

LA MORT SOBTTADA CARDÍACA



BUSCANT MUTACIONS EN ELS
GENS QUE CODIFIQUEN PER ALS
CANALS IÒNICS CARDÍACS

Paula Bosch Masanas
2n batxillerat A
Institut Josep Brugulat
Promoció 2020-2022
Tutora: Helena Riuró

AGRAÏMENTS

Aquest treball no hauria estat possible si no fos per l'ajuda de diverses persones. Algunes han estat al meu costat durant tot el procés, i d'altres només durant un breu període, però totes m'han ajudat i han fet possible que jo redactés aquest treball.

En primer lloc, m'agradaria agrair a tots els treballadors de l'IDIBGI que m'han acompanyat durant les pràctiques al laboratori. Sense la Núria, la Laura i, especialment, la Sara i l'Alexandra, no hauria pogut tirar endavant aquest treball. Gràcies per ensenyar-me com funciona realment un laboratori i per dedicar una estona del vostre temps a explicar-me els diferents procediments.

En segon lloc, m'agradaria agrair a la meva germana Clàudia per ajudar-me a fer la portada i tenir la paciència de canviar-la mil cops perquè quedés com jo volia. Per aquest mateix motiu també vull agrair-li a la meva amiga Núria haver-li dedicat al meu treball unes quantes hores quan ella encara no havia acabat el seu.

Finalment, i en especial, vull agrair a la meva tutora Helena Riuró, que m'ha ajudat des de bon principi, quan encara havia d'escollir el tema. Gràcies per aconseguir que pogués fer les pràctiques a l'IDIBGI, per orientar-me i ajudar-me a dirigir el treball cap a la direcció correcta, per repassar cada paraula que he escrit i corregir-me quan m'equivocava, i sobretot gràcies per explicar-me tot allò que no m'havia quedat clar les vegades que calgués. Moltíssimes gràcies Helena, sense tu no hauria pogut tirar endavant aquest treball.

RESUM

La mort sobtada cardíaca (MSC), com el seu nom indica, transcorre quan el cor deixa de batejar de forma inesperada, impedit que la sang pugui arribar al cervell i als altres òrgans. Així doncs, el pacient pot morir en qüestió de segons, ja que en moltes ocasions la MSC és el primer símptoma d'una malaltia que no ha estat diagnosticada a temps. Algunes vegades, però, els pacients tenen símptomes previs, com ara síncope o electrocardiogrames irregulars. D'aquesta manera, quan a algun pacient se li detecta una arrítmia, la qual cosa podria acabar provocant-li la MSC, se li recomana que, a més d'un diagnòstic clínic, es faci unes proves genètiques per detectar si té alguna mutació en algun dels gens que codifiquen pels canals iònics cardíacs.

Així doncs, la hipòtesi d'aquest treball ha estat que bona part de les arrítmies són causades per una mutació en un o més gens dels canals iònics cardíacs. Per aquest motiu, els objectius d'aquesta recerca s'han centrat en ampliar i consolidar els coneixements del cor i, més específicament, de la genètica cardiovascular. D'aquesta manera, realitzant el marc teòric s'ha adquirit la informació necessària per a poder dur a terme la part pràctica, que ha consistit en seqüenciar els genomes de tres pacients als quals se'ls havia diagnosticat una arrítmia per veure si tenien alguna mutació en algun dels gens que codifiquen pels canals iònics cardíacs.

A partir d'aquí s'han analitzat les dades obtingudes i finalment s'han pogut validar aquelles mutacions que es considerava que podien haver estat les causants de les canalopaties, confirmant així la hipòtesi del treball. No obstant, cal recordar que el fet que aquestes mutacions s'hagin confirmat no significa necessàriament que siguin les causants de les arrítmies, sinó que és el més probable. Per acabar de confirmar els resultats, doncs, caldria estudiar més a fons els casos fent la segregació familiar o estudis funcionals.

RESUMEN

La muerte súbita cardíaca (MSC), como su nombre indica, se produce cuando el corazón deja de latir de forma inesperada, impidiendo que la sangre pueda llegar al cerebro y los demás órganos. Así pues, el paciente puede morir en cuestión de segundos, ya que en muchas ocasiones la MSC es el primer síntoma de una enfermedad que no ha sido diagnosticada a tiempo. Algunas veces, sin embargo, los pacientes tienen síntomas previos, como por ejemplo síncope o electrocardiogramas irregulares. De este modo, cuando a algún paciente se le detecta una arritmia, lo que podría acabar provocándole la MSC, se le recomienda que se haga unas pruebas genéticas para detectar si tiene alguna mutación en alguno de los genes que codifican para los canales iónicos cardíacos.

Así pues, la hipótesis de este trabajo ha sido que buena parte de las arritmias son causadas por una mutación en uno o más genes de los canales iónicos cardíacos. Por este motivo, los objetivos de esta investigación se han centrado en ampliar y consolidar los conocimientos del corazón y, más específicamente, de la genética cardiovascular. De este modo, realizando el marco teórico se ha adquirido la información necesaria para poder llevar a cabo la parte práctica, que ha consistido en secuenciar los genomas de tres pacientes a los cuales se les había diagnosticado una arritmia para ver si tenían alguna mutación en alguno de los genes que codifican para los canales iónicos cardíacos.

A partir de aquí se han analizado los datos obtenidos y finalmente se han podido validar aquellas mutaciones que se consideraba que podían haber sido las causantes de las canalopatías, confirmando así la hipótesis inicial del trabajo. No obstante, cabe recordar que el hecho de que estas mutaciones se hayan confirmado no significa necesariamente que sean las causantes de las arritmias, sino que es lo más probable. Así pues, para terminar de confirmar los resultados habría que estudiar más a fondo los casos haciendo la segregación familiar o estudios funcionales.

ABSTRACT

Sudden cardiac death (SCD), as its name suggests, occurs when the heart stops beating unexpectedly, preventing blood from reaching the brain and other organs. Consequently, the patient can die in a matter of seconds, considering the fact that the SCD is sometimes the first symptom of a disease that has not been detected in time. Sometimes, however, patients have previous symptoms, such as syncope or irregular electrocardiograms. Thus, when an arrhythmia, which could end up causing SCD, is detected, it is recommended to perform genetic tests to determine whether the patient has any mutations in any of the genes encoding the cardiac ion channels.

Therefore, the hypothesis of this project has been that a good part of the arrhythmias are caused by a mutation in one or more genes of the cardiac ion channels. For this reason, the objectives of this research have focused on expanding and consolidating the knowledge of the heart and, more specifically, of cardiovascular genetics. In this way, while carrying out the theoretical part, the necessary information has been acquired in order to be able to carry out the practical part, which has consisted of sequencing the genomes of three patients who had been diagnosed arrhythmias to see if they had any mutations in any of the genes encoding the cardiac ion channels.

From here, the data obtained were analyzed and it was finally possible to validate those mutations that were considered to may have caused the channelopathies, thus confirming this project's hypothesis. However, it should be noted that the fact that these mutations have been confirmed does not necessarily mean that they are the cause of the arrhythmias, even if it's extremely likely. In order to confirm the results, then, it would be necessary to study more deeply each case by doing family segregation or functional studies.

ÍNDIX

<u>INTRODUCCIÓ</u>	9
1. Motivació	9
2. Hipòtesi	9
3. Objectius	9
4. Metodologia	10
<u>MARC TEÒRIC</u>	11
1. EL COR	11
1.1. Morfologia	11
1.2. Fisiologia	13
1.3. Activitat elèctrica	15
1.4. Potencial d'acció cardíac	16
1.5. L'electrocardiograma	17
1.6. Mort sobtada cardíaca	19
1.7. Canalopaties	20
1.8. Cardiomiopaties	23
2. GENÈTICA	25
2.1. L'àcid desoxiribonucleic	25
2.2. L'àcid ribonucleic	26
2.3. Transcripció	26
2.4. Traducció	27
3. MUTACIONS I POLIMORFISMES	29
3.1. Mutacions gèniques	29
3.2. Polimorfismes	30
3.3. Mutacions patogèniques	30
4. SEQÜENCIACIÓ GENÒMICA	32
4.1. El genoma humà	32
4.2. Reacció en cadena de la polimerasa	32

4.3.	Seqüenciació de DNA	33
4.4.	Genètica de les canalopaties i les cardiomiopaties	35
<u>MARC PRÀCTIC</u>		38
1. PLANTEJAMENT DE LA RECERCA		38
2. METODOLOGIA		39
2.1.	Seqüència de processos duts a terme al laboratori	39
2.2.	Protocols i procediments per dur a terme aquests processos	40
2.2.1.	Protocol extracció de DNA	40
2.2.2.	Protocol seqüenciació <i>MiSeq</i>	41
2.2.3.	Anàlisi dels resultats del <i>MiSeq</i>	47
2.2.4.	Protocol de seqüenciació Sanger	47
3. RESULTATS		51
3.1.	Resultats clínics	51
3.2.	Resultats del <i>MiSeq</i>	51
3.3.	Anàlisi de les dades del <i>MiSeq</i>	53
3.4.	Validació per Sanger de les variants potencialment patogèniques	53
4. DISCUSSIÓ		56
<u>CONCLUSIONS</u>		58
<u>BIBLIOGRAFIA</u>		60

INTRODUCCIÓ

MOTIVACIÓ

Fins a l'últim moment no vaig saber ben bé quin tema escollir per al Treball de Recerca. Tenia clar que el volia fer sobre genètica, però al tractar-se d'un camp tan ampli no sabia en què centrar-me. Uns dies abans d'entregar l'elecció del tema, però, ens van fer una xerrada virtual sobre el DNA a l'institut i van mencionar la genètica forense. Després de fer una breu recerca sobre el tema, i sobretot gràcies a l'ajuda de la meva tutora, vaig seleccionar aquest tema. Al principi no ho veia gens clar, perquè no tenia gaire coneixement d'aquest àmbit i em semblava molt complicat. Això, però, també em va motivar a voler tirar endavant el treball per veure si n'era capaç, a banda del fet que crec que és una gran oportunitat per adquirir coneixement, no només d'una manera teòrica, sinó també sobre el funcionament d'un laboratori.

HIPÒTESI

La pregunta de recerca és: “És possible que una mutació en algun dels gens que codifiquen per als canals iònics cardíacs sigui la causant d'una arrítmia?”

La hipòtesi principal és que, efectivament, una bona part de les arrítmies són causades per una mutació en un o més gens que codifiquen per a proteïnes dels canals iònics cardíacs, fet que genera un defecte elèctric cardíac.

OBJECTIUS

TEÒRICS

- Ampliar els coneixements de genètica i, especialment, de genètica cardiovascular.
- Entendre l'estructura i el funcionament del cor, així com les malalties cardiovasculars.
- Distingir els diferents gens que poden causar malalties cardiovasculars.
- Conèixer les diferents maneres que hi ha de seqüenciar el genoma i el procés que s'utilitza.

PRÀCTICS

- Observar com es seqüencia el genoma en un laboratori i com s'analitzen les dades obtingudes per detectar la causa de mort del pacient.
- Analitzar les dades obtingudes al laboratori per detectar els gens que poden haver causat la mort sobtada cardíaca.

METODOLOGIA

Per a realitzar el marc teòric d'aquest treball s'han consultat diversos llibres, pàgines web, articles i tesis doctorals escrites per Helena Riuró i Olallo Sánchez-Molero. Pel que fa al marc pràctic, s'ha fet una estada a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona durant l'estiu, que també ha proporcionat informació utilitzada en aquest treball. La metodologia per a la realització del marc pràctic, però, es desenvolupa més detalladament a partir de la pàgina 38.

MARC TEÒRIC

1. EL COR

El cor és l'òrgan muscular encarregat de bombar sang a la resta del cos. Té forma de con invertit i la mida aproximada d'un puny (Taylor, T., 2020). És el centre del sistema circulatori, i es troba a la part central de la cavitat toràcica, lleugerament desplaçat cap a l'esquerra, darrera l'estèrnum i enmig dels pulmons (National Heart, Lung and Blood Institute, 2011).

1.1. MORFOLOGIA

El cor es troba dins la cavitat pericàrdica, que està plena de líquid i envoltada pel pericardi, una membrana que produeix un fluid serós que actua com a lubricant i evita la fricció del cor amb els òrgans del voltant quan batega. El pericardi també serveix per mantenir el cor en la seva posició i per preservar un espai buit per tal que el cor pugui expandir-se quan està ple. Està format per dues capes: una capa visceral que cobreix l'exterior del cor i una capa parietal que forma un sac al voltant de la cavitat pericàrdica (Taylor, T., 2020).

La paret del cor està formada per tres capes: l'epicardi, el miocardi i l'endocardi (Taylor, T., 2020; Figura 1):

- L'**epicardi**, conegut també com a pericardi visceral, és la capa externa de la paret del cor. Així doncs, la seva funció és lubricar i protegir l'exterior d'aquest òrgan.
- El **miocardi** és la capa situada entre l'epicardi i l'endocardi. Conté el teixit muscular cardíac i, com que és l'encarregat de bombar la sang a la resta del cos, és el responsable de la majoria del gruix i massa de la paret del cor.
- L'**endocardi** és una membrana d'endoteli que recobreix internament les cavitats del cor i s'encarrega d'evitar que la sang s'enganxi a l'interior d'aquest òrgan i formi coàguls que podrien resultar mortals per a l'individu.

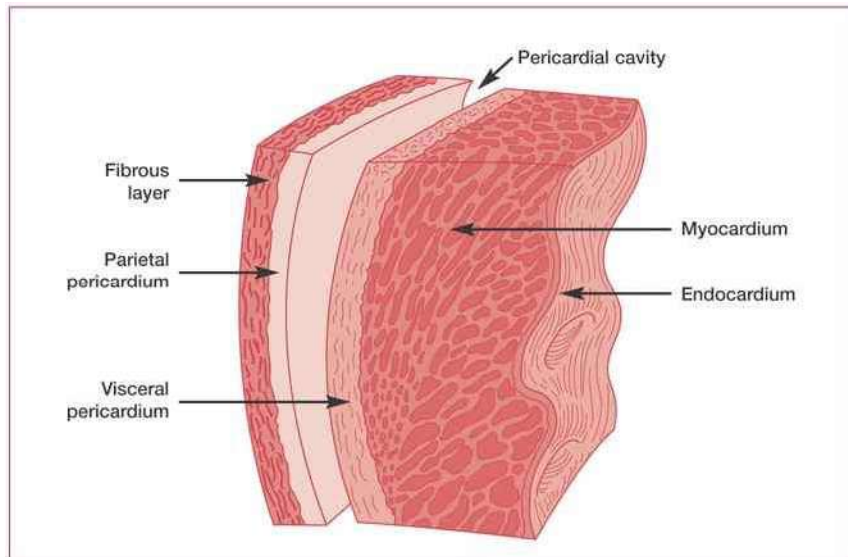


Figura 1: Les diferents capes que recobreixen el cor (Font: Venkatesan, S.).

El cor està format per quatre cavitats buides envoltades de músculs i altres teixits cardíacs. Les dues cavitats superiors s'anomenen aurícules, i les dues inferiors, ventricles. Els ventricles són els responsables de bombar la sang a la resta del cos, motiu pel qual són més grans i estan envoltats de parets musculars més gruixudes que les aurícules, que són les encarregades de rebre la sang i per tant són més petites. Així doncs, els ventricles estan connectats a les artèries, que s'emporten la sang del cor, mentre que les aurícules estan connectades a les venes, que són les que porten la sang al cor (Figura 2). D'aquesta manera, les artèries i les venes són les que uneixen el cor amb la resta del sistema circulatori.

El costat dret i el costat esquerre del cor estan separats per una paret anomenada septe. El costat dret del cor s'ocupa de bombar sang als pulmons, mentre que el costat esquerre bomba sang a tota la resta del cos. És per aquest motiu que les cavitats del costat dret són més petites i tenen menys miocardi que les que es troben al costat esquerre (Taylor, T., 2020). A més, les aurícules també tenen la paret més fina perquè només bomben sang fins els ventricles, mentre que aquests tenen el miocardi més gruixut perquè bomben sang fins als pulmons i tota la resta del cos.

Les vàlvules cardíques controlen el flux de sang perquè es mogui en la direcció correcta, i eviten que la sang flueixi en sentit contrari i retrocedeixi. El cor consta de quatre vàlvules, que es poden classificar en dos tipus (Taylor, T., 2020).

- Les **vàlvules auriculoventriculars** estan situades al mig del cor, i la seva funció és permetre el flux de sang des de les aurícules fins als ventricles i evitar que es produeixi a la inversa. La vàlvula auriculoventricular situada al costat esquerre del cor s'anomena

vàlvula bicúspide o mitral, mentre que la vàlvula tricúspide es situa al costat dret del cor. Aquestes dues vàlvules, com el seu nom indica, estan formades per dues i tres cúspides, respectivament. Les cúspides tenen la funció de separar-se per permetre el pas de la sang i ajuntar-se per impedir-ne el retorn.

