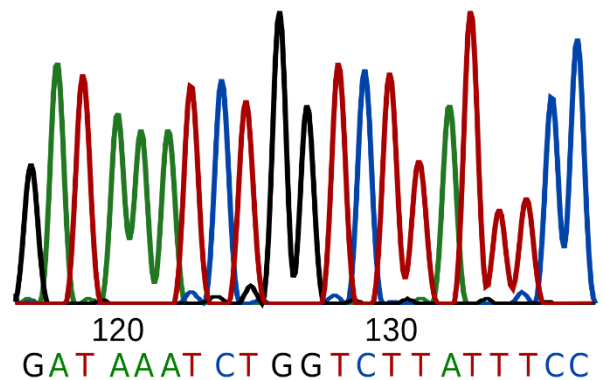
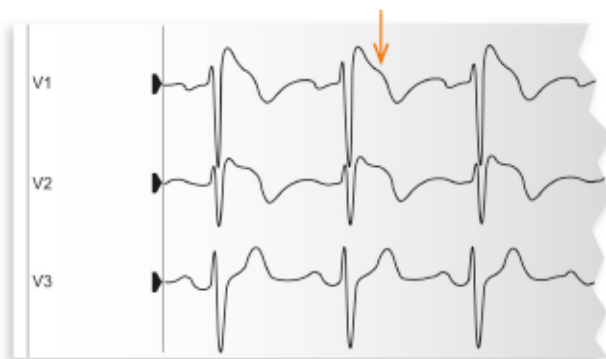


EL GEN SCN5A I LA MORT SOBTADA CARDÍACA

INVESTIGANT LA CAUSA DESCONEGUDA DE LA
SÍNDROME DE BRUGADA



Alba Bermejo Soler
2n batxillerat A

Institut Josep Bruguat, Banyoles
02/10/2017

Tutora: Helena Riuró

AGRAÏMENTS

En primer lloc, començo agraint a tots els professionals del grup de recerca GENCARDIO del laboratori IDIBGI de l'Hospital Josep Trueta per haver-me ensenyat a realitzar el procés de seqüenciació i per haver-me guiat quan anava perduda pels seus laboratoris. També per haver-me demostrat en primera persona com n'és d'important la recerca. Especialment, a la Mel·lina, en Ferran, la Mireia, l'Alexandra, la Laura, i un llarg etcètera. I amb molt de carinyo, a la Sara Pagans, la meva supervisora durant les pràctiques, per la seva implicació en el treball i tot el temps que m'ha dedicat. Moltes gràcies Sara!

D'altra banda, agrair el suport dels meus pares, per haver escoltat les meves llargues històries cada dia quan arribava del laboratori. També per haver fet l'esforç de llegir-se el treball i dir-me que estava correcte, tot i que jo sé que no entenien ni la meitat dels conceptes. I sobretot donar les gràcies a la meva germana Isabel, que tot i no confiar en el tema al principi del treball l'ha estat seguint de prop durant tot aquest temps, llegint-lo i donant-me els seus consells i idees fins l'últim moment, en què estic redactant aquestes paraules al seu costat.

Finalment, agrair en particular a l'Helena Riuró, tutora del meu treball de recerca. Gràcies per l'oportunitat que m'has donat, per haver-me insistit, motivat i per la paciència que has tingut en mi per tal d'ajudar-me. Al llarg de tots aquests mesos has estat recolzant-me i supervisant la meva feina, comentant-me sempre aspectes per millorar. Ha estat un plaer haver-te tingut com a tutora. Moltíssimes gràcies Helena, de tot cor!

PRÒLEG

Quan al gener l'Alba em va demanar consell sobre la temàtica del treball, vaig pensar que no se'n sortiria ja que es tracta d'un tema molt específic i que requereix d'uns elevats coneixements. Al final, però, m'he adonat que estava ben equivocada.

Actualment, la recerca biomèdica és un camp essencial per poder progressar en la millora de la salut. Es tracta d'una àrea molt extensa en la que s'està avançant ràpidament però és necessària una gran inversió de pressupost i coneixements per tal d'obtenir resultats.

Inicialment, després de buscar per Internet informació bàsica sobre el tema (ja que per l'Alba era un món totalment desconegut), em va fer especial il·lusió que acceptés venir amb mi a la “II Jornada per Famílies amb Síndromes Arrítmics relacionats amb la Mort Sobtada (SAMS)”, realitzada a l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona el 18 de Març de 2017. Allà va tenir l'honor de sentir a professionals com els doctors Brugada, entre d'altres, parlar sobre la Síndrome de Brugada i altres tipus d'arrítmies, així com sentir als familiars dels pacients parlar sobre la necessitat de fer recerca en aquests àmbits. Crec que aquelles hores allà van fer que s'adonés de la importància de la investigació i de les preguntes sense resposta que encara existeixen sobre la malaltia.

A més, la seva estada el juliol a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI) li va permetre endinsar-se en primera persona en aquest món. Això, va ajudar-la a veure l'aplicació real de totes aquelles llargues hores que s'havia passat buscant informació i llegint llibres, articles, tesis doctorals i treballs de final de grau sobre el tema. També, va tenir la sort d'aprendre com és el treball en el dia a dia d'un laboratori de recerca, fet que la pot ajudar a l'hora de decidir el seu futur acadèmic.

Ara que el treball ja està acabat, m'he adonat que el tema de la mort sobtada cardíaca i les variants genètiques implicades és molt ampli, però amb les seves ganes, esforç i dedicació considero que ha realitzat un molt bon treball de recerca, que li ha permès introduir-se en temes totalment desconeguts per ella.

Isabel Bermejo Soler

27 de setembre del 2017

ÍNDIX

ABREVIATURES.....	4
INTRODUCCIÓ.....	5
METODOLOGIA.....	5
MOTIVACIÓ.....	5
PLANTEJAMENT DE LA RECERCA	5
HIPÒTESI.....	6
OBJECTIUS	6
1. EL COR.....	7
1.1. EL COR.....	7
1.2. MORFOLOGIA I ESTRUCTURA	7
1.3. FUNCIONAMENT: El cicle cardíac	10
1.4. ACTIVITAT ELÈCTRICA CARDÍACA	11
1.5. POTENCIAL D'ACCIÓ CARDÍAC	12
1.6. L'ELECTROCARDIOGRAMA	14
2. LA MORT SOBTADA CARDÍACA	16
2.1. LA MORT SOBTADA CARDÍACA.....	16
2.2. ETIOLOGIA	16
3. LA SÍNDROME DE BRUGADA.....	18
3.1. LA SÍNDROME DE BRUGADA.....	18
3.2. DESCOBRIMENT	18
3.3. SÍMPTOMES	19
3.4. DIAGNÒSTIC.....	19
3.5. TRACTAMENT.....	20
3.6. CANALS IÒNICS I GENS IMPLICATS A LA MALALTIA	21
3.7. MECANISMES D'ELEVACIÓ DEL SEGMENT ST.....	22
4. CANAL DE SODI CARDÍAC.....	23
4.1. CANAL DE SODI CARDÍAC.....	23
4.2. SCN5A	23
5. GENÈTICA.....	25
5.1. L'ÀCID DESOXIRIBONUCLEIC (DNA).....	25
5.2. TRANSCRIPCIÓ	26
5.3. TRADUCCIÓ.....	26

6. VARIANTS EN ELEMENTS REGULADORS DEL GENOMA	27
6.1. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	27
6.2. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ	28
6.3. REGIONS DEL DNA REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓ	29
6.4. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN EL COR PER FT	29
6.5. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ GATA CARDÍACS.....	30
6.6. MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN SCN5A.....	30
7. PLANTEJAMENT DE LA RECERCA	32
8. TÈCNiques D'INVESTIGACIÓ	33
8.1. PCR	33
8.2. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA.....	35
8.3. EXOSAP	36
8.4. BIGDYE.....	37
8.5. PRECIPITACIÓ	38
8.6. SEQÜENCIACIÓ SANGER.....	39
9. PROGRAMES D'ANÀLISI I BASES DE DADES	40
9.1. PRIMER3.....	40
9.2. SEQUENCING ANALYSIS.....	40
9.3. SEQSCAPE	40
9.4. ENSEMBL GRCh37	41
9.5. dbSNP.....	41
9.6. "1000 GENOMES PROJECT"	41
10. PROCEDIMENT AL LABORATORI.....	42
10.1. DISSENY DELS PRIMERS	42
10.2. HIDRATAR ELS PRIMERS	42
10.3. PREPARACIÓ DELS PRIMERS	43
10.4. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES DELS PACIENTS.....	43
10.5. SEQÜENCIACIÓ	45
11. RESULTATS	49
11.1. VARIACIONS DESCARTADES	49
11.2. CAP MUTACIÓ IDENTIFICADA A LES REGIONS D'INTERÈS DELS 10 PACIENTS	50
11.3. CERCA DE VARIANTS A LES REGIONS ESTUDIADAES A LES BASES DE DADES PÚBLIQUES	52
12. DISCUSSIÓ	53

CONCLUSIONS	56
BIBLIOGRAFIA	58
ANNEXOS.....	61

ABREVIATURES

A	Adenina
C	Citosina
Ca ²⁺	Ió calci
DAI	Desfibril·lador automàtic implantat
DNA	Àcid desoxiribonucleic
ddNTPs	Dideoxinucleòtids
dNTPs	Desoxiribonucleòtids trifosfat
ECG	Electrocardiograma
FT	Factors de transcripció
G	Guanina
GATA-BS	GATA <i>binding sites</i>
K ⁺	Ió potassi
MSC	Mort sobtada cardíaca
Na ⁺	Ió sodi
Nav1.5	Canal de sodi cardíac
PA	Potencial d'acció
Pb	Parells de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa → Polymerase chain reaction
RNA	Àcid ribonucleic
RNA _m	RNA missatger
RNA _t	RNA de transferència
RNA _r	RNA ribosòmic
RNA _{pol} II	RNA polimerasa II
SBr	Síndrome de Brugada
T	Timina
U	Uracil

INTRODUCCIÓ

El treball constarà de dues parts: una part teòrica, on s'explicaran els conceptes necessaris per entendre la recerca que es farà posteriorment i també per aprofundir en el tema, i una altra part pràctica, on s'explicarà la recerca que es farà al laboratori i els seus resultats.

METODOLOGIA

El contingut del marc teòric s'ha escrit basant-se en articles d'investigació, treballs i tesis doctorals de diferents investigadors i pàgines web. Pel que fa al marc pràctic, s'ha dut a terme a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona durant el mesos de juny i juliol d'enguany. La informació obtinguda en ambdós processos s'ha utilitzat per fer el treball. La metodologia emprada per dur a terme els experiments i l'anàlisi dels resultats s'explica a l'inici del marc pràctic.

MOTIVACIÓ

La visita que vaig realitzar a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI) i als laboratoris de l'Hospital Santa Caterina, juntament amb els meus companys de l'optativa de biologia, em va despertar curiositat per conèixer el funcionament d'un laboratori de recerca. Al principi no estava gaire convençuda de posar en marxa aquest treball ja que estava davant d'un tema força desconegut per mi. Però, d'altra banda, em va motivar a tirar-lo endavant el fet de saber que em permetria adquirir nous coneixements en el món de la investigació i també provar noves experiències. I, gràcies als consells de la meva tutora, vaig deixar de veure aquest tema complicat a, finalment, decidir dur-lo a terme amb entusiasme, interès i ganes d'obtenir-ne resultats.

