la meva mare.

Aquests resultats que he obtingut es podrien millorar. Degut a la falta de temps, només he pogut fer l'anàlisi a dues persones, en canvi hagués anat molt bé incloure més persones de la meva família en el treball. D'aquesta manera hagués pogut precisar molt més a l'hora d'extreure'n les conclusions.

També hagués pogut comparar amb famílies que no tinguessin dèficit DAO ni migranya, que m'haguessin servit com a grup control del meu procés experimental.

A part, amb un seguiment al llarg de tot l'any dels meus nivells de dèficit DAO m'hauria donat més informació sobre la variabilitat temporal del dèficit d'aquest gen, si és que en té.

La meua experiència personal va passar per moltes fases diferents. Després d'unes quantes visites al neuròleg i de prendre uns quants medicaments sense cap mena d'èxit, vam optar per intentar solucionar el meu problema a través de la medicina alternativa. Primer de tot, van començar variant la meua dieta alimentària, eliminant alguns dels aliments principals que causen inflamació. Em van treure els làctics i derivats, blat, sucres i soja. També les solanàcies (patates, tomàquets, espinacs, bledes, pebrot, albergínia...). Després em van fer prendre probiòtics i desintoxicar el fetge (amb "Hepatobiane"). Finalment per baixar els nivells d'histamina em van receptar l'"Immunorespir".

La medicina alternativa em va fer descobrir l'enzim DAO. Fins que no em vaig prendre el "Migrasin" (Figura 47), un suplement enzimàtic indicat per al maneig dietètic de la migranya i cefalees causades per dèficit de la DAO, no em va desaparèixer el mal. Només prenent-me el medicament i sense fer-me cap anàlisi, vaig poder deduir la causa de les meves migranyes. I no ha sigut fins ara, a conseqüència del meu treball, que he pogut confirmar el meu dèficit de la DAO.

Hi ha tres possibles escenaris dins del meu gen que em poden produir el dèficit. Pot ser que el gen de la DAO no se m'expressi degut a mutacions a la regió del promotor. També pot ser que el gen sí que se m'expressi, però que alguna mutació em produeixi un codó STOP al llarg de la seqüència del gen, de manera que la proteïna resultant sigui incompleta i no funcional. I l'altre possible opció és que el gen s'expressi, però que alguna mutació alteri la conformació del centre actiu de l'enzim de manera que no sigui afí a la histamina.



Figura 47. Migrasin, restableix l'activitat de l'enzim DAO a nivell intestinal i amb això el correcte metabolisme de la histamina alimentària, permetent el maneig dietètic dels símptomes. Conté extracte d'enzim Diamino Oxidasa (DAO), cafeïna i vitamines del grup B.

CONCLUSIONS

Entre les diferents conclusions que es desprenen del meu treball de recerca destaco:

- El gen DAO ha anat evolucionant al llarg de 500 milions d'anys, des dels agnats primitius de principis del Paleozoic (representats en el meu estudi per les llamprees-uns dels vertebrats més antics dels coneguts).
- Les seqüències d'aquest gen són força estables degut a la major quantitat de contingut de la parella guanina citosina entre les quals es produeixen unions triples de pont d'hidrogen entre les cadenes complementàries de la molècula de DNA. Per tant, aquest fet fa disminuir la probabilitat de que hi hagi mutacions.
- Aquest gen i les espècies de vertebrats analitzades en el meu estudi tenen una història evolutiva dependent, ja que les seves respectives filogènies segueixen el mateix patró.
- La migranya no és hereditària, ja que el que s'hereta és el dèficit de la DAO. He pogut comprovar que tinc una activitat reduïda de la DAO i la meua mare una possible deficiència. Aquests resultats ens podrien explicar a partir d'una determinada base genètica, i per tant jo podria haver-lo heretat. El factor genètic pot estar relacionat amb el polimorfisme genètic.
- Seguint unes pautes d'alimentació i amb alguns suplementes alimentaris, pots minimitzar molt els símptomes del dèficit DAO, entre ells, la migranya. Aquests remeis em van ser de gran ajuda i n'estic molt agraïda. Per aquesta raó, amb aquest treball m'agradaria donar a conèixer aquest gen i ajudar a les persones que probablement pateixin aquest dèficit, sense estar-ne assabentades.