- Les **vàlvules semilunars**, anomenades així per la forma de lluna creixent de les seves tres cúspides, estan situades entre els ventricles i les artèries, i són més petites que les vàlvules auriculoventriculars. La vàlvula semilunar del costat dret del cor és la vàlvula pulmonar, que impedeix el retorn de la sang del tronc pulmonar fins el ventricle dret. La vàlvula semilunar del costat esquerre del cor és la vàlvula aòrtica, que impedeix que la sang de l'artèria aorta retorni al ventricle esquerre.

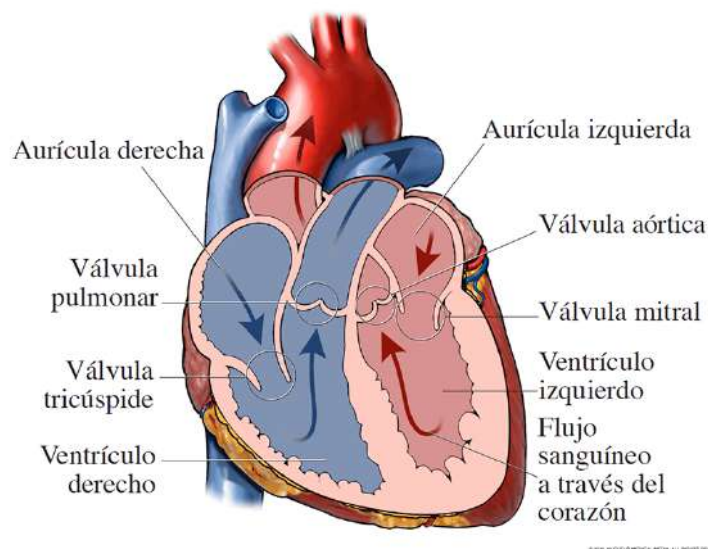


Figura 2: Estructura del cor (Font: National Heart, Blood, and Lungs Institute).

1.2. FISIOLOGIA

El cicle cardíac consta de tres fases, i inclou tots els esdeveniments que tenen lloc durant un batec del cor (Taylor, T., 2020; Figura 3):

- Durant la primera fase, anomenada **diàstole o fase de relaxació**, les cèl·lules del teixit cardíac es relaxen i permeten que els ventricles s'emplenin fins un 70-75% de la seva capacitat, ja que només s'emplenaran completament durant la sístole auricular. Això és possible perquè les vàlvules auriculoventriculars es mantenen obertes durant tota aquesta

fase per permetre el pas de la sang fins als ventricles, mentre que les vàlvules semilunars romanen tancades per evitar que la sang surti abans d'hora.

- Durant la **sístole auricular**, les aurícules es contrauen i bomben la sang cap als ventricles. Perquè això sigui possible, les vàlvules auriculoventriculars es mantenen obertes i les vàlvules semilunars romanen tancades. Com que les aurícules són molt més petites que els ventricles, durant aquesta fase només emplen un 25-30% dels ventricles (el que faltava per acabar d'omplir-los), que romanen en diàstole.
- Durant la **sístole ventricular**, els ventricles es contrauen per bombar la sang cap a les artèries aorta i pulmonar. La pressió dels ventricles provoca que les vàlvules semilunars s'obrin i les auriculoventriculars es tanquin per tal que la sang pugui fluir des dels ventricles fins les artèries.

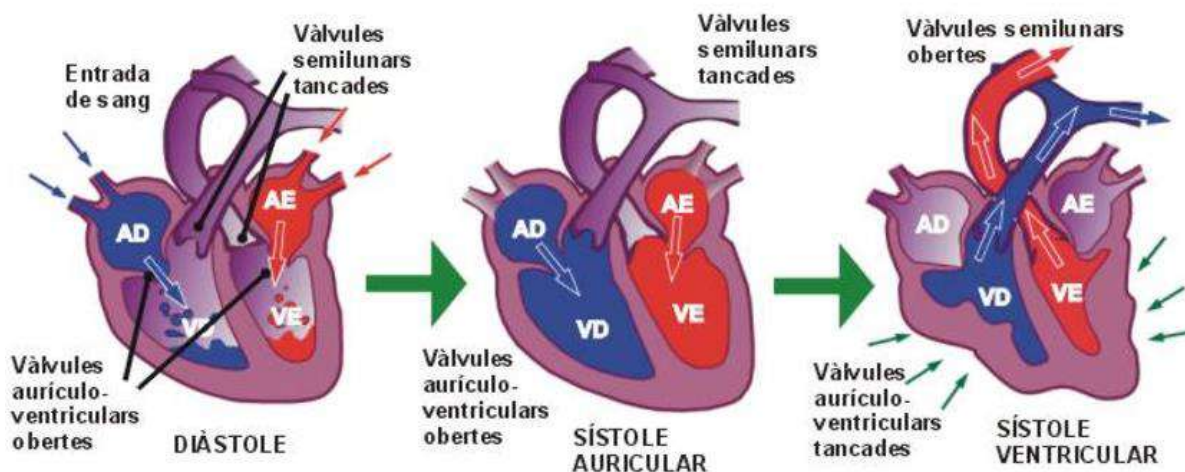


Figura 3: Les tres fases del cicle cardíac (Font: Aula 2005).

LA CIRCULACIÓ

Al costat dret del cor, la sang desoxigenada dels teixits del cos flueix a través de les venes cava superior i inferior fins a l'aurícula dreta. Llavors, la sang es bomba al ventricle dret, que es contrau i envia sang a través de l'artèria pulmonar fins als pulmons, on aquests afegixen oxigen a la sang. Al costat esquerre del cos, la sang oxigenada dels pulmons flueix a través de les venes pulmonars fins a l'aurícula esquerra. A continuació, la sang es mou fins al ventricle esquerre, que es contrau i, a través de l'artèria aorta, envia sang des del cor a la resta del cos per alimentar les cèl·lules i els teixits (Taylor, T., 2020; Figura 4).

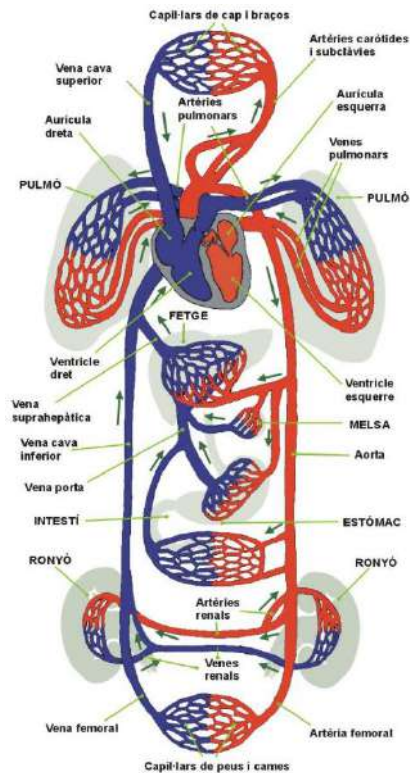


Figura 4: El sistema circulatori (Font: Aula 2005).

1.3. ACTIVITAT ELÈCTRICA

El múscul cardíac té la capacitat de generar impulsos elèctrics que estimulen els batecs del cor, de manera que, mitjançant el sistema de conducció cardíac, aquest pot establir el seu propi ritme i, al mateix temps, mantenir i coordinar aquest ritme a la resta de les seves estructures (Taylor, T., 2020). Així doncs, amb cada batec un senyal elèctric viatja des de la part superior del cor fins a la part inferior.

Primerament, el senyal comença en les anomenades cèl·lules de marcapassos, que es troben en el nòdul sinoauricular (SA) en la paret de l'aurícula dreta. A continuació, el senyal elèctric viatja a través de les aurícules, fet que bombin sang als ventricles, i després descendeix fins arribar a un grup de cèl·lules de marcapassos anomenat nòdul auriculoventricular (AV), ubicat entre les aurícules i els ventricles. Aquí, el senyal disminueix lleugerament, fet que permet que els ventricles acabin d'emplenar-se de sang. Seguidament, el nòdul AV transmet el senyal a través del feix de His, un filament de teixit conductor que es divideix en ramificacions dretes i esquerres (fibres de Purkinje) per tal de poder portar el senyal fins les parets dels dos ventricles. D'aquesta manera s'estimulen les cèl·lules musculars cardíacques, que es contrauen i bomben

sang fora del cor. Finalment, els ventricles es relaxen i el procés del batec del cor comença de nou al nòdul sinoauricular.

1.4. POTENCIAL D'ACCIÓ CARDÍAC

En aquest apartat s'explicarà el potencial d'acció cardíac (PAC) i les diferents fases d'aquest, així com els principals ions i canals que hi estan involucrats (Riuró, H., 2014 i Sánchez-Molero, O., 2017):

Els canals iònics cardíacs són proteïnes integrals transmembrana que regulen el pas d'ions de la membrana plasmàtica i dels orgànuls de la cèl·lula a favor del gradient de concentració i del gradient electroquímic, generant d'aquesta manera un corrent iònic. Així doncs, el potencial d'acció cardíac és el senyal elèctric que viatja al llarg de la membrana d'una cèl·lula, i es divideix en cinc fases (Figura 5):

- **Fase 0 o fase de despolarització:** s'inicia per una obertura ràpida dels canals de Na^+ . El corrent de sodi que es produeix com a conseqüència provoca que la membrana es despolaritzi i passi de -90mV a $+40\text{mV}$.
- **Fase 1 o repolarització parcial de la membrana:** just després de la despolarització, la cèl·lula es repolaritza a causa de la inactivació dels canals de Na^+ i l'obertura dels canals de K^+ (que provoquen un corrent de sortida de K^+).
- **Fase 2 o repolarització lenta:** es produeix per l'obertura dels canals de Ca^{2+} (i la consegüent entrada de Ca^{2+}). A causa de la prèvia obertura dels canals de K^+ , el potencial d'acció comença a disminuir lentament retornant a la seva línia basal.
- **Fase 3 o fase de repolarització ràpida tardana:** disminueix el PAC pel tancament dels canals de Ca^{2+} i l'obertura dels canals de K^+ .
- **Fase 4 o fase de repòs:** la cèl·lula recupera el seu potencial de repòs (uns -90mV). Tot i així, té un excés de sodi, per la qual cosa la bomba de sodi i potassi¹ bomba Na^+ a l'exterior de la cèl·lula per tal de restablir el gradient inicial.

¹ Bomba de sodi i potassi ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$): Proteïna transmembrana que bomba Na^+ cap a l'exterior i K^+ cap a l'interior.

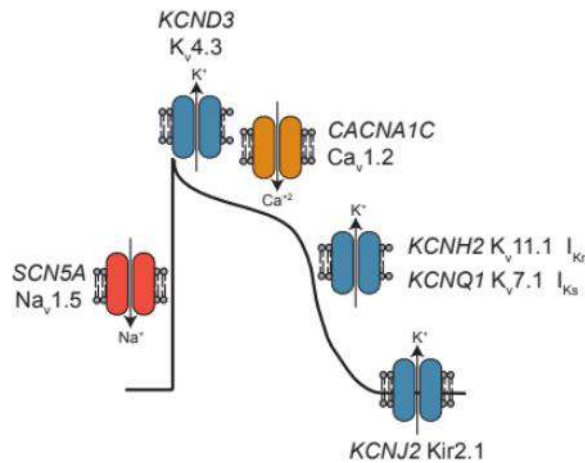


Figura 5: Esquema de les diferents fases del PAC amb els corrents iònics d'entrada i sortida de la membrana cel·lular (Font: Riuró, H., 2014).

1.5. L'ELECTROCARDIOGRAMA

L'electrocardiograma (ECG) és una prova senzilla i indolora que detecta i registra l'activitat elèctrica del cor. Es realitza col·locant elèctrodes en determinades zones del cos del pacient, mitjançant els quals s'observa l'activitat elèctrica en un paper quadriculat, en el qual l'eix vertical representa el voltatge o altura (mm) i l'eix horitzontal el temps (s). Els quadrats petits mesuren 1 mm i els grans 5 mm. D'aquesta manera, un quadrat petit representa un interval de 0,04 segons, i un quadrat gran representa un interval de 0,20 segons (Cabrera, L., 2015).

L'ECG presenta com a punt de referència l'anomenada línia basal o línia isoelectrica, que és la línia horitzontal que s'observa entre cada batec (Azcona, L., 2009). D'aquesta manera, els batecs cardíacs queden representats en l'ECG per les diferents oscil·lacions de la línia basal (ones, segments i intervals), de manera que es crea una imatge característica que es va repetint regularment al llarg del paper.

Fonamentalment, l'ECG s'utilitza per detectar trastorns del ritme cardíac (arrítmies) i diagnosticar malalties causades per una aportació insuficient de sang al cor (infart de miocardi i angina de pit). També permet diferenciar el ritme normal del cor (ritme sinusal) d'una taquicàrdia² o una bradicàrdia³, i pot utilitzar-se per diagnosticar bloquejos cardíacs causats per

² Taquicàrdia: Ritme cardíac anormalment ràpid (entre 100 i 300 batecs per minut).

³ Bradicàrdia: Ritme cardíac anormalment lent (menys de 55 batecs per minut).

una interrupció en la transmissió de l'impuls elèctric durant el seu recorregut pel sistema de conducció (Azcona, L., 2009).

Llegint l'electrocardiograma d'esquerra a dreta, s'observen els següents períodes (Cabrera, L., 2015; My EKG, 2021; Azcona, L., 2009; Figura 6):

- **Ona P:** és la primera ona del cicle cardíac i representa la despolarització auricular, és a dir, quan les aurícules es contrauen i envien sang cap als ventricles. La seva part inicial correspon a la despolarització de l'aurícula dreta i la seva part final a la de l'aurícula esquerra. Sol ser ascendent i lleugerament arrodonida, i en condicions normals té una durada màxima de 0,10 segons i una amplitud màxima de 0,25 mV.
- **Segment PR:** és el tram de la línia isoeleèctrica que es troba entre el final de l'ona P i l'inici del complex QRS. Durant aquest període, les aurícules s'acaben de buidar i la velocitat de la transmissió del senyal elèctric disminueix just abans que comenci la contracció ventricular.
- **Complex QRS:** està format per les ones Q, R i S, que representen la despolarització ventricular, és a dir, quan els ventricles es contrauen i bomben la sang. Normalment, les ones Q i S són negatives (descendents), mentre que l'ona R és positiva (ascendent). El complex QRS té una durada mitjana d'entre 0,04 i 0,11 segons.
- **Segment ST:** és el tram de la línia basal que es troba entre el final del complex QRS i l'inici de l'ona T. Representa l'inici de la repolarització ventricular i correspon a la fase 2 del PAC.
- **Ona T:** representa la repolarització ventricular, quan el cor es troba en un període de relaxació després d'haver expulsat la sang que es trobava en els ventricles. Normalment és ascendent, lleugerament arrodonida i de menor amplitud que el complex QRS. No ha de durar més de 0,12 segons.
- **Ona U:** només es veu en alguns casos, i es creu que està relacionada amb la repolarització tardana dels ventricles.

L'electrocardiograma també pot interpretar-se dividint-lo en dos intervals (My EKG, 2021; Figura 6):

- **Interval PR:** és el temps que transcorre entre l'inici de l'ona P i l'inici del complex QRS. Representa la despolarització auricular i la propagació de l'ona de despolarització fins el nòdul auriculoventricular. Té una durada d'entre 0,12 i 0,20 segons.
- **Interval QT:** és el temps que transcorre entre l'inici del complex QRS i el final de l'ona T. Representa la despolarització i repolarització dels ventricles, és a dir, la sístole ventricular.

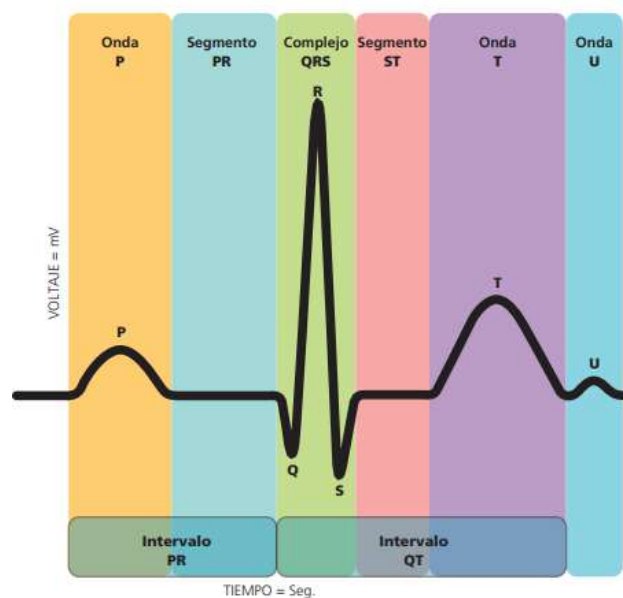


Figura 6: Divisió dels segments i intervals de l'electrocardiograma (Font: Rodríguez, M.).