PLANTEJAMENT DE LA RECERCA

Entre un 4% i un 12% de les morts sobtades cardíques que es produeixen són causades per la Síndrome de Brugada. Fins a l'actualitat, s'ha descobert que un 30% dels pacients amb la malaltia presenten alguna mutació en regions codificants del gen SCN5A, el gen que codifica per la subunitat α del canal de sodi cardíac, una proteïna molt important perquè es pugui donar el potencial d'acció cardíac i generar el batec del cor. D'altra

banda, un 70% dels pacients no tenen diagnòstic genètic, és a dir, encara no se'n coneix la causa. A partir d'això es pot pensar que la causa es troba en mutacions en altres gens implicats en l'activitat elèctrica del cor o en una alteració de l'expressió gènica del mateix gen *SCN5A*, o un altre gen, afectant la transcripció o traducció de la proteïna en qüestió.

HIPÒTESI

A partir del plantejament anterior, la pregunta de recerca és: “Per què un percentatge elevat dels pacients amb Síndrome de Brugada no se'ls hi troba la mutació genètica causant de la malaltia?”.

La hipòtesi principal que s'ha plantejat és que el causant de la Síndrome de Brugada en aquells pacients que encara no se'ls ha identificat una mutació pot ser una variant en algun gen no descrit fins el moment o en una regió d'un gen vinculat amb el cor que encara no s'hagi estudiat detalladament, com per exemple les regions reguladores.

OBJECTIUS

En aquest treball, l'objectiu principal és respondre la pregunta de recerca plantejada anteriorment, entre altres objectius com:

TEÒRICS

- Conèixer el funcionament del cor i entendre el resultat de proves com l'electrocardiograma.
- Entendre què és la Síndrome de Brugada, el diagnòstic, el pronòstic i el tractament, a més a més de les causes i els gens relacionats.
- Estudiar la genètica, l'estructura i la funció del gen *SCN5A*, el causant majoritari de la Síndrome de Brugada, que codifica pel canal de sodi cardíac.

PRÀCTICS

- Fer una recerca de les proteïnes o els factors de transcripció relacionats amb el funcionament del cor i del canal de sodi cardíac, i que una mutació en el seu gen pugui estar causant la malaltia.
- Fer un estudi genètic en pacients sense la mutació causal per trobar una possible variant en un gen escollit en l'objectiu anterior.

MARC TEÒRIC

1. EL COR

1.1. EL COR

El cor és un òrgan de forma cònica, la mida del qual és similar a un puny, que es troba situat a la part central de la cavitat toràcica desplaçat lleugerament cap a l'esquerra, entre els pulmons. El cor és el centre del sistema circulatori i, gràcies al seu moviment de contracció i dilatació, fa circular la sang als pulmons i als vasos sanguinis del cos (National Heart, Lung and Blood Institute, 2011).

1.2. MORFOLOGIA I ESTRUCTURA

L'estructura histològica del cor comprèn, des de l'exterior cap a l'interior, les tres capes següents (Taylor, T., 2012) (Figura 1):

- Miocardi: Format per una capa de fibres musculars cardíques que s'uneixen amb teixit conjuntiu. Aquest teixit muscular constitueix la major part del gruix de la paret del cor i té una gran activitat perquè és el responsable del moviment per bombar la sang. Per aquest motiu, el miocardi té un sistema propi d'irrigació: les artèries coronàries. El seu gruix varia segons el treball que efectua la cambra que recobreix.
- Pericardi o epicardi: Format per una doble capa serosa¹ que està unida al miocardi i als òrgans adjacents. L'espai que queda entre les dues capes constitueix la cavitat pericàrdica. El pericardi produeix un líquid que ajuda a lubricar i protegir l'exterior del cor, evitant la fricció amb els òrgans del voltant cada vegada que batega. A més, també serveix per mantenir el cor en la seva posició i un espai buit al seu voltant perquè pugui expandir-se quan s'omple.

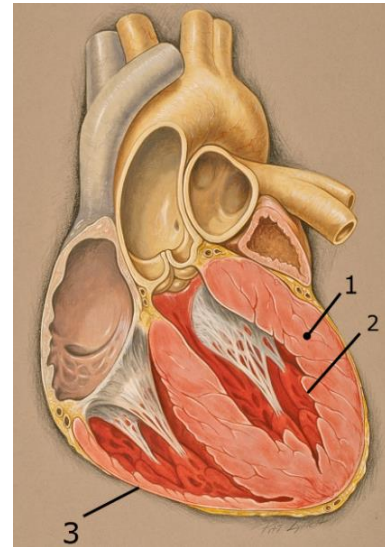


Figura 1: Representació del cor amb les tres capes: 1. Miocardi, 2. Endocardi, 3. Pericardi (Font: Wikipedia)

¹ Capa serosa: Membrana composta per dues capes, una de teixit epitelial i l'altra de teixit conjuntiu.

- Endocardi: Format per una capa d'endoteli². Recobreix la superfície interna del cor i s'encarrega d'evitar que la sang s'hi enganxi i es formin coàguls que podrien ser mortals per l'individu. El seu gruix és variable, presenta un major diàmetre en les aurícules i és més prim en els ventricles, especialment l'esquerre.

El tipus cel·lular que predomina majoritàriament al cor són els cardiomiòcids, els quals es troben bàsicament al miocardi, i també s'hi troben fibroblasts i cèl·lules endotelials (Marban, E., 2002). A més a més, el múscul cardíac posseeix un teixit conjuntiu que forma l'esquelet fibrós del cor, constituït per les vàlvules cardíques i anells fibrosos, entre altres elements.

A la part externa, el cor presenta un solc transversal i un solc longitudinal per on passen les artèries i les venes coronàries que el reguen, així com els nervis que intervenen en la regulació nerviosa. Així doncs, el cor disposa d'una xarxa sanguínia pròpia, anomenada sistema coronari, responsable de cobrir les necessitats de totes les seves cèl·lules (National Heart, Lung and Blood Institute, 2011).

A la part interna, el cor presenta 4 cavitats: dues aurícules (per on entra la sang) i dos ventricles (per on surt la sang). Els ventricles solen tenir les parets més gruixudes que les aurícules perquè aguanten una pressió major. D'entre els dos, les parets del ventricle esquerre són més gruixudes que les parets del ventricle dret perquè la sang que en sortirà, rica en oxigen, circularà pels vasos sanguinis de tot el cos (Taylor, T., 2012). Per tant, la part dreta del cor conté sang pobre en oxigen, procedent de tot el cos; en canvi la part esquerra del cor conté sang rica en oxigen, procedent dels pulmons.

Les dues parts del cor, dreta i esquerra, es troben separades per un envà, format de teixit membranós en la part superior i de teixit muscular a la part inferior. D'aquesta manera, la sang amb diferents concentracions d'oxigen de cada banda no està mai en contacte.

Les aurícules i els ventricles, en canvi, estan separats per vàlvules que obliguen a la sang a circular en una sola direcció, impedit-ne el retrocés. L'aurícula esquerra es comunica amb el ventricle esquerre a través de la vàlvula mitral o bicúspide, i la aurícula dreta es comunica amb el ventricle dret per mitjà de la vàlvula tricúspide. Aquestes vàlvules estan formades per membranes (dues en la bicúspide i tres en la tricúspide) inserides en les parets del cor (Taylor, T., 2012) (Figura 2).

² Capa d'endoteli: Epteli intern d'una capa que recobreix l'interior dels vasos sanguinis, incloent el cor.

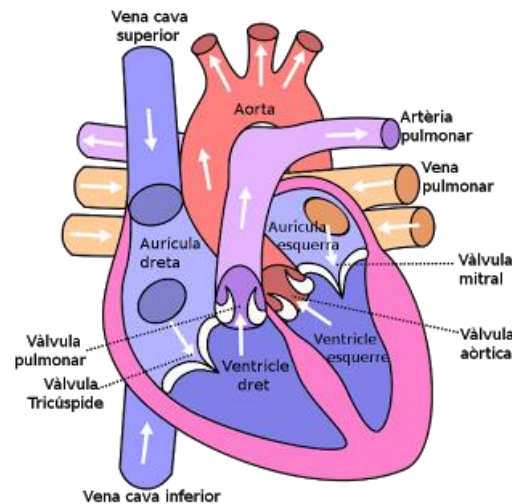


Figura 2: Representació gràfica de les cavitats i vàlvules del cor (Font: Wikipedia)

El recorregut de la sang s'efectua en un únic sentit i sempre és el mateix: de l'aurícula al ventricle i d'aquest cap a l'exterior del cor. A l'aurícula dreta arriben les dues venes caves, la superior i la inferior, amb sang desoxigenada. Aquesta es bombeja cap al ventricle dret i posteriorment als pulmons a través de les artèries pulmonars on recuperarà els nivells d'oxigen, realitzant l'anomenat circuit menor o pulmonar. En canvi, a l'aurícula esquerra hi arriben les 4 venes pulmonars, amb la sang oxigenada, que a través de la vàlvula mitral comunica amb el ventricle esquerre d'on surt l'artèria aorta que és l'encarregada de transportar la sang a la resta de l'organisme, creant el circuit major o general. La sang acabarà tornant al cor a través de les venes caves tancant així el circuit major (Figura 3) (National Heart, Lung and Blood Insititute, 2011).

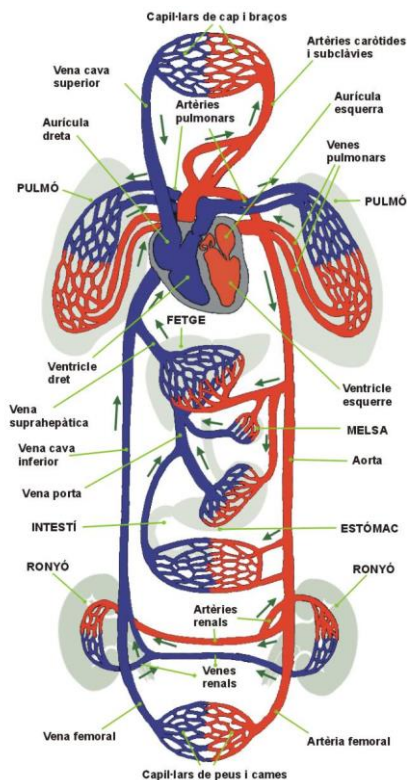


Figura 3: Representació del recorregut de la sang bombada pel cor per tot el cos (Font: Aula 2005)

L'arribada de la sang al cor per les venes s'efectua contínuament sense cap impediment, ja que aquestes venes s'obren lliurement a la paret cardíaca. En canvi, la sortida de la sang dels ventricles a les artèries és regulada per les vàlvules sigmoïdes, que s'obren únicament quan la sang ventricular arriba a tenir una certa pressió com a conseqüència de la contracció de la paret del ventricle.