BIBLIOGRAFIA

CARREÑO, Oriol. “Anàlisi genètica i funcional de la migranya hemiplègica i la migranya comuna”. Universitat de Barcelona, 2011.
<https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/85723/Oriel_Carre%C3%B1o_TesiDoctoral.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [consulta:10/08/2020]

CEBRIÁN, Ana. “Papel de la histamina en la alimentación: revisión bibliográfica de las distintas patologías que puede ocasionar su exceso en el organismo”. Trabajo final de Máster Nutrición y Salud. Universitat Oberta de Catalunya.
<<http://openaccess.uoc.edu/webapps/o2/bitstream/10609/84005/6/acebrianfTFM0618memoria.pdf>> [consulta:11/08/2020]

COFLLEIDA. <https://www.coflleida.cat/arxiu/Document_cat_8695.pdf>
[consulta:10/08/2020]

LÓPEZ, José Manuel. “Receptores de histamina, de la teoría a la terapéutica”. Farmacia Las Fuentes. Marzo:2020.
<<https://docs.google.com/a/iesperfontdevila.cat/viewer?a=v&pid=sites&srcid=aW5mby1mYXJtYWNPYS5jb218aW5mby1mYXJtYWNPYXxneDo2MTBjZjh mZmQ0OGNIZDg4>> [consulta:18/08/2020]

WORLD HEALTH ORGANIZATION. “The global burden of disease”. 2004.
<https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf?ua.> [consulta:18/08/2020]

WEBGRAFIA

CASTEJÓN, Natalia. *Alimentación y migraña*. Webconsultas, 2019.
<<https://www.webconsultas.com/dieta-y-nutricion/nutricion-y-enfermedad/dao-tiramina-e-histamina-en-los-alimentos-como-afectan-a-la>>
[consulta: 10.08.2020]

CHURCH, Dr Martin K. *Receptores de la histamina, agonismo inverso y alergia*. Comentari: Dr. Dario Ignacio Colombaro Allergy Clin Immunol. Juny: 2004.

<<https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=33251>>
[consulta:19.08.2020]

DR. HEALTHCARE. *Estudio de genética molecular de actividad de Diamino-Oxidasa (DAO) (AOC1-V)*. Dr Healthcare España, S.L. (Barcelona, España). <<https://dr-healthcare.com/portfolio/estudio-de-genetica-molecular-de-actividad-de-dao/>> [consulta:18/10/2020]

DR. HEALTHCARE. *Histamina en los alimentos*. Dr Healthcare España, S.L. (Barcelona, España).
<<https://dr-healthcare.com/portfolio/histamina-en-los-alimentos/>>
[consulta:11.08.2020]

DUELO, Adriana. *Factores que desencadenan déficit de DAO*. ADD, Adriana Duelo Dietistas, 2012.
<<http://www.adrianaduelo.com/factores-que-desencadenan-deficit-de-dao/>> [consulta:14.08.2020]

ETSELQUEMENGES. *Salut. Migranya*. La consulta soycomocomo.

<<https://etselquemenges.cat/salut/migranya>> [consulta: 10.08.2020]

GENERALITAT DE CATALUNYA. *Migranya*. Canal Salut 2017.

<<https://canalsalut.gencat.cat/ca/detalls/article/Migranya>> [consulta: 10.08.2020]

GENERALITAT DE CATALUNYA. *Neuràlgia del trigemin*. Canal Salut 2017.

<https://canalsalut.gencat.cat/ca/detalls/article/neuralgia_trigemin>
[consulta: 01.07.2020]

INTERNATIONAL SOCIETY OF DAO DEFICIENCY. *What is DAO deficiency?*. Consell d'administració de la Societat, Madrid. International society of DAO deficiency.

<<https://www.deficitdao.org/en/dao-deficiency/what-is/>>
[consulta: 11.08.2020]

MAYO CLINIC. *Migraine*. Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER), gener 2020.

<<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/migraine-headache/symptoms-causes/syc-20360201>> [consulta: 10.08.2020]

MEDLINE PLUS. *Cefalea*. MedlinePlus, Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU.

<<https://medlineplus.gov/spanish/headache.html>> [consulta: 29.06.2020]

TORCHIO, Federica. *El paper de CGRP i els seus antagonistes en la migranya*. Flipper, 2013. <<http://flipper.diff.org/app/items/info/5242>> [consulta: 02.07.2020]

VHIR. *Migranya*. Fundació hospital universitari Vall d'Hebron. <<https://hospital.vallhebron.com/ca/malalties/migranya>> [consulta: 01.07.2020]

VIQUIPÈDIA. *Àgnats*. Setembre: 2020.

<<https://ca.wikipedia.org/wiki/%C3%80gnats>> [consulta:22.10.2020]