1.6. MORT SOBTADA CARDÍACA

La mort sobtada cardíaca (MSC) és aquella que es produeix de forma ràpida i inesperada durant la primera hora des de l'inici dels símptomes. Es dona freqüentment en persones que aparentment no tenen cap problema de salut, fet que li atorga un gran interès forense (Sánchez-Molero, O., 2017). La MSC transcorre quan el cor deixa de bategar sobtadament i impedeix que la sang rica en oxigen pugui arribar al cervell i als altres òrgans, per la qual cosa el pacient pot morir en qüestió de minuts si no rep tractament immediatament (Texas Heart Institute, 2016).

La MSC afecta unes 30.000 persones a l'any només a Espanya i la seva màxima incidència és en pacients que tenen entre 35 i 45 anys, tot i que també és força comuna en nadons de fins a 6

mesos d'edat (Brugada, J., 2013). En la majoria de casos de MSC, el primer símptoma és una síncope, que es produeix quan el cor deixa de bategar. Algunes persones també poden sentir un mareig just abans de desmaiar-se, i d'altres no tenen cap símptoma fins la MSC.

És important no confondre un atac de cor amb la MSC. En un atac de cor es redueix o es deté completament la circulació de la sang en una part del cor, fet que provoca la mort del múscul cardíac. En canvi, en la MSC el cor deixa de bategar.

Com que la MSC es produeix sense advertència i de forma molt ràpida, en la majoria dels casos no es pot diagnosticar. Tot i així, hi ha diverses proves mèdiques que poden determinar si els pacients presenten risc de patir una MSC, com ara l'electrocardiograma, l'ecocardiografia⁴, el cateterisme cardíac⁵, la ventriculografia isotòpica⁶ i la ressonància magnètica cardíaca⁷.

La principal causa de la MSC és la malaltia de les artèries coronàries, responsable del 80% de totes les morts sobtades cardíques en adults (Brugada, J., 2013). Altres causes de la MSC són algunes arrítmies com la taquicàrdia ventricular, la fibril·lació ventricular i la bradicàrdia, provocades per trastorns hereditaris que causen un defecte en la conductivitat elèctrica del cor (les canalopaties, que són les responsables d'entre un 5 i un 10% de les MSC; i les cardiomiopaties, que ho són d'entre un 10 i un 15%). Aquest treball es centrarà en aquells pacients susceptibles de patir una MSC a causa d'una canalopatia o d'una cardiomiopatia, motiu pel qual s'exposen a continuació.

1.7. CANALOPATIES

Les canalopaties són arrítmies poc comunes, congènites i hereditàries causades per una mutació genètica en una o més proteïnes situades als canals iònics de la membrana cel·lular cardíaca. Afecten majoritàriament els canals de sodi, potassi i calci, i són les responsables d'entre un 5 i un 10% dels casos de MSC (Macías, A., Vázquez, A., 2013). Les principals canalopaties són la síndrome de QT llarg (SQTL), la síndrome de QT curt (SQTC), la taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (TVPC) i la síndrome de Brugada (SBr).

⁴ Ecocardiografia: Examen no invasiu que utilitza ones sonores per a crear imatges del cor.

⁵ Cateterisme cardíac: Prova diagnòstica invasiva que consisteix en introduir tubs a través dels vasos sanguinis i el cor per tal d'avaluar l'anatomia i el funcionament d'aquest.

⁶ Ventriculografia isotòpica: Estudi que permet determinar com bomba sang el cor i si aquest s'esforça més del normal.

⁷ Ressonància magnètica cardíaca: Estudi no invasiu que permet obtenir una imatge detallada del cor, incloses les cavitats i les vàlvules.

SÍNDROME DE QT LLARG

La SQTL és una malaltia del sistema de conducció cardíac que afecta el procés de repolarització ventricular, de manera que es pot observar en l'electrocardiograma en forma d'un allargament de l'interval QT (Sánchez-Molero, O., 2017). Aquest allargament incrementa el risc de patir *torsade de pointes*, un tipus d'arrítmia. Quan es dona aquest cas, el cor és incapaç de bombar suficient sang oxigenada a la resta del cos, sobretot al cervell. També podria ser que la *torsade de pointes* portés a la fibril·lació ventricular, un altre tipus d'arrítmia que causa contraccions ràpides i incontrolades en les fibres musculars dels ventricles, per la qual cosa el cor tampoc podria bombar suficient sang oxigenada a la resta del cos. En els casos més extrems, la *torsade de pointes* podria conduir a la mort (Texas Heart Institute, 2016).

La síndrome de QT llarg és força rara i normalment és congènita (85% dels casos), tot i que també pot ser causada per algunes medicines, un ictus o altres malalties neurològiques. Té un patró d'herència autosòmica dominant i està provocada per una pèrdua de funció dels corrents repolaritzants o per un augment dels corrents despolaritzants del PAC (Sánchez-Molero, O., 2017).

SÍNDROME DE QT CURT

La SQTC és una canalopatia cardíaca d'herència autosòmica dominant que es caracteritza per un interval QT curt que pot donar lloc a arrítmies i fins i tot a la MSC. Està associada sobretot a la fibril·lació auricular, tot i que també es relaciona amb la ventricular. Contràriament a la SQTL, la SQTC està provocada per un guany de la funció dels canals de potassi cardíacs, fet que pot conduir a una pèrdua de la funció dels canals de calci (Sánchez-Molero, O., 2017).

TAQUICÀRDIA VENTRICULAR POLIMÒRFICA CATECOLAMINÈRGICA

La TVPC és una malaltia cardíaca hereditària caracteritzada per una taquicàrdia que es desencadena en situacions d'emoció o exercici intens, i que pot arribar a provocar la MSC. Les arrítmies són causades per un control inadequat del nivell de calci en el medi intern cel·lular (ITACA, 2017).

Aquesta malaltia té principalment un patró d'herència autosòmica dominant amb una elevada penetrància (Sánchez-Molero, O., 2017). Els pacients afectats no tenen cap malaltia cardíaca estructural i mostren un ECG normal en repòs. Així doncs, la TVPC es pot detectar únicament mitjançant un test d'esforç i una monitorització contínua de l'ECG. Els símptomes d'aquesta malaltia solen aparèixer per primer cop entre els 7 i els 12 anys, i 30% dels pacients afectats pateixen una MSC abans dels 30 anys.

SÍNDROME DE BRUGADA

La SBr és un trastorn genètic poc comú del sistema elèctric cardíac. Les persones que la pateixen neixen amb ella, ja que té un patró d'herència autosòmica dominant, tot i que generalment no en tenen consciència fins als 30 o 40 anys (Texas Heart Institute, 2016). Els únics símptomes de la SBr són les síncope, les arrítmies o palpitations i la MSC. El diagnòstic de la malaltia es fa a través d'un ECG, on sovint s'observa una elevació del segment ST seguida d'una ona T negativa, tot i que a vegades els pacients presenten un ECG aparentment normal. També es poden realitzar estudis electrofisiològics quan s'observa una anomalia en l'ECG però el pacient no presenta símptomes.

La SBr és causada per un defecte en un dels canals iònics cardíacs, normalment una mutació al gen *SCN5A*, que codifica per al canal de sodi cardíac (Sánchez-Molero, O., 2017). Aquest defecte pot provocar fibril·lació ventricular, de manera que pot comportar la MSC.

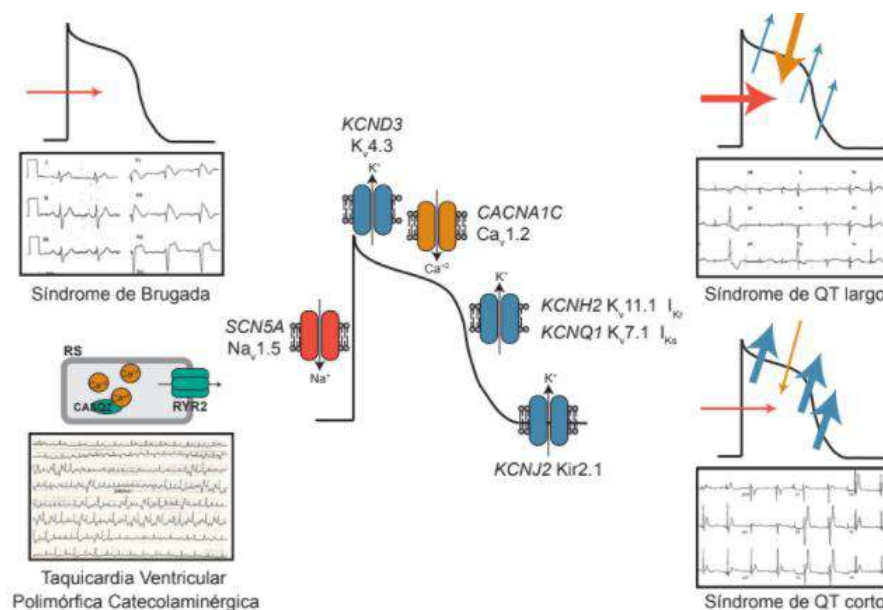


Figura 7: Esquema de les causes de les principals canalopaties en relació al PAC (Font: Riuró, H., 2014).

1.8. CARDIOMIOPATIES

Les cardiomiopaties o miocardiopaties són malalties estructurals del miocardi que provoquen l'augment de la mida del cor o fan que les seves parets siguin més rígides o gruixudes. D'aquesta manera, debiliten aquest òrgan i redueixen la seva capacitat per a bombar sang a la resta del cos i mantenir una activitat elèctrica normal. Això pot comportar arrítmies, insuficiència cardíaca i fins i tot la MSC (NHLBI, 2021). Les cardiomiopaties tenen generalment un patró d'herència autosòmica dominant (Sánchez-Molero, O., 2017).

MIOCARDIOPATIA HIPERTRÒFICA

La miocardiopatia hipertròfica (MCH) és un trastorn que està caracteritzat per l'engrossiment dels ventricles o del septe sense una raó aparent. Les àrees que augmenten la seva mida creen estrenyiments i blocatges en els ventricles, dificultant així el bombeig de la sang. La MCH també pot enrigidir els ventricles i causar canvis en la vàlvula mitral i les cèl·lules del teixit cardíac. Aquesta malaltia afecta 1 de cada 500 persones, sense importar l'edat ni el sexe, i pot ser detectada mitjançant un electrocardiograma (NHLBI, 2021).

MIOCARDIOPATIA DILATADA

La miocardiopatia dilatada (MCD) és un trastorn provocat per l'engrossiment i la debilitació dels ventricles. Normalment comença al ventricle esquerre i amb el temps es va estenent fins al dret. Aquesta malaltia d'herència autosòmica dominant afecta 1 de cada 2500 individus, principalment nens i joves, i pot ser detectada mitjançant un electrocardiograma (Sánchez-Molero, O., 2017). La MCD condueix a la debilitació i posterior mal funcionament de les cambres del cor, motiu pel qual el miocardi ha de treballar més per a poder bombar la sang, fet que, amb el temps, pot arribar a provocar que el cor no pugui bombar sang efectivament. La miocardiopatia dilatada pot comportar insuficiència cardíaca, la malaltia de la vàlvula cardíaca, arrítmia i la formació de coàguls de sang al cor (NHLBI, 2021).

MIOCARDIOPATIA ARRITMOGÈNICA

La miocardiopatia arritmogènica (MA) és una miocardiopatia poc comuna que consisteix en el reemplaçament del teixit muscular per teixit fibroadipós (NHLBI, 2021). Es produeix principalment al ventricle dret, però en la majoria de casos també afecta el ventricle esquerre.

Això provoca interrupcions en l'activitat elèctrica del cor i causa arrítmies, síncope i, en alguns casos, la MSC. La miocardiopatia arritmogènica afecta 1 de cada 2500 o 5000 individus, principalment homes, joves i atletes, i té un patró d'herència autosòmica dominant (Sánchez-Molero, O., 2017).

2. GENÈTICA

2.1. L'ÀCID DESOXIRIBONUCLEIC

El DNA o àcid desoxiribonucleic és la molècula que conté la informació genètica en gairebé tots els éssers vius. Està format per dues cadenes de nucleòtids enrotllades entre si formant una doble hèlix. Cada nucleòtid està format per una desoxiribosa, un grup fosfat i una base nitrogenada, que pot ser una adenina (A), una timina (T), una guanina (G) o una citosina (C). L'A i la G són bases púriques, mentre que la T i la C són bases pirimidíniques. L'ordre en què estan situades aquestes bases al llarg de la cadena és el que codifica les instruccions per a la formació de proteïnes i molècules de RNA (Jimeno, A. et al., 2016).

Els polímers de nucleòtids presenten dos extrems, l'extrem 5' i l'extrem 3'. Els àcids nucleics sempre se sintetitzen des de l'extrem 5' cap a l'extrem 3', ja que no hi ha cap enzim que possibiliti afegir nucleòtids a l'extrem 5' mentre que sí que n'hi ha que permeten afegir-ne a l'extrem 3'.

En la doble hèlix, les dues cadenes de nucleòtids se situen amb les bases nitrogenades enfrontades i unides mitjançant enllaços pont d'hidrogen. L'adenina sempre s'uneix a la seva base complementària, la timina, mitjançant dos ponts d'hidrogen, mentre que entre la citosina i la seva base complementària, la guanina, s'estableixen tres ponts d'hidrogen.

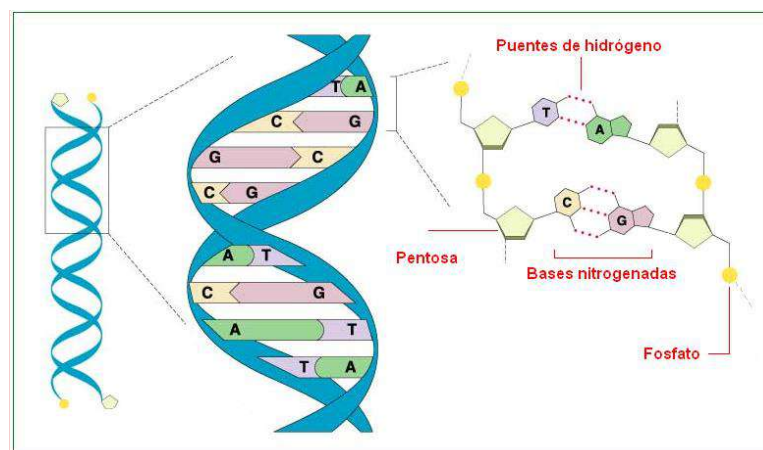


Figura 8: Estructura de la doble hèlix de DNA (Font: Ramos, M., 2016).

Segons el model de la doble hèlix elaborat per Watson i Crick el 1953, les dues cadenes del DNA són antiparal·leles i complementàries, estan enrotllades de forma plectonímica i constitueixen una estructura dextrogiro. La doble hèlix del DNA és molt estable en estat natural

gràcies als ponts d'hidrogen que es formen entre les bases complementàries i als enllaços de Van der Waals que s'estableixen entre els grups hidròfobs d'aquestes, però si s'escalfa a uns 100°C, es produeix la desnaturalització del DNA, és a dir, els ponts d'hidrogen es trenquen i els dos filaments de la doble hèlix se separen. Si posteriorment es manté el DNA desnaturalitzat a 65°C, els dos filaments tornen a unir-se, procés anomenat renaturalització (Jimeno, A. et al., 2016).

En les cèl·lules eucariotes, el DNA es troba principalment en el nucli, però també es pot trobar en els mitocondris i els cloroplasts. Com que el DNA en forma de filament no cabria al nucli, s'empaqueta sobre les histones formant fibres de cromatina i posteriorment cromosomes, que són el nivell màxim d'empaquetament.

2.2. L'ÀCID RIBONUCLEIC

L'RNA o àcid ribonucleic està constituït per nucleòtids de ribosa units en sentit 5' → 3', combinant les bases adenina, guanina, citosina i uracil. Així doncs, la base complementària de l'adenina és l'uracil, enlloc de la timina. A diferència del DNA, l'RNA és monocatenari, i en les cèl·lules eucariotes se'n troba entre 5 i 10 vegades més. La seva funció és sintetitzar les proteïnes seguint la informació continguda en el DNA (Jimeno, A. et al., 2016).

Hi ha molts tipus d'RNA, però els principals són l'RNA de transferència (*RNA_t*), que té la funció de transportar aminoàcids específics fins als ribosomes; l'RNA missatger (*RNA_m*), que copia la informació continguda en el DNA i la duu fins als ribosomes; i l'RNA ribosòmic (*RNA_r*), que constitueix els ribosomes, lloc on es porta a terme la síntesi de proteïnes.