1.3. FUNCIONAMENT: El cicle cardíac

El cor actua com una bomba de la sang que treballa interrompudament i a gran velocitat. Realitza dos tipus de moviments anomenats sístole, o moviment de contracció, i diàstole, o moviment de relaxació. Particularment, durant la sístole auricular els ventricles es troben en diàstole i a la inversa, durant la sístole ventricular són les aurícules les que es troben en diàstole. La successió de la contracció i la dilatació constitueix els batecs.

El batec del cor o cicle cardíac es produeix en 0,8 segons i segueix el procés següent (Taylor, T., 2012) (Figura 4):

- **1r - Sístole auricular:** En contreure's els músculs de les aurícules, les vàlvules mitral i tricúspide s'obren i la sang passa als ventricles a través dels orificis auriculo-ventriculars. La sang no retrocedeix cap a les venes gràcies a que els orificis s'estrenyen quan es contreuen les aurícules, i els ventricles provoquen una aspiració. Aquesta fase dura 0,15 segons.
- **2n - Sístole ventricular:** Els ventricles es contreuen provocant un augment de la pressió sanguínia. Quan intenta retrocedir, la mateixa empenta de la sang tanca les vàlvules auriculo-ventriculars, per la qual cosa la sang surt per l'artèria aorta (en el ventricle esquerre) cap a la resta del cos, i per l'artèria pulmonar (en el ventricle dret) cap als pulmons. El buidament del cor es veu facilitat en obrir-se les vàlvules sigmoïdes, també anomenades semilunars, de les artèries. Aquesta fase dura 0,3 segons.
- **3r - Diàstole general:** Després de buidar-se, els ventricles es distenen. És el moment en el qual tot el cor es troba relaxat fins que la sang, que llavors va omplint les aurícules, efectua una pressió adient sobre les vàlvules auriculo-ventriculars. Aquesta fase dura 0,35 segons.

Durant una sístole ventricular normal el cor expulsa pels dos ventricles entre 125 i 140 cm³ de sang. El ritme de contracció del cor d'una persona normal en repòs és d'uns 70 batecs per minut (Taylor, T., 2012). Aquest ritme, però, varia amb l'edat, l'exercici físic i la salut, entre altres factors.

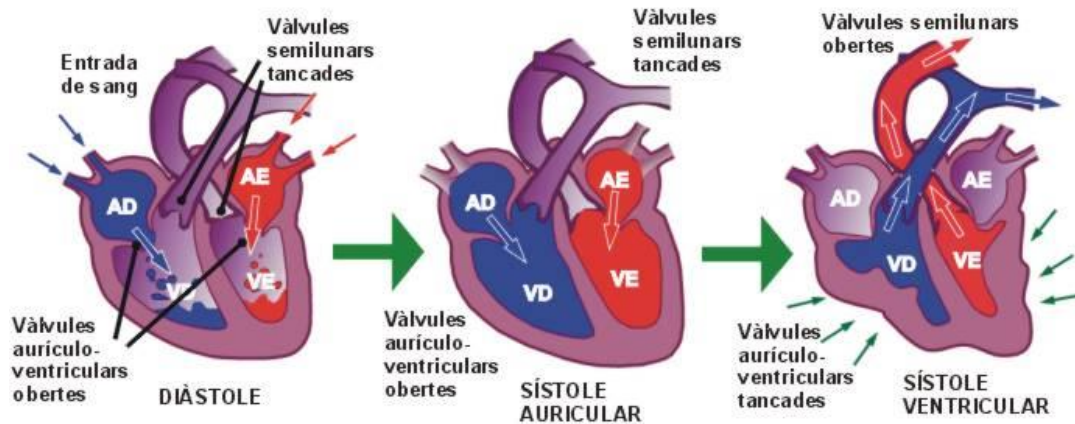


Figura 4: Representació gràfica de les 3 fases del cicle cardíac (Font: Aula 2005)

1.4. ACTIVITAT ELÈCTRICA CARDÍACA

El cor presenta un sistema elèctric, també anomenat sistema de conducció cardíac, que s'encarrega de generar i propagar l'impuls elèctric, anomenat potencial d'acció cardíac (explicat en el següent apartat), que provoca els moviments de contracció i relaxació pel bombeig de la sang (National Heart, Lung and Blood Institute, 2011).

La senyal elèctrica té lloc en l'anomenat teixit nodal, constituït per les cèl·lules musculars modificades que s'han especialitzat en l'estimulació del múscul cardíac enlloc d'actuar com a cèl·lules contràctils normals. El teixit nodal que forma el sistema elèctric el componen els elements següents (Figura 5):

- El **nòdul sinoauricular o sinusal**, situat a l'aurícula dreta al costat de la desembocadura de la vena cava superior. L'estimulació provoca la contracció del cor amb 70-80 pulsacions per minut, per la qual cosa s'anomena "marcapassos cardíac"
- El **nòdul auriculoventricular**, situat a la dreta de la paret auricular, al costat del ventricle dret, capta l'estimulació provinent del nòdul sinusal. Per si mateix és capaç de fer bategar el cor a un ritme de 40 – 60 batecs per minut.
- El **fascicle de His**, el formen les fibres del teixit nodal que, procedents del nòdul auriculoventricular, baixen per la paret interventricular i es ramifiquen en les anomenades fibres de Purkinje per les parets dels ventricles i als quals propaguen l'estimulació. El fascicle de His és capaç de contraure per si mateix el cor a un ritme de 15 batecs per minut.

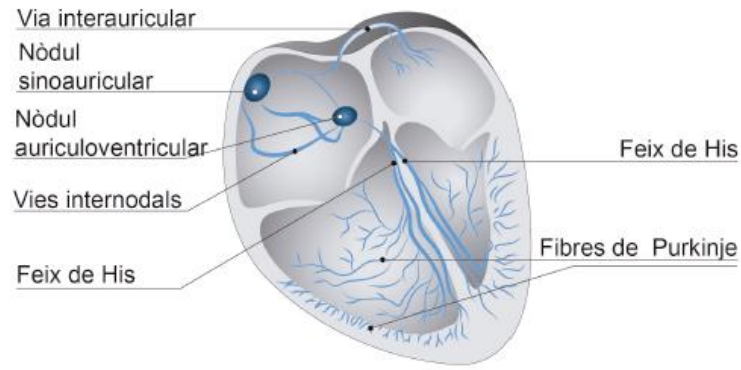


Figura 5: Representació dels elements del teixit nodal del sistema elèctric del cor (Font: Tarradas, A., 2017)

Cada batec s'inicia amb una estimulació elèctrica des de l'interior del múscul cardíac. En un cor normal i sa, els batecs comencen amb una senyal elèctrica provocada des del nòdul sinoauricular, i el nombre d'aquestes senyals que es produeixen en un minut és el que marca el ritme cardíac. Aquest estímul elèctric es genera quan la vena cava superior emplena l'aurícula dreta amb la sang provinent del cos, i es propaga a través de les cèl·lules de les dues aurícules, fent que aquestes es contraguin impulsant la sang cap als ventricles. Posteriorment, la senyal arriba al nòdul auriculoventricular al costat del ventricle dret i s'atura durant un instant per permetre als dos ventricles omplir-se de sang. Llavors, l'estímul s'allibera a través del fascicle de His a les parets dels ventricles, on es divideix en ramificacions, anomenades fibres de Purkinje, que estan connectades directament a les cèl·lules de les parets dels dos ventricles per tal de propagar-hi el senyal i fer que es contraguin, així impulsen la sang cap als pulmons o bé cap a la resta del cos. Aquest fet, però, no té lloc en el mateix moment ja que el ventricle esquerre es contrau abans que el ventricle dret. A mesura que el senyal ha transcorregut, les parets dels ventricles es relaxen en espera del següent estímul, i el mateix procés s'inicia una altra vegada des del nòdul sinoauricular i es repeteix constantment (National Heart, Lung and Blood Institute, 2011).

1.5. POTENCIAL D'ACCIÓ CARDÍAC

L'impuls elèctric és un gradient electroquímic que crea una diferència de potencial entre l'interior i l'exterior de la membrana cel·lular per tal que pugui generar-se el batec del cor. Cada cèl·lula cardíaca està envoltada d'un medi que conté ions, els més importants són els ions de sodi (Na^+), de potassi (K^+) i de calci (Ca^{2+}). En el període de repòs de la cèl·lula, el seu interior està carregat negativament, mentre que l'exterior de la membrana

cel·lular està carregat positivament. El moviment dels ions a través dels canals de la membrana dels cardiomiòcits és el que produeix les senyals elèctriques (Marban, E. 2002)

El potencial d'acció (PA) està determinat per 3 factors: la concentració de ions dins i fora de la cèl·lula, la permeabilitat de la membrana a aquests ions a través dels canals iònics, i el transport actiu en bombes de ions (Llorà O. 2017). La morfologia del PA varia segons el tipus de cèl·lula. Concretament, el PA cardíac és un dels més llargs, oscil·la entre uns 150 i 300 ms. Durant la despolarització, l'interior de la cèl·lula passa d'estar carregat negativament (-90mV) a estar carregat positivament (+40mV). Aquest ràpid canvi de polaritat és el que genera l'impuls elèctric, que es propaga d'un extrem a l'altre de la cèl·lula. Seguidament es produeix la repolarització quan l'interior de la membrana recupera la negativitat, per tant, els miòcits recuperen la càrrega inicial i tornen al seu estat de repòs (-90mV) (Marban, E., 2002).

El PA cardíac es pot dividir en 4 fases (Amin, A. S. et al, 2010) (Figura 6):

- FASE 0 o fase de despolarització: La despolarització té lloc com a conseqüència de l'entrada massiva de Na^+ a l'interior de la cèl·lula a través de l'obertura dels canals de Na^+ .
- FASE 1 o fase repolarització parcial de la membrana: La repolarització es produeix a causa de la sortida de K^+ i la inactivació dels canals de Na^+ , que produeix una parcial repolarització.
- FASE 2 o fase *plateau*: S'equilibra el PA amb l'entrada de Ca^{2+} i la sortida de K^+ .
- FASE 3 o repolarització cel·lular: Es caracteritza per una sortida de K^+ on participen diversos tipus de canals de K^+ .
- FASE 4 o fase de repòs: Finalment, la cèl·lula arriba al seu PA de repòs.

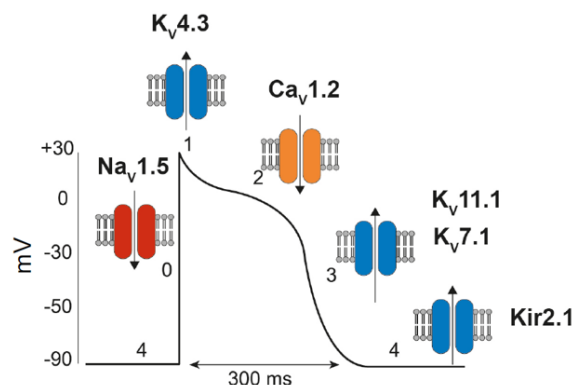


Figura 6: Representació esquemàtica de les diferents fases del PA, amb les corrents iòniques d'entrada i sortida de la membrana cel·lular ($\text{Na}_V1.5$ = canal de Na^+ cardíac, $\text{K}_V4.3$ = diferents canals K^+ , $\text{Ca}_V1.2$ = canal de Ca^{2+} cardíac) (Font: Tarradas, A., 2017)

1.6. L'ELECTROCARDIOGRAMA

Per avaluar el funcionament del cor, es mesura la seva activitat cardíaca en una prova anomenada electrocardiograma (ECG), que registra l'activitat elèctrica del cor a través d'un gràfic. És una prova ràpida, segura i no dolorosa. Es realitza col·locant una sèrie d'elèctrodes a la superfície de la pell posicionats a diferents parts del cos per gravar l'activitat elèctrica en un dispositiu extern encarregat d'elaborar la gràfica (Marban, E., 2002).

La gràfica que s'obté a través de l'ECG mostra les variacions de voltatge (en l'eix vertical) en relació amb el temps (en l'eix horitzontal) en forma d'ones, que corresponen amb el recorregut dels impulsos elèctrics a través de les diferents estructures del cor. La línia isoelèctrica o basal és la línia guia horitzontal on es representen els batecs del cor en les diferents oscil·lacions. El registre cardíac es dibuixa sobre un paper mil·limetrat, on cada quadrat mesura 1mm i cada 25mm en sentit horitzontal equivalen un segon.

Les fases del PA cardíac es corresponen amb les diferents ones que apareixen a l'ECG (Edic College. Cabrera, L., 2015). Llegides d'esquerra a dreta distingim (Figura 7):

- **Ona P:** La primera ona que apareix a l'ECG, representa la despolarització de les aurícules. Normalment és ascendent i presenta una forma de U invertida amb una durada de 0,08 segons.
- **Segment P-R:** El tram de línia basal entre el final de l'ona P i l'inici del complex QRS. Representa el moment en que les aurícules acaben de buidar-se i es produeix una desacceleració de la transmissió de l'impuls elèctric, just abans de que es contraguin els ventricles.
- **Complex QRS:** Consta de les ones Q, R i S, i correspon en el moment en que els ventricles es despolaritzen, quan es contrauen expulsant la sang que contenen. Es caracteritza per tenir el primer voltatge negatiu, el segon positiu i, finalment, el voltatge torna a descendir. El complex no pot estendre's a més de 0,12 segons.
- **Segment S-T:** El tram de línia basal que es troba entre l'ona S i l'inici de l'ona T.
- **Ona T:** L'última ona que apareix a l'ECG, representa el moment de la repolarització dels ventricles, quan el cor es troba en un període de relaxació després d'haver expulsat la sang que contenen els ventricles. Normalment és ascendent i presenta una forma de U invertida amb una durada que no supera els tres quadrats petits.

La repolarització de les aurícules no apareix a l'ECG perquè queda amagada sota el complex QRS, que presenta un major senyal elèctric.

També podem interpretar un ECG dividint el gràfic en dos intervals (Edic College. Cabrera, L., 2015):

- **Interval PR:** Transcorre des del principi de l'ona P fins que comença el complex QRS. Representa la despolarització de les aurícules i la propagació de l'impuls elèctric fins al nòdul ventricular.
- **Interval QT:** Transcorre des del principi del complex QRS fins al final de l'ona T. Representa la despolarització i la repolarització dels ventricles.

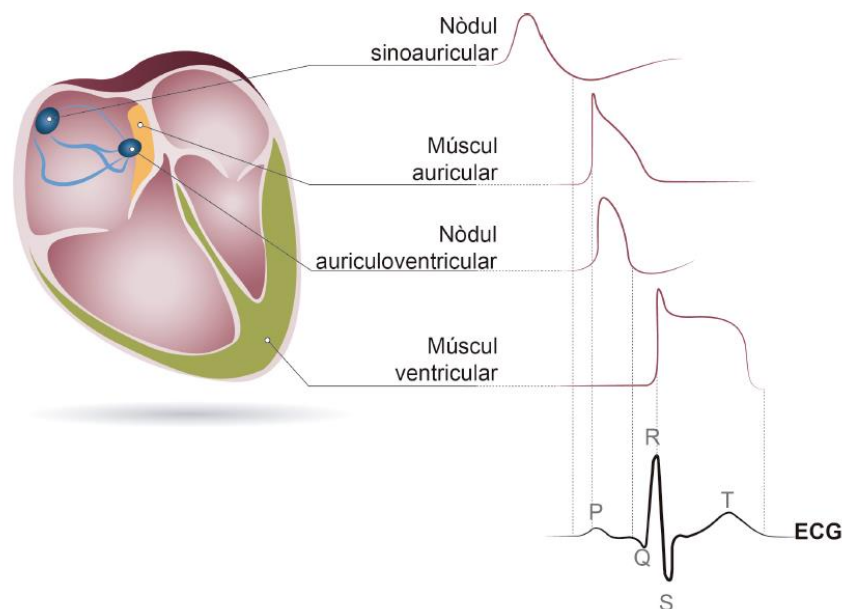


Figura 7: Representació de l'ECG en funció del PA cardíac i el recorregut de l'impuls elèctric pel teixit nodal del cor (Font: Tarradas, A., 2017)

Una persona sana presenta un ECG amb un traçat característic, i algun canvi en aquest patró pot associar-se a una malaltia cardíaca. Normalment s'utilitza per detectar trastorns del ritme cardíac (arrítmies) i situacions on no arriba suficient sang al cor (infart de miocardi i angina de pit). A més, permet diferenciar el ritme normal del cor, acceptat entre 60-100 pulsacions per minut, d'aquells qui pateixen un taquicàrdia (freqüència cardíaca augmentada) o, tot el contrari, una bradicàrdia (freqüència cardíaca disminuïda). També s'utilitza per diagnosticar bloquejos cardíacs, quan la transmissió de l'impuls queda interromput en un punt de la conducció, entre altres (ITACA, 2010).

2. LA MORT SOBTADA CARDÍACA

2.1. LA MORT SOBTADA CARDÍACA

La mort sobtada cardíaca (MSC) es defineix com aquella mort natural que succeeix en menys d'una hora des del començament dels símptomes. Es produeix quan el cor deixa de bategar inesperadament i, per tant, impedeix que la sang rica en oxigen arribi al cervell i als altres òrgans. Si el cervell es manté deu segons sense aquesta aportació d'oxigen, la persona es desmaia i és el moment en que s'inicia la mort sobtada. El malalt pot tenir o no una cardiopatia coneguda, però el moment i la forma de la mort són inesperables (Fundació Brugada, 2014). La persona que pateix una aturada cardíaca sobtada pot morir en qüestió de minuts si no rep cap tractament d'immediat. Retornar el ritme cardíac en menys d'aquest temps és la clau per la supervivència del pacient, ja que a cada minut que passa es perd una desena part de les possibilitats de recuperar-se.

A Espanya hi ha 30.000 casos de MSC cada any, i diversos milions de casos a tot el món. D'aquests, un 80% es produeixen en persones de més de 35 anys amb alguna patologia prèvia, i normalment són agreujades per un estil de vida poc saludable (Fundació Brugada, 2014). Tot i aquestes estadístiques, la MSC pot afectar a qualsevol persona i a qualsevol edat, tant a persones que ja pateixen una malaltia cardíaca com aquelles aparentment sanes.

2.2. ETIOLOGIA

La causa més comuna responsable del 80% dels casos de MSC és la malaltia coronària, ocasionada per l'acumulació de plaques de colesterol a les artèries coronàries, és a dir, quan les artèries es taponen i perden elasticitat impedit el pas de sang (Texas Heart Institute, 2016). Els principals factors de risc cardiovascular són la obesitat, la diabetis, la hipertensió arterial, el tabaquisme i el sedentarisme.

Un 20% de les MSC són causades per malalties cardiovasculars hereditàries, que poden ser de dos tipus (Fundació Brugada, 2014):

- ❖ **Cardiomiopaties:** Malalties associades a anomalies estructurals del cor. Les tres patologies més freqüents són: la miocardiopatia dilatada³, la miocardiopatia hipertròfica⁴, i la displàsia arritmogènica del ventricle dret⁵.
- ❖ **Canalopaties:** Malalties associades a trastorns en l'activitat elèctrica del cor, relacionades amb l'acció dels canals iònics, sense que hi hagi una anomalia estructural visible al cor. En aquest grup s'inclou la Síndrome de Brugada (SBr)⁶, la Síndrome de QT curt (SQTC)⁷, la Síndrome de QT llarg (SQTL)⁸ i la Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica (CPVT)⁹ (Figura 8) (Brugada, J. Brugada, R. Brugada, P., 2007). Fins fa poc no hi havia cap manera de detectar aquestes arrítmies a través d'una autòpsia, ja que no provoquen cap canvi en l'estructura visible del cor i el primer símptoma en molts casos ja és la MSC, però actualment, gràcies als estudis genètics, es pot diagnosticar la causa de la mort.

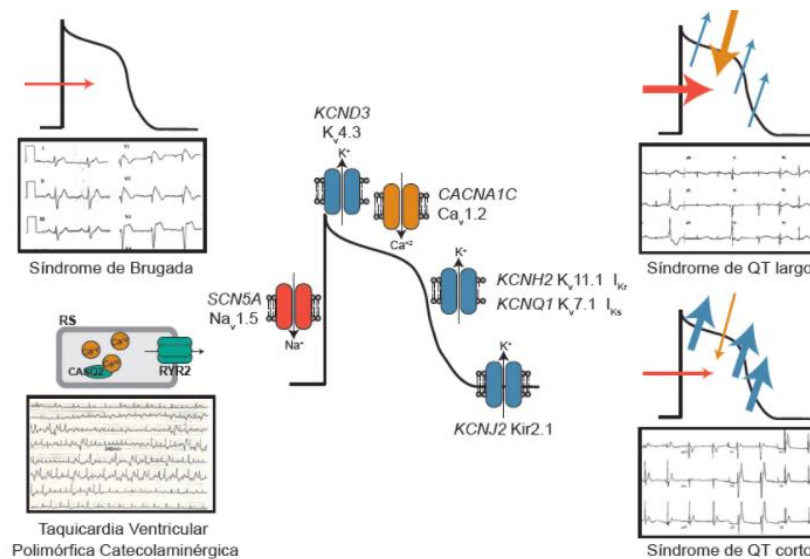


Figura 8: Representació esquemàtica de la causa de les diferents canalopaties durant el PA cardíac (Font: Riuró, H., 2014)

³ Cardiomiopatia dilatada: quan el cor es debilita i es diu fent que el bombeig de sang no sigui eficient.

⁴ Cardiomiopatia hipertròfica: quan es produeix un augment del gruix de les parets del cor fent que el miocardi treballi per sobre les seves possibilitats.

⁵ Displàsia arritmogènica del ventricle dret: quan s'infiltra teixit adipós al teixit del ventricle dret fent que es produeixin batecs arrítmics.

⁶ Síndrome de Brugada: A causa d'una disminució del corrent de sodi a la fase 0 del PA cardíac.

⁷ Síndrome de QT curt: A causa d'un augment de la sortida de potassi.

⁸ Síndrome de QT llarg: A causa d'un augment de l'entrada de sodi o calci.

⁹ Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica: A causa d'una sortida de calci massa ràpida.