2.3. TRANSCRIPCIÓ

La transcripció és la primera fase de l'expressió gènica, en la qual la informació continguda en els gens és utilitzada per a sintetitzar les proteïnes. El seu objectiu és copiar la seqüència de DNA d'un gen en forma d'*RNA_m* mitjançant la complementarietat de bases.

La transcripció d'un gen té quatre fases (Khan Academy, 2021):

1. **Iniciació:** l'RNA polimerasa⁸ s'uneix al DNA del gen que s'ha de transcriure en una regió anomenada *promotor* (diferent per a cada gen), que indica a l'RNA polimerasa on ha de començar la transcripció.
2. **Elongació:** és la fase en la qual es sintetitza la cadena d'RNA*m*. Per a cada nucleòtid en la cadena de DNA, l'RNA polimerasa afegeix un nucleòtid complementari d'RNA. D'aquesta manera, el resultat és una cadena d'RNA*m* quasi idèntica a la plantilla de DNA, tot i que substituint les bases timina per bases uracil i les desoxiriboses per riboses.
3. **Finalització:** la transcripció finalitza quan l'RNA polimerasa arriba a la seqüència TTATTT del DNA. Després, l'enzim poli-A-polimerasa afegeix a l'extrem final 3' l'anomenada *cua de poli-A*, formada per uns 200 ribonucleòtids d'adenina, i la cadena transcrita s'allibera de l'RNA polimerasa (Jimeno, A. et al., 2016).
4. **Maduració:** la cadena formada anteriorment s'anomena preRNA*m*, i conté segments amb informació, denominats exons, alternats amb altres segments sense informació, anomenats introns. Així doncs, es suprimeixen els introns i s'ajunten els exons formant la cadena d'RNA*m* final. Aquest procés s'anomena *maduració*, té lloc al nucli i la duu a terme la ribonucleoproteïna petita nuclear (RNPPn).

2.4. TRADUCCIÓ

La cadena d'RNA*m* es trasllada als ribosomes, on es duu a terme la traducció. Aquests llegeixen la seqüència de nucleòtids de l'RNA*m* per triplets de nucleòtids anomenats *codons*. Cada codó codifica per a un dels 20 aminoàcids que constitueixen proteïnes, i a mesura que el ribosoma llegeix la seqüència de codons va unint aminoàcids fins a formar una nova proteïna.

Amb les quatre bases nitrogenades (A, U, C i G) es poden formar un total de 64 combinacions de codons; 61 corresponen a aminoàcids i 3 indiquen la fi de la síntesi proteica. Al codi genètic hi ha determinats quins codons codifiquen per a cada aminoàcid (Figura 9).

⁸ RNA polimerasa: Principal enzim implicat en la transcripció. La seva funció és sintetitzar una cadena d'RNA mitjançant la complementarietat de bases.

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

Figura 9: Codi genètic en el qual s'indiquen tots els codons que es poden formar combinant els quatre nucleòtids i per a quin aminoàcid codifica cada un.

Els codons són llegits per l'*RNA_t*, que actua com un “adaptador” entre la informació que porta l'*RNA_m* i els aminoàcids que es van col·locant per a formar la proteïna. Cada *RNA_t* té una seqüència denominada *anticodó* que s'aparella amb el codó d'*RNA_m* complementari, de manera que es va constituint una cadena polipeptídica.

La seqüència de nucleòtids d'*RNA_m* comença a llegir-se a partir del codó AUG, que també codifica per l'aminoàcid metionina, i finalitza quan es troba un codó UAA, UAG o UGA, denominats *stop*.

3. MUTACIONS I POLIMORFISMES

Les mutacions són alteracions a l'atzar del material genètic. Tot i que normalment comporten un aspecte negatiu per a l'individu, són positives per a l'espècie, ja que aporten variabilitat a la població. D'aquesta manera, si es produeix un canvi en l'entorn i les noves condicions són perjudicials per a una espècie, l'existència d'individus mutants permet que alguns puguin adaptar-se a aquestes condicions i l'espècie no s'extingeixi (Jimeno, A. et al., 2016).

Les mutacions que tenen lloc a les cèl·lules somàtiques s'anomenen mutacions somàtiques i, a no ser que les converteixin en cèl·lules cancerígenes, tenen poca importància, ja que es poden substituir per altres cèl·lules o poden donar lloc a una colònia de cèl·lules mutants. En canvi, les mutacions que tenen lloc a les cèl·lules reproductores i que s'anomenen mutacions germinals tenen una gran importància, ja que poden passar a la descendència provocant així que totes les cèl·lules del nou organisme presentin la mutació.

3.1. MUTACIONS GÈNIQUES

Existeixen tres tipus de mutacions segons la llargada del DNA que resulta afectat: les genòmiques, les cromosòmiques i les gèniques. Les mutacions genòmiques són aquelles en què s'altera el nombre de cromosomes d'un individu, mentre que en les mutacions cromosòmiques es veu afectada la seqüència de gens d'un cromosoma. Aquest treball, però, es centrarà en les mutacions gèniques.

Les mutacions gèniques són alteracions en la seqüència de nucleòtids d'un gen, i es poden classificar en dos tipus:

- **Mutacions per substitució de bases:** es canvia una base per una altra. Es diferencien en dos grups: les transicions, quan es substitueix una base púrica per una altra, o una pirimidínica per una altra; i les transversions, quan es substitueix una base púrica per una pirimidínica o a la inversa. Les mutacions per substitució de bases, com que només provoquen l'alteració d'un triplet, no solen ser perjudicials, a no ser que canviïn l'aminoàcid que es codifica o que indiquin un triplet d'aturada.
- **Mutacions per pèrdua o inserció de nucleòtids (delecions o addicions):** com que el missatge genètic es llegeix de tres en tres, les delecions i les addicions provoquen un

corriment en l'ordre de lectura, i a no ser que es compensin entre si, alteren tots els triplets següents, de manera que comporten conseqüències greus.

3.2. POLIMORFISMES

Els polimorfismes són mutacions gèniques que apareixen com a mínim en un 1% de la població i que no són la causa directa de cap patologia (Torrades, S., 2002). El tipus més comú de polimorfisme implica la variació d'un sol parell de bases, però també pot implicar llargs trams de DNA. Aquests canvis, si es produeixen en regions codificants del DNA, s'anomenen polimorfismes gènics, i provoquen canvis en el fenotip. En canvi, si es produeixen en regions no codificants del DNA, s'anomenen polimorfismes genètics, i poden tenir una funció reguladora o únicament estructural. Així doncs, el polimorfisme podria definir-se com l'existència simultània de diversos al·lels per a un determinat locus, i és el causant de la variabilitat genètica en les espècies.

3.3. MUTACIONS PATOGENIQUES

Com s'ha explicat anteriorment, no totes les mutacions resulten perjudicials per als individus. Algunes mutacions, les anomenades benignes o neutrals, no tenen cap conseqüència greu en l'individu afectat. D'altra banda, les mutacions patogèniques són aquelles que causen una predisposició de l'individu a patir una malaltia, de manera que l'acabarà desenvolupant amb quasi total seguretat.

Hi ha diversos factors que condicionen la patogenicitat d'una mutació: com s'ha explicat en l'apartat 3.1, algunes mutacions només modifiquen un nucleòtid (substitució de bases), mentre que d'altres alteren tota la seqüència del DNA (delecions o addicions). Un altre factor a tenir en compte és on es localitza la variant genètica: les que es troben en una de les regions codificants del genoma s'anomenen variants codificants patogèniques, mentre que les que es troben en regions reguladores es denominen variants reguladores (Fundación Mencía, 2018).

Per saber si una mutació és patogènica o no s'utilitzen *softwares* com el *PROVEAN*, el *PolyPhen-2* i l'*MT*. Aquests prediuen l'efecte que pot tenir una substitució d'un aminoàcid o una inserció o deleció d'un nucleòtid en l'estructura i el funcionament de la proteïna. Així

doncs, en base a aquestes prediccions, aquests programes qualifiquen la mutació com a patogènica, benigna o incerta.

Les prediccions d'aquests *softwares*, però, no són suficients per a determinar la patogenicitat d'una mutació. De fet, hi ha tot un llistat de criteris a tenir en compte abans de decidir si una mutació és potencialment patogènica o no. Aquests són els *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology* (Richards, S. et al., 2015; Figura 10).

	Benign			Pathogenic		
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very strong
Population data	MAF is too high for disorder BA1/BS1 OR observation in controls inconsistent with disease penetrance BS2			Absent in population databases PM2	Prevalence in affecteds statistically increased over controls PS4	
Computational and predictive data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product BP4 Missense in gene where only truncating cause disease BP1 Silent variant with non predicted splice impact BP7 In-frame indels in repeat w/out known function BP3	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product PP3	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before PM5 Protein length changing variant PM4	Same amino acid change as an established pathogenic variant PS1	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease PVS1
Functional data	Well-established functional studies show no deleterious effect BS3		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common PP2	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation PM1	Well-established functional studies show a deleterious effect PS3	
Segregation data	Nonsegregation with disease BS4		Cosegregation with disease in multiple affected family members PP1	Increased segregation data →		
De novo data				De novo (without paternity & maternity confirmed) PM6	De novo (paternity and maternity confirmed) PS2	
Allelic data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant BP2 Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant BP2		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant PM3		
Other database		Reputable source w/out shared data = benign BP6	Reputable source = pathogenic PP5			
Other data		Found in case with an alternate cause BP5	Patient's phenotype or FH highly specific for gene PP4			

Figura 10: Criteris de l'ACMG per a classificar les mutacions com a patogèniques o benignes

(Font: Richards, S.).

4. SEQÜENCIACIÓ GENÒMICA

4.1. EL GENOMA HUMÀ

El genoma és el conjunt de gens d'un organisme, per la qual cosa el genoma humà podria definir-se com el conjunt de seqüències de DNA que caracteritzen a l'espècie humana. El genoma nuclear d'un individu està format per 23 parells de cromosomes, dels quals 22 són autosomes i 1 parell són els cromosomes sexuals (Sánchez-Molero, O., 2017).

La informació genètica està codificada en unitats bàsiques, físiques i funcionals de l'herència anomenades gens. Els gens estan localitzats en regions específiques dels cromosomes anomenades locus. Com que els organismes diploides tenim dos jocs de cromosomes (un provinent de la mare i l'altre del pare), la seqüència dels gens pot ser idèntica o pot variar lleugerament. A les diverses formes que pot presentar un gen en un locus determinat se'ls anomena al·lells. Així doncs, cada un dels al·lells prové d'un progenitor. Si un individu presenta dos al·lells iguals en un mateix locus se l'anomena homozigot, mentre que si presenta dos al·lells diferents és denominat heterozigot. En resum, les característiques dels individus venen determinades per les diverses formes que poden presentar les seqüències dels diferents al·lells.

4.2. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacció en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction* (PCR) és una tècnica que permet crear nombroses còpies d'un segment específic del DNA *in vitro*. Inicialment, es necessita un DNA-polimerasa termoresistent anomenat Taq polimerasa, que no s'altera encara que s'arribi a la temperatura necessària per a desnaturalitzar el DNA. També és necessari el DNA diana, així com els quatre tipus de desoxiribonucleòtids trifosfats i dos segments de DNA monocatenari complementaris dels dos extrems del DNA diana, els anomenats *primers* (Jimeno, A., et al., 2016; Khan Academy, 2021).

Primer de tot, es reuneixen tots els materials en un tub, i a continuació es segueixen una sèrie de passos que permeten que es sintetitzi el DNA:

1. **Desnaturalització:** la reacció s'escalfa a 96°C per a separar les dues cadenes del DNA inicial.

2. **Aparellament:** la reacció es refreda a uns 60°C perquè els *primers* es puguin associar a una de les dues cadenes del DNA.
3. **Extensió:** s'augmenta la temperatura fins a 72°C perquè el Taq polimerasa pugui sintetitzar la cadena complementària del conjunt fent-lo servir de motlle, de manera que es formi un DNA de doble hèlix.

Tot aquest procés s'anomena primer cicle, i es sol repetir entre 25 i 30 vegades (2-4 hores, depenent de la llargada de la seqüència de DNA que s'estigui copiant). Cada vegada que es repeteix, s'obtenen el doble de còpies, de manera que en el segon cicle s'obtenen quatre dobles hèlixs, en el tercer vuit i així successivament.

Actualment, la PCR es fa en un aparell anomenat termociclador (PCR Thermal Cyclers from Applied Biosystems), i els resultats es solen comprovar utilitzant la tècnica d'electroforesi, en la qual els fragments de DNA són transportats a través d'un gel gràcies a l'acció d'un camp elèctric, de manera que es separen segons la mida.

4.3. SEQÜENCIACIÓ DE DNA

La seqüenciació de DNA és el procés que s'utilitza per determinar l'ordre dels nucleòtids en un fragment de DNA. S'utilitza per varis motius, i un d'ells és detectar mutacions que puguin causar malalties. En aquest apartat s'explicaran dos mètodes de seqüenciació: el mètode Sanger i la seqüenciació de nova generació.

MÈTODE SANGER

També anomenat "Mètode de terminació de la cadena per dideoxinucleòtids", el mètode Sanger consisteix en realitzar nombroses còpies d'una regió del DNA d'un màxim de 800 parells de bases (Jimeno, A., et al., 2016). Per a realitzar-lo, es preparen quatre tubs amb còpies de la cadena de DNA que es vol seqüenciar, l'enzim DNA polimerasa, un *primer* i els quatre nucleòtids del DNA (dATP, dTTP, dCTP i dGTP). Seguidament, s'hi afegeixen també els quatre dideoxinucleòtids (ddNTPs) marcats cada un amb un pigment fluorescent diferent. Els ddNTPs s'utilitzen perquè en el carboni 3' presenten un radical -H en comptes d'un radical -OH, de manera que un cop s'uneix un ddNTP a una cadena ja no s'hi pot afegir cap altre nucleòtid i finalitza la síntesi.

En primer lloc, cal escalfar i desnaturalitzar el DNA, ja que només s'utilitzarà una de les dues cadenes. A continuació, el DNA es refreda perquè el *primer* pugui unir-s'hi, i es torna a escalfar perquè el DNA polimerasa pugui sintetitzar nou DNA a partir del *primer*. El DNA polimerasa afegirà nucleòtids a la cadena fins que aleatòriament toqui un ddNTP i la cadena finalitzi. Aquest procés es repeteix diverses vegades, de manera que amb quasi total seguretat s'haurà afegit un ddNTP a cada posició del DNA (Khan Academy, 2021).

Quan la reacció s'acaba, el producte es sotmet a una electroforesi. Els fragments curts són ràpids, mentre que els llargs es mouen més lentament. Com que els diferents ddNTP han estat marcats amb diferents pigments fluorescents, mitjançant un detector de fluorescència es van captant els diferents colors dels fragments a mesura que van passant (de petit a gran). La informació obtinguda es recull en un ordinador i es genera un cromatograma que mostra els pics de cada color, a partir del qual es pot reconstruir la seqüència del fragment de DNA (Figura 11).

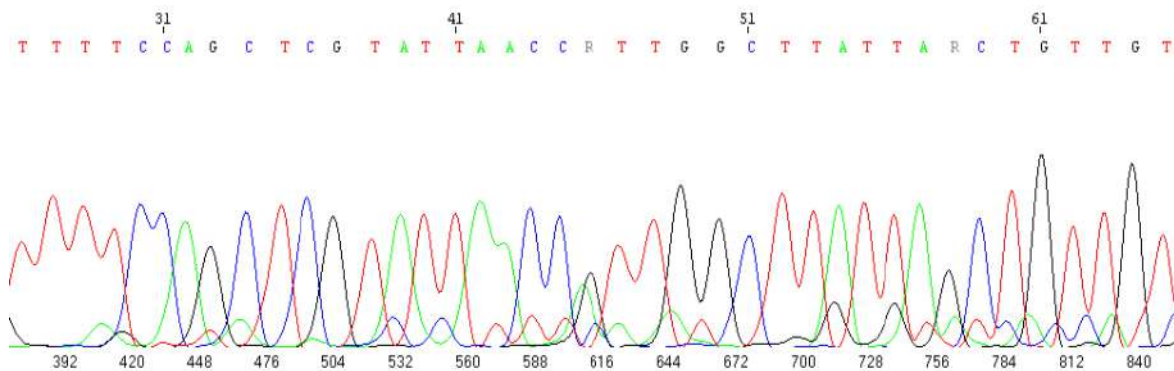


Figura 11: Cromatograma que s'obté un cop finalitzada la seqüenciació per Sanger (Font: Imatge pròpia realitzada a l'IDIBGI).