3. LA SÍNDROME DE BRUGADA

3.1. LA SÍNDROME DE BRUGADA

La SBr és un trastorn genètic poc comú del sistema elèctric del cor que pot produir una MSC en persones que presenten un cor estructuralment normal. La malaltia es transmet segons un patró d'herència autosòmic dominant, és a dir, només cal que un dels cromosomes homòlegs estigui alterat per tal que s'expressi la malaltia (Riuró, H. 2014). Les persones afectades neixen amb la malaltia però, generalment, no presenten cap símptoma fins als 30 o 40 anys. En algunes ocasions, els afectats també presenten un ECG totalment normal, però el més habitual és que presentin un ritme cardíac atípic i un ECG amb un possible bloqueig de branca dreta, una elevació del segment ST i una ona T negativa. La forma d'aquest ECG es coneix amb el nom d'“aleta de tauró” (Figura 9A) (Anzelevitch, C., 2016).

Segons els estudis, entre un 4% i un 12% del total de les MSC que es produeixen, sobretot en joves, són a causa de la SBr (Fernández-Falgueras, A. et al. 2017). La malaltia és més freqüent en homes que en dones, probablement per la influència de les hormones, i sol ser diagnosticada majoritàriament entre els 25 i els 50 anys. Als països del sud-est asiàtic és la segona causa de mort entre gent jove, només precedida pels accidents de trànsit.

3.2. DESCOBRIMENT

La SBr va ser observada per primera vegada en un nen de 3 anys de nacionalitat polonesa. Els seus pares ja l'havien reanimat en diverses ocasions quan van decidir dur-lo a la consulta. Resulta ser que la germana d'aquest nen també havia patit el mateix però va morir. L'ECG d'ambdós germans presentava una gràfica anormal i, a partir de dos pacients més que es trobaven en les mateixes característiques, els germans Brugada varen decidir investigar-ho en relació amb la MSC. Anteriorment a tot això ja s'havien registrat alguns electrocardiogrames que presentaven les característiques de la malaltia, però aquests no es van relacionar amb la MSC i van ser considerats com a variants del normal o com a “repolarització precoç” (Fundació Brugada, 2014).

L'any 1992 es van publicar els primers resultats de la investigació i es van trobar quatre afectats nous, però no va ser fins més endavant que el nombre de pacients va augmentar exponencialment (Brugada et al., 1992). Després d'uns anys es va descobrir que la SBr

presenta una important càrrega genètica i que, per tant, és hereditària. Actualment, aproximadament un 60% dels pacients que s'han recuperat de MSC i que presenten l'ECG característic tenen altres familiars afectats.

3.3. SÍMPTOMES

En moltes ocasions, el pacient no sap que pateix la malaltia perquè no presenta símptomes, però també hi ha altres casos que, tot i haver-se realitzat les proves necessàries com l'ECG, no se'ls arriba a diagnosticar la malaltia. Això és a causa que el patró de l'ECG és molt variable en el temps, ja que pot canviar en funció de l'ambient i de l'administració de medicaments antiarrítmics. En alguns moments es pot presentar de forma normal, i en canvi en d'altres pot elevar-se el segment ST quan s'incrementa la freqüència cardíaca o també en repòs (Fundació Brugada, 2014). Així doncs, deixant de banda el fet que es produeixi una parada cardíaca sobtada, els únics símptomes que pot presentar el pacient són palpitations o algun desmai (Texas Heart Institute, 2016).

3.4. DIAGNÒSTIC

El diagnòstic de la SBr requereix una elevació en forma còncava del segment ST seguit per una ona T negativa. Per tal de dur a terme el diagnòstic, es realitza un ECG per analitzar els corrents elèctrics del cor i les característiques dels batecs. A vegades es necessiten diferents ECG de diferents moments per comprovar que realment hi ha un problema, i també es poden administrar certs fàrmacs que bloquegen els canals de Na^+ i indueixen l'elevació del segment ST. Els més freqüents són la flecaïnida i l'ajmalina (Antzelevich, C., 2016).

S'han definit tres patrons d'ECG per la SBr, però només el tipus I és diagnòstic de la malaltia, mentre que el tipus II i III es consideren patrons suggerents però no diagnòstics de la malaltia (Brugada, P. et al., 2009):

- Tipus I: Presenta una elevació còncava del segment ST major o igual de 2mm seguida d'una ona T negativa. Aquesta forma és anomenada “aleta de tauró” (Figura 9A).

- Tipus II: Presenta una elevació del segment ST major o igual de 2mm que posteriorment descendeix mantenint-se per sobre de 1mm, seguida d'una ona T positiva. Aquesta morfologia s'anomena "sella de muntar" (Figura 9B).
- Tipus III: Es tracta d'un patró similar al tipus II, ja que també té forma de "sella de muntar", però la elevació del segment ST és menor de 1mm, i també va seguida d'un descens i una ona T positiva (Figura 9C)

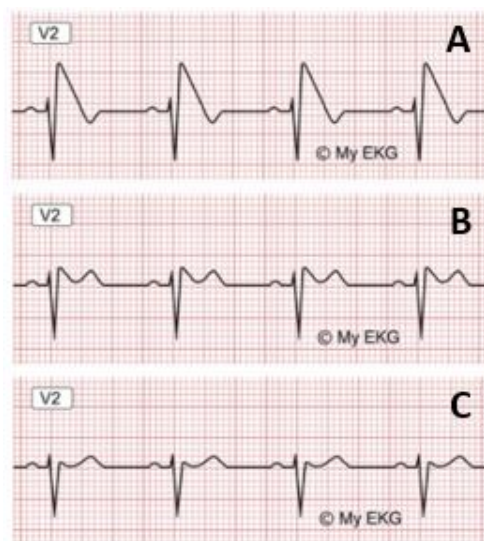


Figura 9: Patrons d'ECG per la SBr: A. Tipus I B. Tipus II C. Tipus III (Font: My EKG)

Un cop s'ha detectat la possible presència de la malaltia a través de l'ECG, també pot dur-se a terme un estudi electrofisiològic (Texas Heart Institute, 2016). Aquesta prova consisteix en introduir un catèter a través d'una artèria, ja sigui del braç, el coll, l'engonal..., i guiar-lo fins al cor. D'aquesta manera es pot enregistrar l'activitat elèctrica des de l'interior del cor i ens permet conèixer el tipus d'arrítmia i el lloc del cor on s'origina.

La SBr només pot ser diagnosticada amb un patró de SBr tipus I en l'ECG, més algun dels següents criteris pel diagnòstic definitiu: fibril·lacions ventriculars, síncope, altres familiars amb SBr o que han patit MSC, entre altres (Fundació Brugada, 2014).

Com que es tracta d'una malaltia hereditària, és recomanable que es faci estudi genètic dels familiars dels pacients afectats per identificar aquells qui tenen la mutació que els podria provocar una MSC i, per tant se'ls pot aplicar un tractament preventiu.

3.5. TRACTAMENT

Quan es detecta un pacient amb la malaltia i/o un familiar que presenta un alt risc de patir-la, l'únic mètode que pot utilitzar-se per evitar que la persona mori a causa d'una fibril·lació ventricular és implantar un desfibril·lador automàtic implantat (DAI) (Fundació Brugada, 2014). El DAI és un petit aparell que monitoritza el ritme cardíac i

envia xocs elèctrics al cor en cas que es produeixi una fibril·lació ventricular. Actualment s'estan duent a terme estudis per trobar tractaments més econòmics i a l'abast de tota la població (Riuró, H. 2014).

Les persones que pateixen la SBr poden seguir una vida normal. Tant si duen implantat un DAI com si no, és necessari que facin visites periòdiques al metge per estar segurs que la malaltia està sota control.

3.6. CANALS IÒNICS I GENS IMPLICATS A LA MALALTIA

Les persones que pateixen la SBr tenen un defecte en un dels canals iònics del sistema elèctric del cor. Cal dir, que aquests canals són proteïnes codificades per uns gens, i que mutacions en aquests gens poden alterar la seva funció. La SBr s'associa a una disminució del corrent de sodi durant la fase 0 del PA cardíac (Brugada, P. et al., 2009). En un 11-24% dels casos una mutació en el gen *SCN5A* és el responsable d'aquesta disminució, ja que codifica pel canal de sodi ($\text{Na}_v1.5$) i un defecte en aquest és el que provoca menys entrada de corrent i causa que el cor bategui més ràpid i desorganitzadament, produint fibril·lacions ventriculars (Nielsen, M. W. et al., 2013). Això fa que el cor bombegi molt poca sang al cervell i a la resta del cos i, per tant, pot provocar la MSC en el pacient.

El *SCN5A* va ser el primer gen associat a la SBr i encara és el principal gen patògen de la malaltia. Des de llavors s'han identificat més de 450 variants en 24 gens que codifiquen pels canals de sodi, potassi, calci o altres proteïnes associades, però el percentatge de pacients amb mutacions en aquests gens és molt baix (Fernández-Falgueras, A. et al. 2017). A més, encara queda un percentatge molt elevat, entre un 60% i un 75%, de pacients als quals no se'ls ha diagnosticat la causa genètica. Actualment es creu que una part d'aquests pacients podrien tenir mutacions en regions no codificants del genoma (veure apartat 6).

Llista dels gens implicats en la malaltia: *ABCC9*, *CACNA1C*, *CACNA2D1*, *CACNB2*, *FGF12*, *GPD1L*, *HCN4*, *HEY2*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNE3*, *KCNE5*, *KCNH2*, *KCNJ8*, *PKP2*, *RANGRF*, *SCN10A*, *SCN1B*, *SCN3B*, *SCN5A*, *SEMA3A*, *SLMAP*, *TRPM4P* (Fernández-Falgueras, A. et al. 2017).

3.7.MECANISMES D'ELEVACIÓ DEL SEGMENT ST

Els mecanismes implicats en l'elevació del segment ST i que provoquen un major risc de patir una fibril·lació ventricular¹⁰ en la SBr encara no estan clars del tot. Actualment hi ha dues hipòtesis principals, tot i que cap de les dues ha estat demostrada de forma completa (Llorà O. 2017):

- **Hipòtesi de desequilibri en la repolarització:** Hi ha una dispersió de la repolarització entre l'epicardi i l'endocardi, causada per la pèrdua de funció del $Nav1.5$ que altera de manera diferent les cèl·lules de l'epicardi respecte les de l'endocardi, i això es manifesta a través de l'elevació del segment ST (Figura 10A).
- **Hipòtesi de desequilibri en la despolarització:** Es basa en un retard de la conducció en el PA del tracte de sortida del ventricle dret en comparació amb el PA del ventricle dret, que s'enregistra a l'ECG en el segment ST elevat i la ona T negativa (Figura 10B).

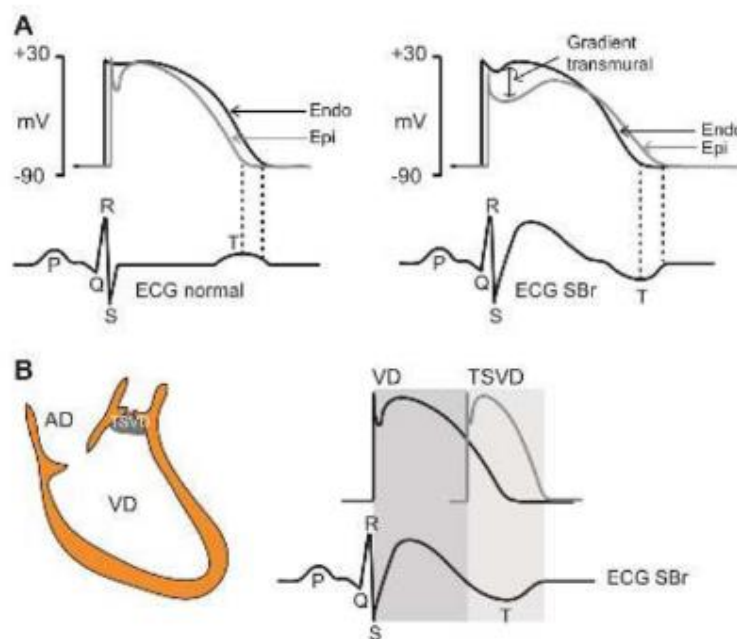


Figura 10: Representació esquemàtica de les dues hipòtesis de mecanisme d'elevació del segment ST en un ECG (Font: Riuró, H., 2014)

A. Hipòtesi de desequilibri en la repolarització

B. Hipòtesi de desequilibri en la despolarització

¹⁰ Fibril·lació ventricular: trastorn del ritme cardíac caracteritzat per presentar un ritme ventricular de més de 250 batecs per minut.

4. CANAL DE SODI CARDÍAC

4.1. CANAL DE SODI CARDÍAC

Els canals iònics són proteïnes de membrana encarregades de permetre la circulació de ions a dins i a fora de la cèl·lula per gradient de voltatge.

El $\text{Na}_v1.5$ està compost per una subunitat α , codificada pel gen *SCN5A*, i diverses subunitats β , codificades per altres gens. Com ja s'ha dit anteriorment, és l'encarregat de desencadenar la despolarització del PA cardíac (fase 0), ja que la seva obertura origina una entrada de ions de sodi (Na^+) a l'interior de la cèl·lula, anomenada també corrent de sodi (I_{Na}) (Amin, A. S. et al., 2011). Per tant, una alteració en la funció del canal de sodi afecta el PA cardíac i queda reflectit en l'ECG. Durant el PA cardíac, els canals de sodi adopten tres estats: un conductor (obert-O) i dos no conductors: tancat-C, que és com es troba en estat de repòs, i inactiu-I, aquest estat es dona just després de la despolarització per tal d'obturar el canal i evitar que entri més sodi durant la repolarització, per fer-ho es tanca una comporta que s'anomena comporta d'inactivació (Riuró, H. 2014) (Figura 11).

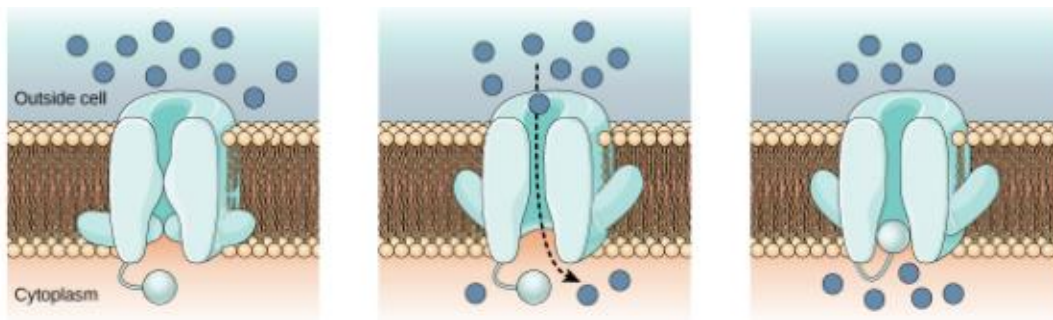


Figura 11: Representació dels 3 estats que adopta el $\text{Na}_v1.5$: tancat (T), obert (O) i inactiu (I)

(Font: Rice University)

4.2. *SCN5A*

El gen *SCN5A* està situat en el locus 3p21, és a dir, en el braç curt del cromosoma 3 a la posició 22.2 (Figura 12), i codifica per la subunitat α del $\text{Na}_v1.5$. Està format per 28 exons¹¹ i 36 introns¹². El *SCN5A* s'expressa majoritàriament en el cor i, per aquest motiu, una mutació en la regió codificant d'aquest gen pot provocar arrítmies cardíques i MSC (Genetics Home Reference, 2017).

¹¹ Exons: fragments de DNA que porten informació per la síntesi de proteïnes

¹² Introns: fragments de DNA que no codifiquen per proteïnes però sí poden tenir una funció reguladora

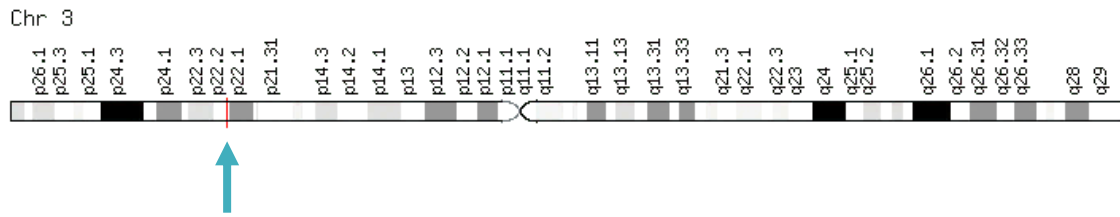


Figura 12: Representació del cromosoma 3, indicant el locus 3p21 on està situat el gen *SCN5A*
(Font: GeneCards, Human Gene Database)

Fins a l'actualitat s'han trobat prop de 300 mutacions a *SCN5A* que estan associades a la SBr. En general, les mutacions sense sentit¹³ i les mutacions amb corriment del marc de lectura¹⁴ fan que la subunitat α es tradueixi de forma incorrecta fent que el $\text{Na}_v1.5$ perdi funcionalitat i, per tant, es redueix el corrent de sodi (Llorà, O. 2017).

Les mutacions provoquen una pèrdua de funció del canal per (Brugada, R. 2008):

- Defecte de trànsit de la proteïna: la mutació afecta en una zona de l'estructura de la proteïna important pel seu trasllat a la membrana o al seu enclatge en ella. En conseqüència, hi ha menys canals de sodi a la membrana dels necessaris per una correcta despolarització.
- Trencament prematur de la proteïna, a causa d'una mutació, que codifica per un codó STOP o un corriment del marc de lectura. Aquestes proteïnes no són funcionals.
- Inactivació accelerada del $\text{Na}_v1.5$ per un defecte a la zona de la proteïna de la comporta d'inactivació o del mateix porus del canal.

Com ja s'ha dit anteriorment, encara hi ha un 70% de persones diagnosticades amb SBr de les quals no es coneix la causa. Una hipòtesi en aquests casos pot ser alguna alteració en l'expressió genètica del gen *SCN5A*, és a dir, una alteració durant la transcripció o la traducció. Aquest fet és una de les meves hipòtesis de treball que s'explicarà a continuació.

¹³ Mutacions sense sentit: Un canvi de nucleòtid provoca l'aparició d'un codó STOP i, per tant, la proteïna resulta incompleta.

¹⁴ Mutacions amb corriment del marc de lectura: L'addició o deleció d'un nucleòtid produeix un desplaçament en la lectura dels nucleòtids, fent que es tradueixi un polipèptid totalment diferent.

5. GENÈTICA

5.1. L'ÀCID DESOXIRIBONUCLEIC (DNA)

El DNA és la molècula que emmagatzema la informació biològica que es transmet de progenitors a descendents i es troba idèntic en totes les cèl·lules de l'organisme.

En eucariotes, el DNA està format per dues cadenes de nucleòtids unides amb enllaços, anomenats ponts d'hidrogen¹⁵, i enrotllades entre si formant una doble hèlix. Cada cadena és un polímer de desoxiribonucleòtids¹⁶ de les 4 bases nitrogenades: adenina (A), timina (T), citosina (C) i guanina (G). La cadena presenta dos extrems: l'extrem 5', on hi ha un grup fosfat unit al carboni 5' del primer nucleòtid, i l'extrem 3', on hi ha un radical hidroxil unit al carboni 3' de l'últim nucleòtid. Les cadenes se sintetitzen en direcció 5' a 3', ja que cap enzim pot afegir nucleòtids a l'extrem 5' però sí a l'extrem 3'. Les dues cadenes que formen la doble hèlix són antiparal·leles¹⁷, complementàries¹⁸ i dextrogires¹⁹ (Annex I A). Aquesta estructura és molt estable, però si s'escalfa prop d'uns 100°C els dos filaments de la doble hèlix se separen i es produeix la desnaturalització del DNA. Si posteriorment es manté a uns 65°C, les dues cadenes tornen a unir-se en l'anomenada renaturalització. A l'interior del nucli, el DNA eucariota està associat a histones donant lloc a la fibra de cromatina. Aquesta es condensa a diferents nivells d'empaquetament fins a assolir el nivell màxim de superenrotllament formant els cromosomes.

La duplicació o replicació del DNA pot produir-se de 2 maneres: *in vivo*, quan el procés es produeix en una cèl·lula viva, i *in vitro*, quan es provoca al laboratori. La replicació del DNA és semiconservadora, ja que les dues cadenes de DNA se separen i cadascuna serveix de motlle per la síntesi, segons la complementarietat de bases, d'una nova cadena.

El DNA, però, no pot expressar-se directament, sinó que perquè se sintetitzin les proteïnes s'han de dur a terme dos processos on intervenen altres enzims (Jimeno, A., 2016).

¹⁵ Ponts d'hidrogen: Enllaç que es produeix entre un àtom d'hidrogen (carregat positivament) i, majoritàriament, un àtom d'oxigen (carregat negativament). En el cas dels nucleòtids, s'uneixen C amb G a través de 3 ponts d'hidrogen, i A amb T mitjançant 2 ponts d'hidrogen.

¹⁶ Desoxiribonucleòtids: Nucleòtids formats per una base nitrogenada (A, T, C, G), un grup fosfat i una pentosa, que contretament es tracta d'una desoxiribosa (no té grup OH en el carboni 2)

¹⁷ Antiparal·leles: Les dues cadenes van en direccions diferents (5' → 3' i 3' → 5')

¹⁸ Complementàries: Les dues cadenes de la doble hèlix són diferents, ja que cada base nitrogenada d'una cadena s'uneix a la seva complementària de l'altra cadena. En els nucleòtids, l'A és complementària amb la T i la C és complementària amb la G.

¹⁹ Dextrogires: L'estructura de la doble hèlix gira cap a la dreta.

5.2. TRANSCRIPCIÓ

La transcripció és el procés pel qual la informació genètica de l'interior del nucli de la cèl·lula eucariota es copia en forma de RNA. Això es porta a terme mitjançant un enzim anomenat RNA polimerasa (RNAPol), que utilitza una de les dues cadenes del DNA com a motlle, fent-ne una còpia en direcció 5' cap a 3' seguint la complementarietat de bases (en aquest cas la timina se substitueix per uracil (U)) (Annex I B).