SEQÜENCIACIÓ DE NOVA GENERACIÓ

Les tècniques de seqüenciació de nova generació són noves maneres de seqüenciar el DNA a gran escala que n'augmenten la velocitat i en redueixen el cost. N'hi ha de molt diverses, però totes tenen un conjunt de característiques que les diferencien del mètode Sanger, com ara que es produeixen un gran nombre de reaccions més petites al mateix temps, de manera que els resultats estan llestos més ràpidament, i que es poden realitzar amb fragments més curts, d'entre 50 i 700 nucleòtids de longitud (Khan Academy, 2021). Un dels aparells de seqüenciació de nova generació és el *MiSeqTM System* (Illumina), en el qual es poden seqüenciar diversos gens de forma simultània i posteriorment analitzar les dades obtingudes. La tècnica utilitzada per a la seqüenciació amb el *MiSeq* es desenvolupa més endavant en el marc pràctic.

4.4. GENÈTICA DE LES CANALOPATIES I LES CARDIOMIOPATIES

En els darrers anys, els avenços en el camp de la genètica han tingut un gran impacte en l'estudi de la MSC, ja que han permès identificar els gens que causen les diverses malalties que acaben provocant la MSC. Entre aquestes, s'hi troben les canalopaties i cardiomiopaties, que s'han explicat en els apartats 1.7 i 1.8, respectivament. Les canalopaties estan associades a mutacions en els gens que codifiquen per als canals iònics encarregats de regular el flux d'ions a través de la membrana dels cardiomiòcits i de generar el PAC (tal com s'ha explicat al punt 1.4), mentre que les cardiomiopaties estan associades a mutacions en els gens que codifiquen per a les proteïnes implicades en l'estructura dels cardiomiòcits i en la generació i la transmissió de la força contràctil del cor. Així doncs, la Taula 1 recull els diferents gens relacionats amb aquestes arrítmies, les proteïnes per a les quals codifiquen i la malaltia a la qual ha estat associada un defecte en la funció d'aquests. Aquests són els gens que es seqüenciaran mitjançant el *MiSeq* al marc pràctic.

	CODIFIQUEN PER A	GENS
SQTL	CANAL DE POTASSI	<i>KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, KCNJ5</i>
	CANAL DE SODI	<i>SCN5A, SCN4B</i>
	CANAL DE CALCI	<i>CACNA1C, RYR2</i>
	PROTEÏNES QUE INTERACCIENEN AMB ELS CANALS IÒNICS	<i>ANK2, AKAP9, CAV3, SNTA1, CALM1, CALM2</i>
SQTC	CANAL DE POTASSI	<i>KCNH2, KCNQ1, KCNJ2</i>
	CANAL DE CALCI	<i>CACNA1C, CACNB2, CACNA2D1</i>

TVPC	RECEPTOR DE RIANODINA	<i>RYR2</i>
	ISOFORMA DE LA CALSECUESTRINA CARDÍACA	<i>CASQ2</i>
	ASSOCIATS A CORRENTS DE CALCI	<i>CALM1, TRDN, KCNJ2</i>
SBr	CANAL DE SODI	<i>SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN5A, SCN10A, GPD1L, MOG1, RANGRF, SLMAP, FGF12, PKP2</i>
	CANAL DE CALCI	<i>CACNA1C, CACNB2B, CACNA2D1, TRPM4</i>
	CANAL DE POTASSI	<i>KCND3, KCNE1, KCNE3, KCNE5, KCNJ8, HCN4, ABCC9</i>
	ALTRES GENS	<i>HAY2, SEMA3A, PXDNL, IRXT, DPPX</i>
MIOCARDIOPATIA HIPERTRÒFICA	PROTEÏNES SARCOMÈRIQUES CITOESQUELÈTIQUES	<i>CSRP3, TCAP, MOYZZ, VLC, TTN</i>
	PROTEÏNES SARCOMÈRIQUES CONTRÀCTILS	<i>ACTC1, ACTN2, MYH6, MYH7, MYBPC3, MYL2, MYL3, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, NEXN</i>
	PROTEÏNES NO SARCOMÈRIQUES	<i>CASQ2, JPH2, PLN, PRKAG2, GLA, LAMP2, FHL1, TTR, GAA, PTPN11, PDLIM3, FXN, CAV3, MYLK2, TAZ, CRYAB</i>
MIOCARDIOPATIA DILATADA	PROTEÏNES NUCLEARS	<i>LMNA, EMD</i>
	PROTEÏNES SARCOMÈRIQUES CITOESQUELÈTIQUES	<i>TTN, ACTN2, LDB3, DES, DMD, CSRP3, VCL</i>
	PROTEÏNES DESMOSÒMIQUES	<i>DSC2, DSG2, DSP</i>
	PROTEÏNES SARCOMÈRIQUES CONTRÀCTILS	<i>MYH6, MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNC1, TPM1, ACTC1, MYOZ1</i>
	ALTRES PROTEÏNES	<i>SCN5A, PLN, TAZ, ANKRD1, ABCC9, BAG3, LAMP2, EYA4, TMPO, PSEN1, PSEN2, SGCD, CAV3, CRYAB, RMB20</i>

MIOCARDIOPATIA ARRITMOGÈNICA	PROTEÏNES DESMOSÒMIQUES ARMADILLO	<i>PKP2, JUP</i>
	PROTEÏNES DESMOSÒMIQUES D'UNIÓ TRANSMEMBRANA, ANCLATGE I RELACIONADES	<i>DSG2, DSC2, DSP</i>
	ALTRES PROTEÏNES	<i>SCN5A, DES, RYR2, TGFβ3, TMEM43, PLN, LMNA, CTNNA3, TTN</i>

Taula 1: Classificació dels gens que han estat relacionats amb les canalopaties i les cardiomiopaties més comunes.

MARC PRÀCTIC

1. PLANTEJAMENT DE LA RECERCA

Tal com s'ha explicat en el marc teòric, un elevat percentatge de les morts sobtades cardíques són causades per un defecte genètic. Com que la MSC és, en molts casos, el primer símptoma de la malaltia, es planteja que possiblement una part dels casos poden haver estat causats per un problema cardíac genètic.

Per tal de poder assolir els objectius marcats per aquesta recerca, s'ha realitzat la part pràctica a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona del 28 de juny al 27 de juliol. La finalitat de la investigació que s'ha dut a terme és analitzar les dades proporcionades pel centre per a determinar si algun dels individus als quals se'ls havia diagnosticat una canalopatia presentava alguna mutació en un o més gens codificants per als canals iònics cardíacs.

2. METODOLOGIA

2.1. SEQÜÈNCIA DE PROCESSOS DUTS A TERME AL LABORATORI

Primer de tot, es reben al laboratori mostres de teixits o de sang extretes dels pacients que hagin patit la mort sobtada cardíaca. Seguidament, es realitza l'extracció del DNA, que serà el material del qual es partirà durant els passos posteriors. Un cop feta l'extracció, s'avalua la quantitat i la integritat d'aquest DNA per saber de quant material disposem i quina qualitat té.

A continuació, de cada mostra es prepara una llibreria de DNA, cadascuna de les quals conté 147 regions del genoma (147 gens associats a la mort sobtada cardíaca). A partir d'aquí les mostres ja es poden començar a seqüenciar a la plataforma *MiSeq*, la qual genera uns arxius informàtics on s'indiquen totes les mutacions trobades a cada una de les mostres. Aquestes dades s'analitzen amb l'ajuda de diversos *softwares* per a decidir amb quina probabilitat poden arribar a ser perjudicials per a l'individu a nivell fenotípic.

Posteriorment, es validen les mutacions que tenen més possibilitats de ser les causants d'una patologia mitjançant un altre mètode de seqüenciació, la seqüenciació Sanger. Com que ja se sap quins són els gens d'interès, només cal amplificar aquestes regions per PCR. A continuació, s'utilitza la tècnica Exosap per purificar l'amplificació obtinguda i la tècnica de reacció de seqüenciació per a poder seqüenciar el DNA de cadena senzilla. Tot això es fa amb uns aparells anomenats termocicladors. Els resultats de la seqüenciació s'analitzen comparant-los amb la seqüència consens. Segons si els resultats coincideixen, es valida o no la mutació anteriorment trobada amb el *MiSeq*.

Finalment es genera un informe que es farà arribar a un cardiòleg, el qual juntament amb un assessor genètic explicarà al pacient els resultats trobats al laboratori. La feina de l'assessor és explicar les conseqüències dels resultats als familiars.

Si aquests ho volen, a continuació es podrà estudiar la segregació familiar extraient el seu DNA i tornant a utilitzar el mètode Sanger seqüenciant el mateix gen al qual s'ha trobat la mutació probablement causal. Si el cas és interessant, també es podran realitzar estudis funcionals de les mutacions, en els quals primer s'estudiaran l'estructura i la funció de les proteïnes, més endavant la funció de les cèl·lules cardíques i finalment es realitzaran proves en éssers vius.

2.2. PROTOCOLS I PROCEDIMENTS PER DUR A TERME AQUESTS PROCESSOS

A continuació s'explicaran els diversos protocols i procediments que s'han dut a terme per a la realització de la part pràctica.

2.2.1. PROTOCOL EXTRACCIÓ DE DNA

En aquest apartat s'explicarà el procés que es realitza per a l'extracció de DNA en sang. Per a l'extracció de mostres de 3ml de sang s'utilitza el kit *Chemagic DNA blood3k drying VD0900422* (PerkinElmer). Les mostres de sang de partida es guarden a la cambra freda un màxim de 48 hores o es congelen a -20°C. Si sobra mostra després de l'extracció se'n congelarà 1,5 ml a -20°C durant mínim 1 any.

Per a l'extracció de DNA s'utilitza un robot anomenat *ChemagicTM MSM* (PerkinElmer). En aquest es col·loquen diversos *racks* a cada posició, de manera que la màquina va treballant seguint l'ordre de les posicions. A la posició 1 es col·loquen les *tips* (el nombre de *tips* depèn del nombre de mostres). A la posició 2 es col·loquen tubs de 50 ml que contenen entre 2,5 i 4 ml de mostra, 15 µl de *Protease* i 5 ml de *Lysis Buffer 1*. Cada tub ha d'estar identificat amb el nom que se li haurà assignat a cada mostra. A la posició 3 es col·loquen tubs de 50 ml que contenen 5 ml de *Wash Buffer 3*, i el mateix amb les posicions 4, 5 i 6 amb els *Wash Buffer 4*, 5 i 6, respectivament. Finalment, a la posició 7 es col·loquen tubs de 4 ml amb 300 µl d'*Elution Buffer 7*. S'introdueix el protocol *Chemagic DNA blood3k drying VD0900422* i s'inicia la lisi.

Quan aquesta finalitza, la màquina es para i cal afegir a la posició 2 un *rack* amb tubs en cadascun dels quals s'aboquen 360 µl de *Magnetic Beads*⁹ i 13 ml de *Binding Buffer 2*. Llavors es torna a engegar el robot perquè finalitzi del tot el programa. Un cop acabat, es col·loquen els tubs que han quedat a la posició 7 en un suport amb imants. Quan les *beads* ja s'han separat, i amb compte de no tocar-les, es traspassa el líquid en uns nous tubs ja etiquetats amb el codi de cada mostra.

Aquest procés també es pot realitzar amb mostres d'1 ml de sang o amb saliva, depenent del tipus i la quantitat de mostra que arribi al laboratori.

⁹ *Beads*: Boletes metàl·liques que s'aboquen a les mostres, de manera que quan la placa es col·loca prop d'uns imants es senten atretes cap a ells emportant-se les restes de DNA.

Després de l'extracció del DNA cal comprovar que la mostra extreta tingui la concentració i la qualitat suficient per a poder seqüenciar-lo. Per a fer-ho, s'utilitza l'espectrofotòmetre *Nanodrop* (ThermoFisher Scientific), on la concentració es mesura en nanograms/microlitre (ng/ μ l) i la puresa en dos rangs d'absorbància (260/280 nm i 260/230 nm, Taula 2).

Número de mostra	Concentració [ng/ μ l]	260/280 1,70-2,00	260/230 1,20-2,50
1	159,4	1,87	2,16
2	184,2	1,80	1,94
3	245,0	1,89	2,38
4	433,6	1,86	2,18
5	293,2	1,93	2,22
6	494,6	1,99	2,28
7	187,5	1,96	2,17
8	41,1	1,80	1,40
9	26,1	1,74	1,27
10	45,2	1,79	1,44
11	12,1	1,72	1,65
12	362,8	1,75	2,15

Taula 2: Concentracions i ràtios de puresa de diverses mostres que es van analitzar amb el *Nanodrop*.

2.2.2. PROTOCOL SEQÜENCIACIÓ *MISEQ*

Com s'ha explicat anteriorment en el marc teòric, en els darrers anys s'han desenvolupat mètodes de seqüenciació massiva, com ara la seqüenciació mitjançant el *MiSeq*. Abans de poder seqüenciar el DNA, però, és necessari dur a terme els següents passos:

1. Dilució de la mostra mare

Es mesura la concentració de la mostra mare amb el *Qubit BR* (Invitrogen)¹⁰ i posteriorment es dilueix amb aigua fins assolir una concentració d'entre 25 i 40 ng/ μ l en un volum de 115 μ l.

¹⁰ *Qubit BR* (Invitrogen): Fluoròmetre que s'utilitza per mesurar la concentració de DNA, RNA i proteïnes.

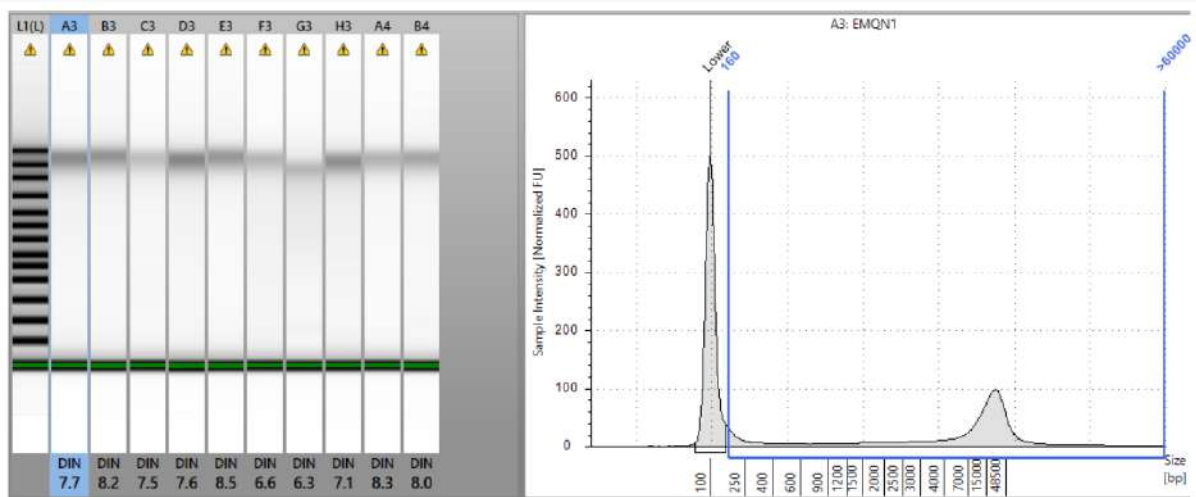
2. Fragmentació del DNA amb *Bioruptor*[®] *Pico* (Diagenode)

Es col·loquen un màxim de 12 mostres en el suport, que s'introdueix a l'aparell, on es realitzen 34 cicles. A cada cicle l'aparell treballarà 30 segons i a continuació reposarà 30 segons més.

3. *2100 Bioanalyzer* (Agilent) o *TapeStation 4200 System* (Agilent)

Un cop fragmentat el DNA, les mostres es passen pel *Bioanalyzer* o la *TapeStation*, que mostren uns electroferogrames amb pics d'entre 150 i 200 pb. Si alguna mostra no assoleix aquest grau de fragmentació, es posa al *Bioruptor* durant 4 o 5 cicles més fins que estigui suficientment fragmentada.

A.



B.

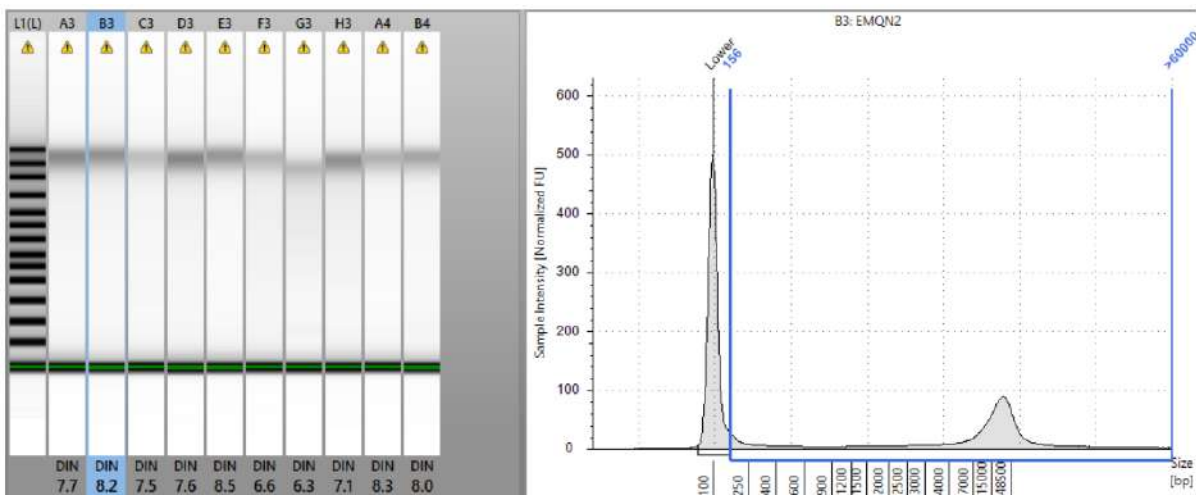


Figura 12: Exemples dels gràfics creats pel Bioanalyzer mostrant la longitud dels fragments del DNA (A: 168 pb; B: 156 pb)

(Font: IDIBGI).

4. Purificació de les mostres fragmentades

Per a purificar les mostres fragmentades s'aboquen 180µL de *beads* a cada pou (el nombre de pous depèn del nombre de mostres), on posteriorment s'hi afegeixen els 100 µl de DNA fragmentat (cada mostra al seu respectiu pou). Amb l'ajuda de la pipeta es barregen bé els dos components, i seguidament es deixa reposar la mescla durant 5 minuts a temperatura ambient. Un cop passat aquest temps, la placa es col·loca en el suport magnètic i s'espera fins que la solució quedi clara. Llavors es retira la solució no imantada amb una pipeta, vigilant de no retirar també les *beads*. S'afegeixen 200 µl d'etanol 70% també vigilant de no tocar les *beads*, i al cap d'un minut es retira. Es repeteix aquest procés una altra vegada, i posteriorment es deixa la placa al termobloc a 37°C per acabar de retirar l'etanol que hagi pogut quedar-hi. A continuació s'afegeixen 50 µl d'aigua *nuclease-free* a cada mostra, aquesta vegada intentant que totes les *beads* quedin en suspensió. Es segella la placa amb un film transparent, es posa a la centrifugadora i s'espera uns minuts a que les *beads* i el DNA se separin. A continuació, es torna a posar la placa al suport magnètic fins que la solució quedi completament clara (sense les *beads*, que quedaran a les parets atretes pels imants), moment en el qual aquesta es retira i es col·loca en una nova placa.

5. Reparació dels extrems

Durant tot aquest pas és important que tant les mostres com la placa en la qual es treballa estiguin en gel. Primer de tot cal preparar una *mix* amb els següents reactius: 35,2 µl d'aigua *nuclease-free*, 10 µl de *10x End Repair Buffer*, 1,6 µl de *dNTP Mix*, 1 µl de *T4 DNA polimerase*, 2 µl de *Klenow DNA polimerase* i 2,2 µl de *T4 PNK* (aquests són els volums necessaris per una sola mostra). A continuació s'aboquen 52 µl de la *mix* i 48 µl de DNA a cada pou (el nombre de pous dependrà del nombre de mostres). Es segella la placa amb un film d'alumini, es centrifuga durant uns quants segons i es posa al termociclador, on es selecciona el programa "Reparació d'extrems", que consisteix en una incubació de 30 minuts a 20°C. Quan finalitza el programa, cal repetir tot el pas de purificació però utilitzant 30 µl d'aigua *nuclease-free* enlloc de 50 µl.

6. Adenilació de l'extrem 3' dels fragments de DNA

Durant aquest pas també cal treballar en gel en tot moment. En aquest cas, cal preparar la següent *mix*: 11 µl d'aigua *nuclease-free*, 5 µl de *10x Klenow Polymerase Buffer*, 1 µl de *dATP*

i 3 µl d'*Exo(-) Klenow* (aquests són els volums necessaris per una sola mostra). A continuació s'aboquen 20 µl de la *mix* i 30 µl de DNA a cada pou (el nombre de pous dependrà del nombre de mostres). Es segella la placa amb un paper d'alumini, es centrifuga durant uns quants segons i es posa al termociclador, on es selecciona el programa "Adenilació", que consisteix en una incubació de 30 minuts a 37°C. Quan finalitza el programa, cal repetir una altra vegada el pas de purificació, però aquesta vegada utilitzant 90 µl de *beads* i 15 µl d'aigua *nuclease-free*.

7. Lligació dels adaptadors específics

Durant aquest pas també és important treballar en gel en tot moment. Primer de tot, es prepara una *mix* amb els següents reactius: 15,5 µl d'aigua *nuclease-free*, 10 µl de *5X T4 DNA Ligase Buffer*, 10 µl de *SureSelect Adaptor Oligo Mix* i 1,5 µl de *T4 DNA lligasa* (aquests són els volums necessaris per una sola mostra). A continuació s'aboquen 37 µl de la *mix* i 13 µl de DNA a cada pou (el nombre de pous dependrà del nombre de mostres). Es segella la placa amb un film d'alumini, es centrifuga durant uns quants segons i es posa al termociclador, on es selecciona el programa "Lligació adaptadors", que consisteix en una incubació de 15 minuts a 20°C. Quan finalitza el programa, cal repetir una altra vegada el pas de purificació, però aquesta vegada utilitzant 90 µl de *beads* i 30 µl d'aigua *nuclease-free*.

8. Amplificació de la llibreria amb els adaptadors

En aquest pas també cal treballar en gel. El primer que cal fer és preparar una *mix* amb els següents reactius: 21 µl d'aigua *nuclease-free*, 1,25 µl de *SureSelect primer*, 1,25 µl de *SureSelect Indexing Pre-Capture PCR Reverse Primer*, 10 µl de *5x Herculase II Rxn Buffer*, 0,5 µl de *100mM dNTP Mix* i 1 µl de *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (aquests són els volums necessaris per una sola mostra). A continuació s'aboquen 35 µl de la *mix* i 15 µl de DNA a cada pou (el nombre de pous dependrà del nombre de mostres). És important remarcar que, com que només utilitzen 15 µl de cada mostra, els 15 µl s'han de guardar per si es necessitessin més endavant. Es segella la placa amb un film d'alumini, es centrifuga durant uns quants segons i es posa al termociclador, on es selecciona el programa "Amplificació 1". Un cop acaba el programa, es repeteix el pas de purificació amb 90 µl de *beads* i 30 µl d'aigua *nuclease-free*.

9. Mesura de la concentració de DNA amb el *Qubit*

Abans de continuar amb el protocol, es mesuren les mostres amb el *Qubit BR* per comprovar que les concentracions de les mostres siguin superiors a 10 ng/μl. Si alguna d'elles fos inferior a aquesta quantitat, caldria tornar a fer el pas anterior amb els 15 μl que han sobrat després de la lligació dels adaptadors i unir-les en un sol tub.

10. Evaporació

Abans del següent pas, la hibridació de les mostres, cal evaporar totes les mostres. Es col·loquen destapades al concentrador durant 50 minuts a 45°C i posteriorment s'hidraten amb 3,4 μl d'aigua *nuclease-free*. Cal deixar-les tota la nit a la nevera abans de poder prosseguir amb el següent pas.

11. Hibridació de la llibreria

Per a la hibridació de la llibreria cal preparar una *mix* amb els següents reactius: 6,63 μl de *SureSelect Hyb#1*, 0,27 μl de *SureSelect Hyb#2*, 2,65 μl de *SureSelect Hyb#3* (-20°C) i 3,45 μl de *SureSelect Hyb#4* (aquests són els volums necessaris per una sola mostra). En un altre tub cal preparar la següent *mix*: 2,5 μl de *SureSelect Indexing Block #1*, 2,5 μl de *SureSelect Block #2* i 0,6 μl de *SureSelect Indexing Block #3* (aquests són els volums necessaris per una sola mostra). Un cop preparada la *mix*, cal posar-ne 5,6 μl a cada pou necessari, juntament amb 3,4 μl de la *mix* preparada anteriorment (és important que aquest procés es realitzi en gel). Un cop barrejades les dues *mixes*, es segella la placa amb un film d'alumini, es posa a la centrifugadora durant uns quants segons i seguidament es col·loca al termociclador, on es selecciona el programa "Hibridació Llibreria".

Mentre aquesta placa està al termociclador, es prepara la següent *mix*: 5,4 μl d'aigua *nuclease-free*, 0,6 μl de *RNase Block*, 13 μl de *Hybridation buffer mix* i 1 μl de Llibreria de Captura (aquests són els volums necessaris per una sola mostra). Quan el programa del termociclador finalitzi, cal afegir 20 μl d'aquesta *mix* a cada pou (sempre procurant que la placa es mantingui a 65°C) i segellar la placa ràpidament amb 2 films d'alumini per evitar que el contingut s'evapori. Cal deixar la placa 24 hores a 65°C al termociclador.

12. Preparació de les *beads* magnètiques amb estreptavidina

En un tub cal abocar 30 µl de *beads* magnètiques i 200 µl de *SureSelect Binding Buffer* per a cada mostra que es tingui. La mescla es passa pel vòrtex i a continuació es col·loca el tub en un imant per tal que les *beads* es sentin atretes cap a ell. Un cop la barreja quedi clara, s'elimina el sobrenedant i a continuació es retira el tub de l'imant. Sense retirar les *beads* del tub, es tornen a abocar 200 µl de *SureSelect Binding Buffer* i es repeteix el procés dues vegades més.

13. Selecció amb *SureSelect*

Primer de tot, es posen 600 µl de *SureSelect Wash Buffer 2* a cada pou d'una placa (el nombre de pous dependrà del nombre de mostres) i es deixa la placa al termociclador a 65°C. A continuació s'agafen les *beads* que s'han netejat en el pas anterior i se'n dipositen 200 µl a cada pou de la placa que hem preparat en la "Hibridació de la llibreria". Es tapa la placa amb un film transparent, s'agita durant 30 minuts a 1200 rpm i es centrifuga durant uns quants segons. Es col·loca la placa en un suport magnètic i s'espera fins que les *beads* es separin. S'elimina el sobrenedant i es retira la placa de l'imant. Encara amb les *beads* a la placa, s'aboquen 200 µl de *SureSelect Wash Buffer 1* a cada pou i es deixen incubar les mostres durant 15 minuts a temperatura ambient. Es col·loca la placa en el suport magnètic i s'espera fins que les *beads* es separin. S'elimina el sobrenedant i es retira la placa de l'imant. Es posen 200 µl del *SureSelect Wash Buffer 2* que s'havia deixat al termociclador a cada pou, es segella la placa amb un film transparent i es deixa incubar durant 10 minuts a 65°C al termociclador. Un cop passats els 10 minuts, es col·loca la placa en el suport magnètic i s'espera a que les *beads* es separin. S'elimina el sobrenedant i es retira la placa de l'imant. Es repeteix la neteja amb el *SureSelect Wash Buffer 1* dues vegades més. Finalment, s'aboquen 30 µl d'aigua *nuclease-free* a cada pou i es deixa la placa en gel fins que es necessiti.

14. Amplificació de la llibreria capturada per afegir els índexs

Es prepara una *mix* amb els següents reactius: 18,5 µl d'aigua *nuclease-free*, 10 µl de *5X Herculase II Reaction Buffer*, 0,5 µl de *100mM dNTP mix*, 1 µl de *Herculase II Fusion DNA Polymerase*, 1 µl de *SureSelect ILM Indexing Post Capture Forward PCR Primer* i 5 µl de *PCR Primer Index*. Es posen 36 µl de la *mix* a cada pou (el nombre de pous dependrà del nombre de mostres) i s'afegeixen també 14 µl de les mostres de DNA que s'havien separat en el pas anterior (juntament amb les *beads*). A continuació es posa la placa al termociclador i es

selecciona el programa “Amplificació 2”. Un cop acabat el programa es col·loca la placa a l’imant i es separa el sobrenedant. A continuació, es repetirà el procés que hem realitzat al pas 4 (“Purificació de les mostres fragmentades”) però utilitzant 90 µl de *beads* i substituint el DNA fragmentat pel sobrenedant que hem separat en el pas anterior. Seguidament es tornen a suspendre les *beads* purificades en aigua *nuclease-free*. El volum d’aigua *nuclease-free* dependrà de la concentració de cada mostra en el pas 9 (“Mesura de la concentració de DNA amb el *Qubit*”).

A continuació caldrà analitzar la mida dels fragments de DNA amb el *Bioanalyzer* o la *TapeStation*. Si tot ha sortit bé, el pic serà d’entre 300 i 400 pb. Finalment, només faltaria passar les mostres pel *MiSeq* i esperar els resultats.

El protocol que s’ha explicat en aquest apartat és el de 3 µg, que és el que s’utilitza en la majoria dels casos. En cas que no es tingués suficient mostra, però, es podria realitzar un protocol semblant en el qual només s’utilitzen 200 ng.

2.2.3. ANÀLISI DELS RESULTATS DEL *MISEQ*

Una vegada les mostres han estat seqüenciades al *MiSeq* s’envien al programa *GendiCall* (*GendiCall Software* from FerrerIncode), que permet identificar les variants genètiques basant-se en diferents bases de dades (com ara *1000 genomes*¹¹, *dbSNP*¹² i *Ensembl*¹³) i predictors de patogenicitat de la proteïna, com ara el *PROVEAN*, el *PolyPhen-2* i l’*MT* (Coll, M., 2017), explicats al marc teòric a l’apartat 4.3. Segons la importància i la quantitat de criteris que compleix una mutació es decideix si ha de ser validada per Sanger o no.

2.2.4. PROTOCOL DE SEQÜENCIACIÓ SANGER

1. PCR

Abans de començar la seqüenciació Sanger és important diluir les mostres de DNA a una concentració d’entre 10 i 20 ng/µl (tal com s’ha explicat anteriorment, la concentració i la puresa es mesuren amb el *Nanodrop*).

¹¹ *1000 genomes*: Ampli catàleg de variants genètiques humanes obtingut a partir de 2504 individus de 26 poblacions diferents.

¹² *dbSNP*: Base de dades de polimorfismes de nucleòtids simples i altres variants genètiques poc comunes.

¹³ *Ensembl*: Navegador on es poden cercar els genomes complets dels organismes vertebrats.

A continuació es prepara una PCR-MIX amb 6,25 µl d'aigua *nuclease-free*, 4,25 µl de *GoTaqG2 Hot Start Colorless Master Mix* (-20°C) i 1 µl de *Primer mix* (-20°C; conté els *primers forward* i *reverse*). Aquests són els volums necessaris per una mostra. Cal tenir en compte que sempre s'ha de preparar una mostra blanca com a control negatiu de la reacció. Es reparteix el volum de la mix necessari a cadascun dels pous d'una placa, i seguidament s'afegeix a cada pou el *primer* corresponent (cada exó de cada gen requereix un *primer* específic). A continuació s'afegirà 1 µl de la mostra de DNA corresponent a cada pou menys al blanc, on s'hi afegirà aigua *nuclease-free*. Després de segellar la placa amb un film d'alumini i posar-la a la centrifugadora per fer baixar tots els reactius, aquesta es col·loca al termociclador on s'escull el programa d'amplificació que correspongui.

2. Gel d'agarosa

La tècnica de l'electroforesi en gel s'utilitza, entre d'altres, per comprovar que la PCR ha amplificat correctament. No és imprescindible fer un gel d'agarosa cada vegada que es seqüencia pel mètode Sanger, però es pot fer si es vol estar segur que tot ha funcionat correctament.

Primer de tot, es col·loca el gel d'agarosa en una mena de cambra, la qual es connecta per un extrem a un elèctrode negatiu i per l'altre a un elèctrode positiu. L'extrem del gel on hi ha les petites ranures on s'hi dipositaran les mostres de DNA (tal i com es pot observar a la Figura 13) es col·loca cap a l'elèctrode negatiu. A continuació, es carreguen les mostres de DNA i s'aplica un corrent elèctric perquè s'arrossequin a través del gel. Com que els fragments de DNA tenen càrrega negativa, es desplacen en direcció a l'elèctrode positiu. D'aquesta manera, com que tots els fragments de DNA tenen la mateixa càrrega per massa, els fragments se separaran únicament per la seva mida, i els més petits es desplaçaran més ràpidament que els grans (Khan Academy, 2021).

Si el gel es tenyeix amb un pigment que s'adhereix al DNA i un cop finalitzat el procés es col·loca sota llum ultraviolada, els fragments de DNA brillaran i podrem observar-los. Quan en una mostra hi ha molts fragments de la mateixa mida es poden veure línies molt ben

definides, que llavors anomenarem bandes. D'aquesta forma, si comparem les bandes amb el control negatiu¹⁴ podrem saber la mida aproximada dels fragments de DNA.