Es poden formar 3 tipus de RNA (Jimeno, A., 2016):

- RNA missatger (RNAm): S'encarrega de copiar a informació del DNA i dur aquest missatge als ribosomes per seqüenciar la proteïna.
- RNA de transferència (RNAt): S'encarrega de transportar aminoàcids específics fins als ribosomes. Ve determinat amb una seqüència de tres nucleòtids (anticodó) complementària als codons de l'RNAm.
- RNA ribosòmic (RNAr): Forma el 60% dels ribosomes i, juntament amb proteïnes ribosòmiques, formaran aquest orgànul que allotjarà l'RNAm i els RNAt.

En organismes eucariotes, en primer lloc es forma un precursor de l'RNAm definitiu, ja que inicialment conté exons però també introns, que són eliminats durant el procés de maduració al no contenir informació per codificar la proteïna. De tot el DNA que conté el nucli d'una cèl·lula només se'n transcriu una part que dependrà del tipus cel·lular en que s'ha de diferenciar la cèl·lula per especialitzar-se.

5.3. TRADUCCIÓ

La traducció és la síntesi de proteïnes a partir de RNAm que té lloc als ribosomes amb la intervenció dels diversos tipus de RNA. L'RNAm porta la informació que determinarà la seqüència d'aminoàcids de la proteïna segons la relació que hi ha establerta en el codi genètic, que assigna a cada tres nucleòtids (anomenat codó o triplet) un aminoàcid concret d'entre els 20 tipus diferents. També és necessària l'ajuda del RNAt que, un cop es complementa el seu anticodó amb el codó de l'RNAm, allibera l'aminoàcid que porta adherit, formant així la proteïna en qüestió en els ribosomes (Annex I C). La seqüència de nucleòtids de l'RNAm s'interpreta a partir d'un punt d'inici de la traducció assenyalat pel codó AUG, que codifica per l'aminoàcid metionina, i continua en direcció 5' cap a 3' fins a trobar un codó stop (UAA, UAG o UGA) que fa de parada (Jimeno, A., 2016).

6. VARIANTS EN ELEMENTS REGULADORS DEL GENOMA

Tradicionalment s'han associat les variants genètiques que causen malalties a les regions codificants del genoma, és a dir, els exons que codifiquen per una proteïna, però aquestes només representen un 2% del genoma. Actualment s'estan duent a terme estudis per conèixer l'efecte de les mutacions en el 98% del genoma restant, les regions reguladores no codificants (majoritàriament en introns o promotors), ja que moltes d'aquestes regions no exòniques són reguladores de l'expressió de gens propers.

Així doncs, segons uns estudis recents s'ha observat que només un 4,9% de les variants genètiques associades a malalties es localitzen en regions codificants, mentre que la resta es trobarien en les regions reguladores no codificants del DNA (Tarradas, A., et al. 2017). En el camp de les malalties cardíques, cada vegada hi ha també més evidències del paper que tenen les variants en regions no exòniques com a possible causa d'aquestes malalties, però tot i això encara fan falta més estudis per avaluar l'impacte que tenen les variants en aquestes regions.

6.1. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

L'expressió gènica és el procés a partir del qual la informació que contenen els gens s'utilitza per la síntesi de RNA o de proteïnes. Totes les cèl·lules d'un organisme són genèticament idèntiques, és a dir, totes tenen la mateixa seqüència de DNA. Els gens, però, s'expressen de forma diferent segons el tipus cel·lular i, per tant, hi ha uns mecanismes que regulen aquesta expressió (Tarradas, A., 2017). Una alteració en aquests mecanismes pot tenir conseqüències greus, ja que pot donar lloc al desenvolupament de malalties. En les cèl·lules eucariotes hi ha tres punts de regulació de l'expressió importants:

- ❖ **Nivell transcripcional:** Inclou els mecanismes que controlen la unió de l'RNAPol al DNA per tal que s'iniciï la transcripció.
- ❖ **Nivell posttranscripcional:** Inclou les modificacions que rep l'RNAm després de ser transcrit, per tal de convertir-se en RNAm madur i poder seguir amb la traducció.

- ❖ **Nivell posttraduccional:** Consisteix en l'addició de grups químics a la proteïna un cop ha estat sintetitzada, donant lloc a les següents modificacions: fosforilació, glicosilació, acetilació, metilació...

Tot i que qualsevol fase de l'expressió gènica pot ser regulada, es creu que es produeix majoritàriament a nivell transcripcional. El control de la transcripció depèn, bàsicament, de dos components: els factors de transcripció (FT), que són proteïnes que s'uneixen al DNA, i la cromatina, formada pel DNA i les histones. La interacció entre aquests dos components és el que determina si s'activa o no l'RNAPol II i, per tant, controlen l'activació o la repressió de la transcripció dels gens. En les cèl·lules eucariotes la transcripció basal és restrictiva, és a dir, els gens estan inactivats i necessiten una regulació positiva per iniciar la transcripció.

6.2. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ

Els FT són proteïnes d'unió al DNA que participen en la regulació a nivell transcripcional. Tenen la capacitat d'activar o de reprimir la transcripció gènica mitjançant la unió directa al DNA, ja que en reconeixen unes seqüències específiques, a través de la unió amb altres FT o bé interaccionant amb l'RNAPol II. Distingim dos tipus de FT:

- **Factors de transcripció generals (FTG) o basals:** S'uneixen al promotor dels gens i són necessaris perquè s'iniciï la transcripció, ja que recluten l'RNAPol II i la situen al lloc d'inici de la transcripció. El complex que formen els FTG i l'RNAPol II s'anomena complex de preiniciació (CPI).
- **Factors de transcripció específics:** S'uneixen a regions reguladores del DNA i poden ser activadors o repressors de l'RNAPol II. Mentre que els FTG contribueixen a la transcripció basal dels gens, els FT específics són els responsables de l'expressió gènica diferencial.

Els FT activadors donen una senyal al CPI per promoure la transcripció. S'uneixen al promotor i també a unes regions anomenades "*enhancers*". Aquests llocs d'unió són regions molt curtes de 6 a 12 parells de bases (pb).

Els FT repressors s'uneixen a regions anomenades silenciadors, que es troben prop del promotor del gen que regulen, per tal d'inhibir la transcripció dels gens a través de diferents mecanismes (Tarradas, A. 2017).

6.3. REGIONS DEL DNA REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓ

Les seqüències de DNA a on s'uneixen els FT s'anomenen regions reguladores. S'inclouen:

- **Promotor** → Regió del genoma que conté seqüències específiques d'unió a FT activadors que indiquen l'inici de la transcripció del DNA posterior. Una d'aquestes seqüències molt important que es troba al 24% dels promotors és l'anomenada “caixa TATA”, que indica on s'unirà el CPI.
- **“Enhancers”** → Regions del genoma formades per diverses seqüències d'unió a FT, que poden estar situades fins a milers de pb del promotor, però com que el DNA es troba plegat al nucli poden estar propers en l'espai. El fet que diversos FT s'hi puguin unir al mateix temps fa que activin cooperativament la transcripció d'un gen.
- **Silenciadors** → Regions del genoma on s'uneixen els FT repressors per tal d'inhibir la transcripció. Es poden trobar a prop o lluny del promotor del gen que regulen.

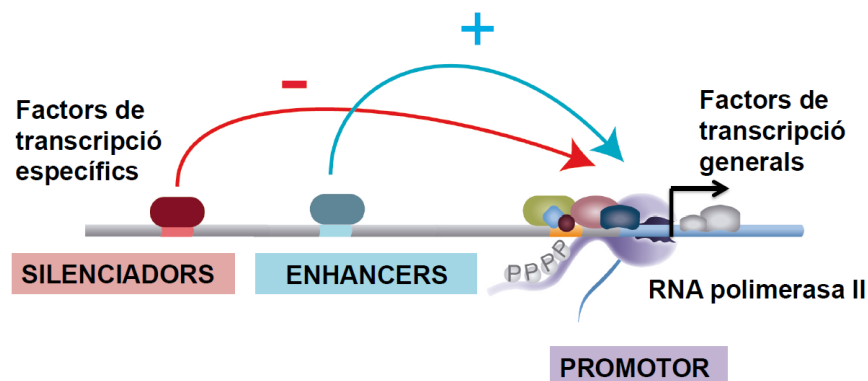


Figura 13: Representació de les 3 regions reguladores d'un gen on poden unir-se els FT generals o específics (silenciadors, *enhancers* i promotor) (Font: Tarradas, A., 2017)

6.4. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN EL COR PER FT

S'ha identificat un grup de FT cardíacs centrals que són claus en la regulació transcripcional cardíaca, tant en l'embrió com en l'adult, i tenen la propietat de regular la seva pròpia expressió. També poden interaccionar entre ells formant complexos multiproteics i activar cooperativament l'expressió dels gens. Aquests FT cardíacs centrals inclouen: NKX2.5, **GATA4**, TBX5, MEF2A, HAND1/2 i SRF (Tarradas, A. 2017).

Les alteracions en els FT cardíacs estan associades a diverses malalties, perquè provoquen un mal funcionament de la xarxa de transcripció cardíaca i donen lloc a canvis en els patrons d'expressió dels gens del cor. En funció del moment en què tenen lloc aquestes alteracions, les malalties cardíacques poden ser congènites o en l'adult.

6.5. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ GATA CARDÍACS

Els FT GATA són una família de proteïnes de tipus dit de zinc²⁰ que s'uneixen a regions específiques del DNA, anomenades motius GATA o llocs d'unió GATA, per regular l'expressió de gens específics. Tenen un paper important en la regulació transcripcional durant la diferenciació i el creixement de diferents tipus cel·lulars. El genoma dels mamífers codifica per sis FT GATA, dels quals GATA4, GATA5 i GATA6 pertanyen al grup anomenat factors GATA cardíacs, ja que són els que predominen en el teixit del cor.

Els factors GATA cardíacs s'expressen molt aviat en l'embriogènesi, i són necessaris per mantenir l'expressió de gens cardíacs en l'adult. Especialment, el FT GATA4 és el més abundant i primerenc, ja que té una gran importància en el procés de diferenciació dels cardiomiòcits (Tarradas, A. 2017).

6.6. MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *SCN5A*

Diversos estudis proposen que alteracions en els mecanismes que regulen l'expressió del gen *SCN5A* poden donar lloc a canalopaties associades amb alteracions del corrent de Na^+ , com en el cas de la SBr, després que no s'hagi identificat cap variant genètica causant de la malaltia en les regions codificants del DNA.