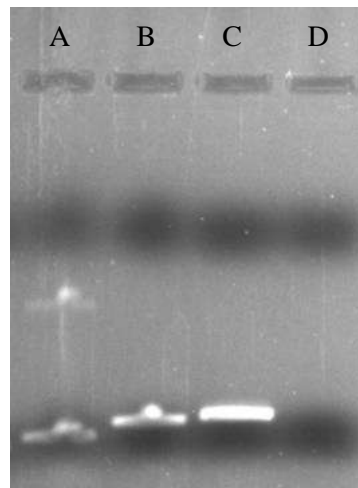


Figura 13: Gel d'agarosa que es va realitzar al laboratori per comprovar que la PCR havia funcionat correctament. A: Pacient 1 *RYR2* exó 100; B: Pacient 2 *KCNQ1* exó 13; C: Pacient 3 *SCN5A* exó 4. L'últim pou (D), en el qual no s'observa la ratlla blanca que indica la llargada dels fragments de DNA, és el control negatiu. En la fotografia es pot observar que la PCR ha amplificat correctament totes les mostres menys la A, en la qual es poden observar dues línies blanques en comptes d'una (Font: Imatge pròpia realitzada a l'IDIBGI).

3. Reacció de purificació de la PCR

Per a la reacció de purificació s'utilitza un reactiu anomenat *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (ThermoFisher Scientific). En una nova placa s'aboquen 1 µl d'aquest reactiu i 2,5 µl de producte de PCR a cada pou necessari. Aquesta placa es segella amb un film d'alumini, es posa a la centrífuga i seguidament al termociclador (2 minuts a 37°C, 3 minuts a 80°C i després es deixa refredar a 4°C).

4. Reacció de seqüenciació o *BigDye*

El primer pas per a la reacció de *BigDye* és fer la següent *mix*: 2 µl d'aigua *nuclease-free*, 1 µl de *BigDye sequencing buffer* (4°C) i 0,5 µl de *BigDye terminator v3.1* (-20°C) (aquests són els volums necessaris per una mostra). Un cop feta la *mix* se'n reparteixen 3,5 µl a cada pou necessari. A continuació s'afegeixen 0,5 µl de 3,2 pmol *primer** (-20°C, només conté el *primer forward*) i 1 µl de DNA motlle (4°C) a cada pou. Un cop s'han afegit tots els reactius es segella la placa amb un film d'alumini, es posa a la centrífuga i després es col·loca al termociclador on s'ha de seleccionar el programa "BigDye".

¹⁴ Control negatiu: S'utilitza per comprovar que cap solució ha estat contaminada. Així doncs, es posa la *mix* sense la mostra de DNA i si no surt cap banda és que les mostres no s'han contaminat.

5. Precipitació del DNA

Un cop finalitza el programa del termociclador s'afegeixen 80 µl de solució sodi-acetat-aigua (4°C) a cada pou, es tapa la placa amb un plàstic adhesiu transparent i es deixa a les fosques a temperatura ambient durant 12 minuts. Quan hagi passat aquest temps es posa la placa a la centrífuga durant 45 minuts a 12000 rpm. Es llença el volum de solució de precipitació i posem la placa invertida a la centrífuga (entre la màquina i la placa posem un tall de paper absorbent). S'engega uns segons la centrífuga i es llença el paper on hauran quedat les restes de la solució de precipitació. A continuació es deixa assecar la placa durant 10 minuts a temperatura ambient.

Quan hagin passat els 10 minuts s'aboquen 150 µl d'etanol 70% a cada pou, tornem a tancar la placa amb el plàstic adhesiu transparent i la posem a la centrífuga durant 10 minuts a 12000 rpm. Es llença el volum d'etanol i es torna a repetir el mateix procés d'abans. Quan la placa s'hagi assecat es posen 10 µl de formamida (-20°C) a cada pou i aquesta es cobreix amb un septe de silicona. Finalment es deixa uns minuts al termociclador a 95°C.

6. Seqüenciació del DNA

Es col·loca la placa al seqüenciador, que seqüencia les mostres dels pous per columnes. Així doncs, si algun pou està buit cal omplir-lo amb aigua destil·lada per tal que l'aparell pugui funcionar correctament. A partir d'aquí la màquina seqüencia el gen i envia la seqüència a l'ordinador, on podrem validar o no la mutació.

3. RESULTATS

A continuació s'explicaran els resultats obtinguts després d'analitzar a 3 pacients al laboratori. Primer s'explicarà el diagnòstic que es va fer als pacients abans d'enviar la seva mostra al laboratori, i a continuació s'explicaran els resultats després de la seqüenciació de nova generació i els resultats de la validació per Sanger de les mutacions trobades.

3.1. RESULTATS CLÍNICS

Totes les mostres que arriben al laboratori venen juntament amb el diagnòstic que va fer el metge als pacients, en el qual hi ha indicada l'arrítmia que creu que tenen i altra informació d'interès com ara els símptomes que té el pacient i que van conduir al metge a deduir la malaltia diagnosticada.

	SEXE	EDAT	SÍMPTOMES	ALTRES	DIAGNÒSTIC CLÍNIC
PACIENT 1	M	10	Síncopes (2)	-	TVPC
PACIENT 2	F	12	Cansament	-	SQTL
PACIENT 3	M	-	Asimptomàtic	DAI ¹⁵ , EEF ⁺ ¹⁶	SBr

Taula 3: Diagnòstic que es va realitzar als pacients abans d'enviar les mostres al laboratori.

3.2. RESULTATS DEL *MISEQ*

Un cop acabada la seqüenciació pel *MiSeq*, es generen uns fulls de càlcul amb totes les dades obtingudes, que posteriorment s'utilitzen per determinar si cal validar o no la patogenicitat de la mutació. Les figures 14, 15 i 16 són exemples dels pacients que vam seqüenciar, resumits amb la informació més important.

A la primera columna de cada taula s'hi troba indicat el gen que s'ha seqüenciat, mentre que a la tercera s'informa del número de cromosoma en el qual es troba aquest gen. A la cinquena columna es pot veure el nucleòtid de referència, el que correspondria a aquella posició si no hi

¹⁵ DAI (Desfibril·lador Automàtic Implantable): Aparell elèctric similar a un marcapassos que té la capacitat d'estimular les cavitats cardíques i de detectar i tractar diversos tipus de taquicàrdies.

¹⁶ EEF (Estudi Electrofisiològic): Prova que es realitza inserint un tub molt fi en un vas sanguini que arriba al cor per tal de registrar la seva activitat elèctrica, identificar l'origen d'una arrítmia o determinar el risc que té el pacient de patir una MSC.

hagués hagut cap mutació, mentre que a la sisena hi ha indicada l'alteració que hi ha hagut. A la setena columna es pot observar l'exó en el qual s'ha produït la mutació, informació necessària si finalment es decideix validar aquesta mutació per Sanger. A la quinzena columna hi ha l'aminoàcid de referència, el que té la majoria de la població, i a la setena hi ha l'alteració que ha tingut lloc. Finalment, les tres últimes columnes corresponen a tres predictors de patogenicitat (el *PolyPhen-2*, el *PROVEAN* i el *MT*), els quals cataloguen cada mutació com a patogènica, benigna o neutral.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GENE	ISOFORM	CHR	VAR POS	REF	ALT	N EXON	EXON ST	EXON END	EXON STRAND	GENOME VERSION
CASQ2	NM_001232	chr1	116243877	G	A	11	116243862	116244047	-	hg19
CASQ2	NM_001232	chr1	116268178	GAA	G	i.6-7	116268129	116268174	-	hg19
RYR2	NM_001035	chr1	237881770	C	T	73	237881762	237881821	+	hg19
RYR2	NM_001035	chr1	237972213	G	A	100	237972201	237972335	+	hg19
DSG2	NM_001943	chr18	29126255	C	T	15	29125684	29126706	+	hg19
HCN2	NM_001194	chr19	613498	A	G	i.6-7	613248	613488	+	hg19
TTN	NM_133378	chr2	179623758	C	T	44	179623711	179623899	-	hg19
DSP	NM_004415	chr6	7576527	G	A	19	7576527	7576689	+	hg19
DSP	NM_004415	chr6	7584617	C	T	24	7582875	7586111	+	hg19

12	13	14	15	16	17	18	19
GENE	GENOMIC CODE	GENE CODE	REF AA	ALT AA	POLYPHEN2	PROVEAN	MT
CASQ2	g.116243877G>A	c.1185C>T	Asp	Asp	.	Neutral	Polymorphism_A
CASQ2	g.116268178_116268179del	c.738-5_738-4del
RYR2	g.237881770C>T	c.10503C>T	Thr	Thr	.	Neutral	Polymorphism_A
RYR2	g.237972213G>A	c.14311G>A	Val	Ile	Probably_damaging	Neutral	Disease_causing_A
DSG2	g.29126255C>T	c.2906C>T	Ala	Val	Probably_damaging	Deleterious	Disease_causing
HCN2	g.613498A>G	c.1825+10A>G	Polymorphism
TTN	g.179623758C>T	c.10256G>A	Ser	Asn	Benign	Neutral	Polymorphism_A
DSP	g.7576527G>A	c.2631G>A	Arg	Arg	.	Neutral	Polymorphism_A
DSP	g.7584617C>T	c.7122C>T	Thr	Thr	.	Neutral	Polymorphism_A

Figura 14: Resultats de la seqüenciació pel *MiSeq* del Pacient 1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GENE	ISOFORM	CHR	VAR POS	REF	ALT	N EXON	EXON ST	EXON END	EXON STRAND	GENOME VERSION
KCNH2	NM_000238	chr7	150648198	A	G	8	150648009	150648208	-	hg19
KCNQ1	NM_000218	chr11	2797237	G	A	13	2797190	2797284	+	hg19
KCNQ1	NM_000218	chr11	2797214	C	T	13	2797190	2797284	+	hg19
DSC2	NM_024422	chr18	28660232	T	C	10	28660062	28660318	-	hg19
NEXN	NM_144573	chr1	78398978	T	C	10	78398967	78399164	+	hg19
ANK2	NM_001148	chr4	114279674	C	A	38	114274201	114280455	+	hg19
AKAP9	NM_005751	chr7	91652178	A	AAAC	14	91652128	91652323	+	hg19

12	13	14	15	16	17	18	19
GENE	GENOMIC CODE	GENE CODE	REF AA	ALT AA	POLYPHEN2	PROVEAN	MT
KCNH2	g.150648198A>G	c.1956T>C	Tyr	Tyr	.	Neutral	Polymorphism_A
KCNQ1	g.2797237G>A	c.1638G>A	Ser	Ser	.	Neutral	Polymorphism_A
KCNQ1	g.2797214C>T	c.1615C>T	Arg	Trp	Probably_damaging	Deleterious	Disease_causing_A
DSC2	g.28660232T>C	c.1350A>G	Arg	Arg	.	Neutral	Polymorphism
NEXN	g.78398978T>C	c.1065T>C	Asp	Asp	.	Neutral	Disease_causing
ANK2	g.114279674C>A	c.9900C>A	Ser	Arg	Probably_damaging	Neutral	Polymorphism
AKAP9	g.91652179_91652181dup	c.4004_4006dup	Lys	LysGln	.	.	.

Figura 15: Resultats de la seqüenciació pel *MiSeq* del Pacient 2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GENE	ISOFORM	CHR	VAR POS	REF	ALT	N EXON	EXON ST	EXON END	EXON STRAND	GENOME VERSION
SCN5A	NM_198056.2	chr3	38663892	C	T	4	38663891	38663980	-	hg19
KCNA5	NM_002234.3	chr12	5155046	G	A	1	5153314	5155155	+	hg19
CACNA1G	NM_018896.4	chr17	48646346	A	AGT	i.2-3	48646231	48646342	+	hg19
SCN5A	NM_198056.2	chr3	38622467	T	C	17	38622422	38622862	-	hg19
SCN5A	NM_198056.2	chr3	38645420	T	C	12	38645203	38645574	-	hg19
SCN5A	NM_198056.2	chr3	38647642	G	T	i.9-10	38647442	38647639	-	hg19
RYR2	NM_001035.2	chr1	237841390	A	G	61	237841348	237841412	+	hg19

12	13	14	15	16	17	18	19
GENE	GENOMIC CODE	GENE CODE	REF AA	ALT AA	POLYPHEN2	PROVEAN	MT
SCN5A	g.38663892C>T	c.481G>A	Glu	Lys	Probably_damaging	Deleterious	Disease_causing
KCNA5	g.5155046G>A	c.1733G>A	Arg	Lys	Benign	Neutral	Polymorphism
CACNA1G	g.48646375_48646376dup	c.354+33_354+34dup	-	-	-	-	-
SCN5A	g.38622467T>C	c.3183A>G	Glu	Glu	-	Neutral	Polymorphism_A
SCN5A	g.38645420T>C	c.1673A>G	His	Arg	Benign	Neutral	Polymorphism_A
SCN5A	g.38647642G>T	c.1141-3C>A	-	-	-	-	Polymorphism_A
RYR2	g.237841390A>G	c.8873A>G	Gln	Arg	Benign	Deleterious	Polymorphism_A

Figura 16: Resultats de la seqüenciació pel *MiSeq* del Pacient 3.

3.3. ANÀLISI DE LES DADES DEL *MISEQ*

Com s'ha explicat anteriorment a l'apartat 2.2.3, es segueixen una sèrie de criteris per a determinar si una mutació té prou possibilitats de ser patogènica i així decidir si ha de ser validada per Sanger o no.

Durant la meua estada a l'IDIBGI vam seqüenciar diversos gens de tres pacients diferents. Del primer pacient vam decidir validar la mutació a l'exó 100 del gen *RYR2*, ja que dos dels predictors de patogenicitat indicaven que podia ser patogènica. Del segon pacient vam validar la mutació a l'exó 13 del gen *KCNQ1* perquè tots tres predictors la consideraven patogènica. Finalment, del tercer pacient vam decidir validar la mutació a l'exó 4 del gen *SCN5A*, la qual tots els predictors marcaven com a patogènica.

3.4. VALIDACIÓ PER SANGER DE LES VARIANTES POTENCIALMENT PATOGENIQUES

En aquest apartat es mostraran i s'explicaran els resultats de la seqüenciació Sanger (el protocol per a realitzar aquesta tècnica s'ha explicat anteriorment a l'apartat 2.2.4).

Primer de tot, a la Figura 17 es pot observar el cromatograma que s'ha creat amb la seqüència de nucleòtids del Pacient 1. A la posició 46 es pot observar com en el mateix lloc hi ha dos pics de colors diferents, és a dir, el Pacient 1 és heterozigot en aquesta posició: en el seu genoma, en un al·lel de la *RYR2* hi consta una G (que és la seqüència consens) i en l'altre una A (per tant, aquest és l'al·lel mutat). Aquest canvi en l'exó 100 de la *RYR2* valida la mutació trobada

prèviament a través del *MiSeq*, que provocaria el canvi d'una Valina (Val) a una Isoleucina (Ile) modificant així la proteïna per la qual codificava. Com que la TVPC és una malaltia autosòmica dominant, n'hi ha prou amb què un dels dos cromosomes estigui mutat perquè es desenvolupi la canalopatia.

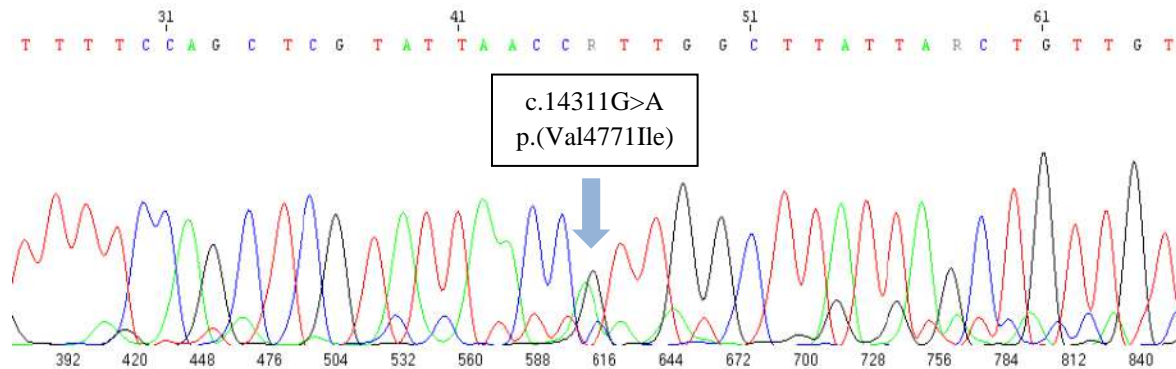


Figura 17: Resultats de la seqüenciació per Sanger del Pacient 1 (exó 10 *RYR2*) (Font: Imatge pròpia realitzada a l'IDIBGI).

En el cas del Pacient 2, després de seqüenciar l'exó 13 del gen *KCNQ1* es pot apreciar una mutació a la posició 97 (Figura 18). En aquest cromatograma es pot observar tant una C (el nucleòtid consens que hauria d'estar en homozigosi) com una T. Aquest doble pic valida els resultats del *MiSeq* i confirma el canvi parcial de les proteïnes del pacient, ja que es canvia una Arginina (Arg) per un Triptòfan (Trp). Com que la SQTLL també té un patró d'herència autosòmica dominant, aquesta mutació en heterozigosi és suficient per provocar que el Pacient 2 desenvolupi la malaltia.

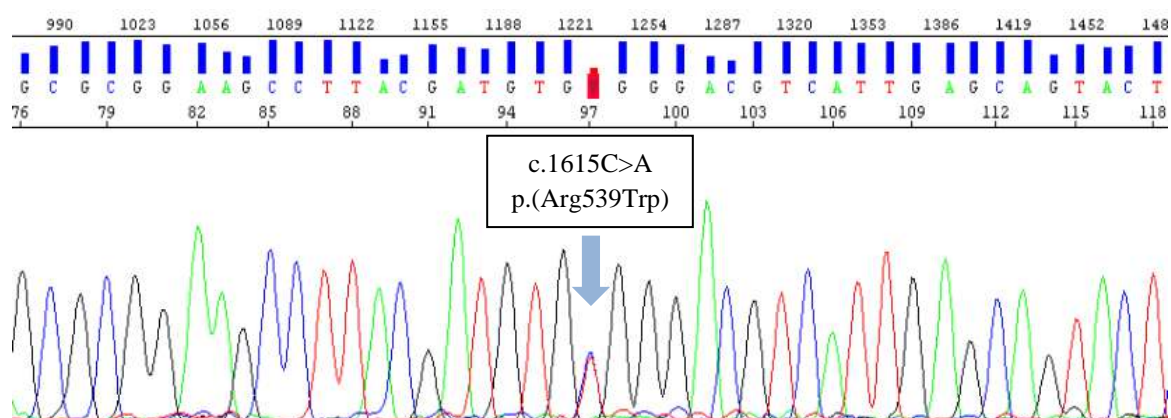


Figura 18: Resultats de la seqüenciació per Sanger del Pacient 2 (exó 13 *KCNQ1*) (Font: Imatge pròpia realitzada a l'IDIBGI).

Finalment, a la Figura 19 es pot observar el cromatograma del Pacient 3, que també presenta un doble pic seqüenciant tant una G (base consens present a la majoria de la població) com una

A (alterada) a la posició 481 de l'exó 4 del gen *SCN5A*. Així doncs, el Pacient 3 és heterozigot per a aquest caràcter, validant el resultat del *MiSeq* realitzat anteriorment i provocant un canvi d'aminoàcid (un Àcid glutàmic (Glu) per una Lisina (Lys)) en la proteïna p.(Glu161Lys). Aquesta mutació concorda amb la clínica, ja que el Pacient 3 presenta la SBr, i al ser una malaltia autosòmica dominant és suficient que un dels dos cromosomes estigui mutat perquè la persona presenti la malaltia.

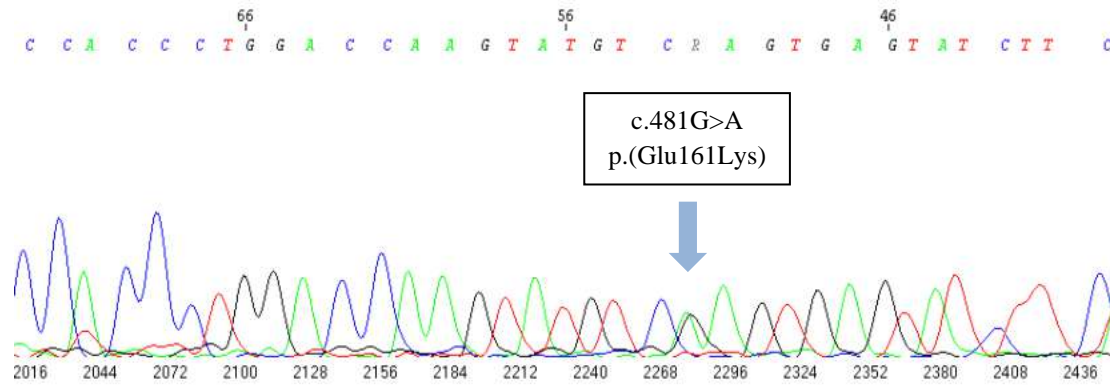


Figura 19: Resultats de la seqüenciació per Sanger del Pacient 3 (exó 4 *SCN5A*) (Font: Imatge pròpia realitzada a l'IDIBGI).

4. DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha investigat si tres pacients als quals se'ls havia diagnosticat prèviament una arrítmia tenien alguna mutació en els canals iònics cardíacs que pogués ser la causant d'aquest mal funcionament del cor i que complementés el diagnòstic clínic. Després de realitzar la investigació, es pot afirmar que és molt probable que les canalopaties que presenten aquests pacients siguin causades per una mutació en algun dels gens que codifiquen per als canals iònics cardíacs.

Primer de tot, es van seqüenciar 147 gens (associats a canalopaties i cardiomiopaties) d'aquests pacients de forma massiva per intentar identificar una possible mutació. En el cas del Pacient 1, es van trobar dues possibles mutacions patogèniques, una a l'exó 100 del gen *RYR2* i una altra a l'exó 15 del gen *DSG2*. Com que a aquest pacient se li havia diagnosticat clínicament una TVPC i el principal gen causant d'aquesta canalopatia és la *RYR2*, es va decidir validar la mutació a l'exó 100 i descartar (de moment) l'altra. Mitjançant la seqüenciació Sanger, es va poder comprovar que efectivament hi havia una mutació en aquest gen, fet que encaixa amb el que s'havia explicat prèviament al marc teòric, ja que el gen *RYR2* és el que codifica pel receptor de rianodina (un tipus de canal de Ca^{2+}) i un dels principals causants de la TVPC. Una mutació en aquest gen pot provocar una fuga descontrolada de Ca^{2+} durant la diàstole i, per tant, donar lloc a arrítmies com ara la TVPC (Rueda, A., 2014). Així mateix, seria interessant validar també la possible mutació al gen *DSG2* i fer estudis funcionals per descobrir com podrien interaccionar aquestes dues possibles mutacions i quina relació tindrien amb la clínica i el futur desenvolupament de la TVPC en aquest pacient.

El Pacient 2 presentava una possible mutació patogènica a l'exó 13 del gen *KCNQ1*, i per tant es va decidir validar-la per Sanger, confirmant així el que ja s'havia predit amb els resultats del *MiSeq*. El gen *KCNQ1* està relacionat amb la SQTl, ja que codifica per als canals de potassi cardíacs. D'aquesta manera, una mutació com la descrita a la proteïna pot causar una disminució de la sortida de corrent de K^+ durant la fase 3 del PAC i, en conseqüència, prolongar aquest procés (Medeiros-Domingo, A., et al., 2007).

El Pacient 3 presentava una mutació potencialment patogènica a l'exó 4 del gen *SCN5A*, i es va validar per Sanger de manera que es va poder confirmar la mutació. El gen *SCN5A* és, sense cap dubte, el principal causant de la Síndrome de Brugada, ja que una mutació en aquest i, per

tant, un canvi en la proteïna, pot provocar una reducció de l'entrada de corrent de Na^+ (Barajas-Martínez, H., 2013).

De totes maneres, encara que és molt probable que aquestes tres mutacions siguin les causants de les malalties diagnosticades, no és del tot segur, ja que podria ser que estiguessin causades per altres mutacions que no s'han detectat. Per acabar de confirmar-ne la patogenicitat, doncs, caldria analitzar els familiars que tinguin clínica associada a la malaltia seqüenciant els seus gens i validant les mutacions. En els casos més interessants, també es podrien arribar a realitzar estudis funcionals per tal d'estudiar l'efecte exacte de la mutació.

CONCLUSIONS

Un cop finalitzada la recerca es pot afirmar que s'han assolit tots els objectius que s'havien proposat a l'inici del treball. D'aquesta manera, s'han pogut extreure les següents conclusions:

Primer de tot, pel que fa als objectius teòrics, s'han adquirit tots els coneixements necessaris per a fer possible la comprensió del treball. S'han ampliat i consolidat els coneixements de genètica, aprofundint sobretot en aquells temes que podien resultar més útils per a la part pràctica, com ara la reacció en cadena de la polimerasa i la seqüenciació de DNA. S'ha pogut comprendre millor tant l'estructura com el funcionament del cor, fet que ha permès facilitar la comprensió d'altres conceptes que han anat apareixent posteriorment al llarg del treball. També s'ha adquirit un coneixement especialment extens de les malalties cardiovasculars, que ha resultat clau en la realització de la part pràctica. Tota aquesta recerca ha permès relacionar els conceptes de genètica i els de cardiologia, fet que ha possibilitat la comprensió de l'origen genètic de les canalopaties i les cardiomiopaties, així com els efectes funcionals que poden derivar d'una mutació en un dels gens que codifiquen per als canals iònics cardíacs.

En segon lloc, si bé és cert que s'han pogut conèixer i entendre les diferents maneres que hi ha de seqüenciar el genoma i els processos necessaris per a fer-ho, això ha estat principalment gràcies a la part pràctica d'aquest treball, que ha permès veure més clarament i en primera persona com es poden seqüenciar diversos gens mitjançant la seqüenciació Sanger i la seqüenciació de nova generació.

En tercer lloc, ja en relació als objectius pràctics, l'estada a l'IDIBGI ha permès posar en pràctica tot allò que s'havia après al marc teòric. No només s'ha observat com es seqüencia el genoma, sinó que s'ha pogut veure el procés complet al qual es sotmeten les mostres des que arriben al laboratori fins que s'obtenen els resultats finals. Així doncs, també s'ha pogut veure l'extracció del DNA i altres processos menys pràctics però igual d'interessants, com l'anàlisi dels resultats. Això ha permès apreciar que no tot consisteix en un protocol de laboratori, sinó que el procés pel qual passen les mostres dels pacients ha resultat ser molt més extens i complex del que s'esperava.

En darrer lloc, s'han pogut analitzar tres pacients als quals se'ls havia diagnosticat prèviament una canalopatia. Després de realitzar l'extracció del DNA, seqüenciar els 147 gens seleccionats

a través del *MiSeq* i validar les possibles mutacions patogèniques a través del mètode Sanger, s'ha comprovat que la teoria i la realitat efectivament concorden, ja que en tots els pacients analitzats s'han trobat mutacions que recolzen el diagnòstic inicial. Tot i això, cal remarcar que si bé els resultats suggereixen que aquestes són les mutacions responsables de les malalties, en el camp de la genètica es treballa amb probabilitats, per la qual cosa sempre hi ha la possibilitat que la causa de l'arrítmia sigui una altra mutació que no s'ha detectat. Per aquest motiu caldrien estudis de segregació familiar i fins i tot estudis funcionals per acabar d'assegurar els resultats. No obstant, es podria confirmar la hipòtesi que s'havia plantejat a l'inici del treball, segons la qual es confirma que una part de les arrítmies són causades per una mutació en un o més gens dels canals iònics cardíacs.

BIBLIOGRAFIA

Aragoncillo, P. (2009). Anatomía del corazón. *Libro del corazón* (35-40). [Consulta: març del 2021]. https://www.fbbva.es/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap2.pdf

Azcona, L. (2009). El electrocardiograma. *Libro del corazón* (49-56). [Consulta: abril del 2021]. https://www.fbbva.es/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap4.pdf

Barajas-Martínez, H., Hu, D., Antzelevitch, C. (2013). Bases genéticas y moleculares del síndrome de Brugada mediado por canales de sodio. *Elsevier*, 83 (4), 295-302. [Consulta: setembre del 2021]. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2013.10.001>

Brugada, J. (2013). La muerte súbita cardíaca. La necesidad de una estrategia integral para combatirla. *Revista española de cardiología*, 13 (A). [Consulta: setembre del 2021]. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(13\)70059-1](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(13)70059-1)

Chile Bio. (2018). *La estructura del ADN, los genes y el código genético*. [Consulta: abril del 2021]. <https://www.chilebio.cl/el-adn-los-genes-y-el-codigo-genetico/>

Coll, M., Striano, P., Ferrer-Costa, C., Campuzano, O., Matés, J., Del Olmo, B., Iglesias, A., Pérez-Serra, A., Mademont, I., Picó, F., Oliva, A., & Brugada, R. (2017). Targeted next-generation sequencing provides novel clues for associated epilepsy and cardiac conduction disorder/SUDEP. *PloS one*, 12 (12), e0189618. [Consulta: agost del 2021]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189618>

EDIC College. Cabrera, L. (2015). *Lectura, comprensión e interpretación del electrocardiograma*. [Consulta: abril del 2021]. <https://studylib.es/doc/5846308/lectura--comprensi%C3%B3n-e-interpretaci%C3%B3n-del-electrocardiograma>

Fundación Mencía. (2018). *¿Por qué algunas mutaciones causan enfermedades en unas personas y no en otras?* [Consulta: setembre del 2021]. <https://www.fundacionmencia.org/noticias/por-que-algunas-mutaciones-causan-enfermedades-en-unas-personas-y-no-en-otras/>

Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 17, 405–423. [Consulta: agost del 2021]. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Investigació Translacional en Arritmias Cardíacas hereditarias. (2017). *Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC)*. [Consulta: setembre del 2021]. <https://www.itaca.edu.es/taquicardia-ventricular-polimorfica.htm>

Jimeno, A. (2013). Aula 2005. [Consulta: juliol del 2021]. <http://www.aula2005.com/indexcat.htm>

Jimeno, A., Ugedo, L., Rodríguez, S. (2016). *Biología 1r batxillerat*. Editorial Santillana. [Consulta: abril del 2021].

Khan Academy. (2021). [Consulta: abril del 2021]. <https://es.khanacademy.org/science/high-school-biology>

Macías, A., Vázquez, A. (2013). Canalopatías. *Medicine online*, 11 (39), 2356-2361. [Consulta: setembre del 2021]. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70629-2](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70629-2)

Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P., Ackerman, M J. (2007). Clínica y genética en el síndrome de QT largo. *Revista española de cardiología*, 60 (7), 739-752. [Consulta: setembre del 2021]. <https://doi.org/10.1157/13108280>

My EKG, la Web del Electrocardiograma. (2021). *Ondas del Electrocardiograma*. [Consulta: abril del 2021]. <https://www.my-ekg.com/generalidades-ekg/ondas-electrocardiograma.html>

National Heart, Lung and Blood Institute. (2011). *Cardiomyopathy*. [Consulta: juliol del 2021]. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/cardiomyopathy>

National Heart, Lung and Blood Institute. (2011). *What is the heart?* [Consulta: març del 2021]. <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hhw#>

Ramos, M. (2016). *¿Por qué me parezco a mis padres? All you need is Biology*. [Consulta: juliol del 2021]. <https://allyouneedisbiology.wordpress.com/tag/estructura-adn/>

Richards, S., Aziz, N., Bale, S. *et al.* (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 17, 405–423. [Consulta: agost del 2021]. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Riuró, H. (2014). *El paper de les subunitats beta en la regulació del canal de sodi cardíac associat a la mort sobtada*. (Tesi doctoral, Universitat de Girona, Catalunya). [Consulta: abril del 2021]. <http://www.tdx.cat/handle/10803/285269>

Rodríguez, M. (2019). *Electrocardiograma*. Fundación Española del Corazón. [Consulta: abril del 2021]. <https://fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/metodos-diagnosticos/electrocardiograma.html>

Rueda, A., de Alba-Aguayo, David R., Valdivia, H. (2014). Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias. *Elsevier*, 84 (3), 191-201. [Consulta: setembre del 2021]. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2013.12.008>

Sánchez-Molero, O. (2017). *Muerte súbita natural inexplicada: valor de la investigación genética post mortem*. (Tesi doctoral, Universitat de Girona, Catalunya). [Consulta: abril del 2021]. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/666973>

Taylor, T. (2020). *Heart*. Innerbody research. [Consulta: març del 2021]. <https://www.innerbody.com/image/card01.html>

Texas Heart Institute. (2016). *Heart Information Center*. [Consulta: abril del 2021]. http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/SCA_sp.cfm

Torrades, S. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *Elsevier*, 21 (5), 122-125. [Consulta: abril del 2021]. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-diversidad-del-genoma-humano-polimorfismos-13031745>

Venkatesan, S. (2008). *What is the mechanism of pericardial rub?* Expressions in cardiology. [Consulta: juliol del 2021]. <https://drsvenkatesan.com/2008/09/28/what-is-the-mechanism-of-pericardial-rub/>