Els mecanismes de regulació del gen *SCN5A* encara no estan del tot explorats. Segons les últimes investigacions, el FT GATA4 té un paper important en l'expressió d'aquest gen. Es preveu que les regions promotores i intròniques del gen són potencials regions reguladores, tot i que encara no se'n coneix exactament la funció, i això s'ha demostrat a través d'una sèrie de proves on es va observar com GATA4 es trobava en major quantitat

²⁰ Proteïnes dits de zinc: Proteïnes que necessiten la unió d'un o més ions de zinc per dur a terme les seves funcions biològiques o estabilitzar les seves estructures terciàries i quaternàries.

prop del promotor i l'intró 1 del *SCN5A* i, en canvi, mancava en les altres regions del gen. També s'ha observat que els nivells de transcripció de GATA4 estan relacionats amb els nivells de transcripció del *SCN5A* en les cèl·lules cardíques. Els mateixos estudis han afirmat que GATA4 podria impulsar l'activació de la transcripció del *SCN5A*, juntament amb altres FT com el FT GATA5, i que tindria una gran dependència als llocs d'unió GATA *binding sites* (GATA-BS). A partir d'això es va predir la presència de GATA-BS en aquestes regions, és a dir, possibles llocs d'unió pel FT GATA4 tant en el promotor com en l'intró 1 del *SCN5A*. El FT GATA4 reconeixeria aquestes regions específiques del DNA i s'hi uniria per regular l'expressió del gen (Tarradas, A., et al. 2017) (Figura 13).

A partir d'això es pot pensar en possibles hipòtesis sobre la causa de la SBr. Així doncs, el causant podria ser una mutació directa en la regió que codifica pel FT GATA4, fent que no fos funcional. També hi ha la possibilitat que una variant en una d'aquestes regions GATA-BS sigui la causa de la malaltia, afectant així la regulació de l'expressió del gen, ja que es reduiria l'activitat del promotor perquè el FT GATA4 no reconeixeria la seqüència mutada i no s'hi uniria juntament amb altres FTs. Aquesta última hipòtesi és la que s'estudia en el marc pràctic.

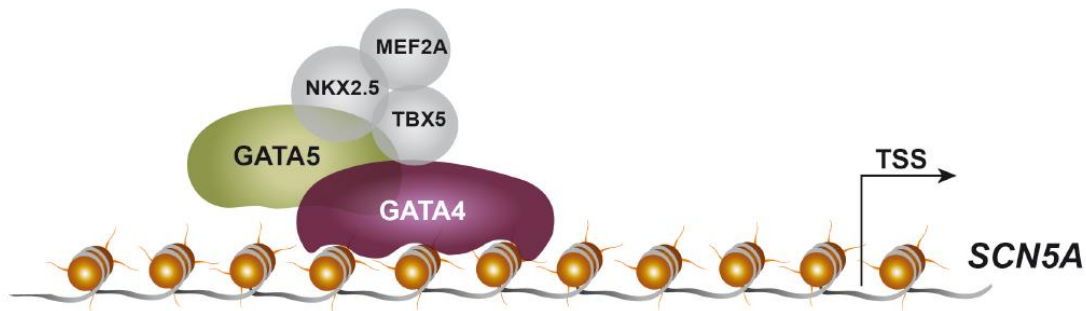


Figura 14: Representació de la unió del FT GATA4 en el gen *SCN5A*, a més d'altres FT cardíacs, formant un complex multiproteic per activar l'expressió del gen (Font: Tarradas, A., 2017)

MARC PRÀCTIC

7. PLANTEJAMENT DE LA RECERCA

Després de fer una recerca i amb els coneixements adquirits en el marc teòric, s'ha observat que l'intró 1 del gen *SCN5A* és una zona reguladora important. En la tesi l'Anna Tarradas al mateix laboratori de l'IDIBGI (Tarradas, A., 2017) es va observar, a través del “*TF Search*”²¹, que hi ha 11 regions de l'intró 1 del gen *SCN5A* que poden ser les possibles regions on s'uneixi el FT GATA4. Una variant en algun d'aquests llocs d'unió podria fer que GATA4 no reconegués la seqüència on ha d'unir-se, provocant un problema en l'expressió del gen. En un cas així, és possible que no s'iniciés la síntesi del Nav1.5, la proteïna codificada pel gen *SCN5A*, i no hi hauria suficient Nav1.5 a la membrana cel·lular per donar-se el PA cardíac correctament. Aquest fet suposaria una mala transmissió de l'impuls elèctric en el cor, donant lloc a la SBr i una possible MSC per fibril·lació ventricular. A partir d'això, i per assolir el primer objectiu, es va escollir l'intró 1 del gen *SCN5A* per dur a terme l'estudi genètic, ja que regula l'expressió del mateix gen i, per tant, està relacionat amb la transcripció del Nav1.5.

Per tal de complir amb el segon objectiu del treball, s'ha plantejat la seqüenciació del fragment inicial de l'intró 1 del gen *SCN5A*, on s'inclouen les 11 regions GATA-BS observades en la tesi doctoral de l'Anna (Tarradas, A., 2017), en deu pacients que s'han seleccionat per dur a terme l'estudi genètic. Aquests pacients pateixen SBr però no se'ls ha identificat una mutació causant de la malaltia en una regió codificant del gen *SCN5A* en estudis previs. Partint d'això, s'ha plantejat trobar alguna variant en aquestes regions reguladores del DNA d'aquests pacients en comparació amb la seqüència de referència.

Per poder portar a terme l'objectiu anterior i donar resposta a la meua hipòtesi inicial, en primer lloc caldrà dissenyar uns *primers* específics per la regió i, un cop al laboratori, caldrà realitzar varies preparacions seguint les tècniques d'investigació, que s'expliquen a continuació. Finalment, una vegada s'hagin obtingut les seqüències caldrà analitzar-les amb detall. En el cas de trobar una variant en alguna de les regions d'interès, caldria que se seguís estudiant per conèixer els efectes que pot tenir en l'expressió del gen.

²¹ El “*TF Search*” és la pàgina web utilitzada per l'Anna per seleccionar les 11 regions GATA-BS, ja que permet cercar les regions on els FT GATA tenen més afinitat per unir-se, amb la possibilitat de variar-ne dues bases per observar si augmenta o disminueix l'expressió gènica del gen *SCN5A*.

8. TÈCNIQUES D'INVESTIGACIÓ

Tots els protocols explicats en els següents apartats són els utilitzats durant la meva estada al laboratori IDIBGI, a l'Hospital Santa Caterina de Salt.

8.1. PCR

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

La PCR utilitza l'habilitat de la DNApol, un enzim capaç de sintetitzar una nova cadena de DNA complementaria a la cadena de DNA patró. La DNApol ja participa en la duplicació del DNA *in vivo* de les cèl·lules, però s'obté de manera sintètica per utilitzar-la en la PCR *in vitro* (Khan Academy, 2017). D'altra banda, ja que la DNApol només pot afegir nucleòtids al grup OH de l'extrem 3' d'una cadena preexistent, perquè la reacció pugui tenir lloc es necessita un encebador (o *primer*, en anglès, que serà el terme utilitzat a partir d'ara) específic, és a dir, un fragment complementari al DNA patró on es col·locarà la DNApol per afegir els nucleòtids. Aquest requisit fa possible que es pugui delimitar la regió específica del DNA patró que es vol seqüenciar, en el nostre cas tenim un total de 4 parells de *primers* dissenyats específicament pel fragment inicial de l'intró 1 del gen SCN5A. Concretament, els dos *primers* s'anomenen *forward*, encarregat de la replicació en direcció 5' a 3', i *reverse*, iniciador de la replicació en direcció 3' a 5'.

PROTOCOL DE PREPARACIÓ DE LA PCR

Per la realització de la PCR necessitem: Aigua lliure de nucleases, la DNApol, els *primers* d'interès, el DNA d'interès, dNTPs lliures²² i un tampó o *buffer* específic per tal que la reacció pugui tenir lloc.

En primer lloc es prepara la mix per la PCR amb H₂O lliure de nucleases i *Taq Promega*²³. La quantitat d'aquests reactius dependrà del nombre de “pous” (N) que faran falta, sempre

²² dNTPs lliures: Desoxinucleòtids trifosfat de les 4 bases nitrogenades (A, T, C, G). Són nucleòtids que presenten 3 grups fosfat per proporcionar l'energia per poder-se afegir a la cadena que s'està sintetitzant.

²³ *Taq Promega*: Preparació que conté la *Taq polimerasa* (la DNApol que més s'utilitza en PCRs), els desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs) de diferents bases nitrogenades (A, T, C, G) i un *buffer* específic.

contant-ne un de més per evitar que ens pugui faltar mix. Per cada “pou” es necessiten 6,25 µl d’H₂O i 4,25 µl de *Taq Promega*. En el cas que els *primers* no siguin gaire funcionals es pot afegir 0,6 µl de formamida²⁴ (HiDi) per cada “pou” del mix i, en aquest cas, cal reduir el volum d’aigua a 5,65 µl per “pou”. Un cop preparada la mix es divideix el volum total del contingut per el nombre de “pous” (N) que es necessiten. El resultat ha de ser 10,5 µl per tal que quan s’afegeix 1 µl de DNA del pacient i 1 µl del *primer* (*forward* + *reverse*) corresponent, el volum de la mostra sigui de 12,5 µl. Finalment es col·loca la placa²⁵ al termociclador utilitzant el programa PCR_60.

La reacció dins del termociclador consisteix en un cicle de canvis de temperatura:

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

Aquests tres passos formen un cicle que es repeteixen una sèrie de vegades, en el nostre cas són 40 cicles. L’amplificació és exponencial per a cada cicle, això significa que el DNA sintetitzat prèviament serveix com a motlle pels següents, i d’aquesta manera el nombre de molècules de DNA es duplica en cada cicle (Figura 14).

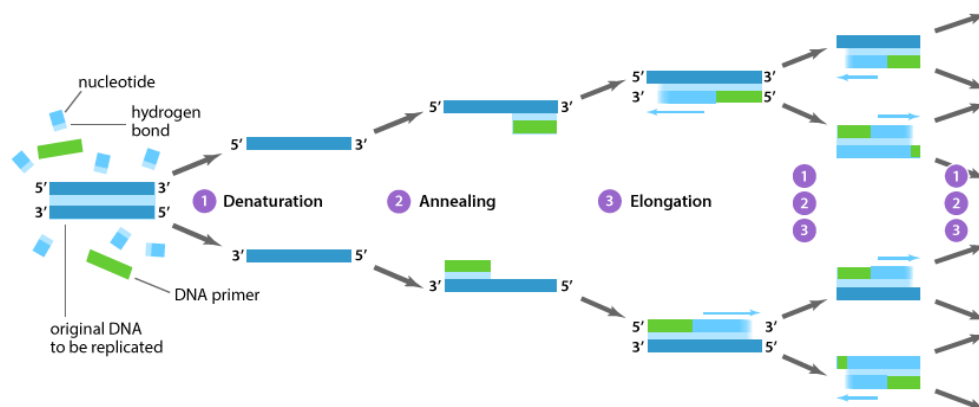


Figura 15: Representació esquemàtica de la reacció de la PCR que té lloc dins el termociclador, amb les tres fases que es duen a terme indicades. Després d’aquest primer cicle procedeix amb el següent, duplicant així el nombre de còpies del fragment d’interès (Font: Applied Biological Materials (ABM))

²⁴ La formamida (HiDi) s’utilitza per millorar el rendiment de la PCR ja que ajuda a estabilitzar l’estructura secundària del DNA, perquè si la cadena de DNA patró presenta moltes guanines/citosines es poden crear forts enllaços, provocant que el DNA no es desnaturalitzi i la DNAPol s’aturi.

²⁵ Les plaques consten de 96 pous en total.

8.2. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

L'electroforesi en gel d'agarosa s'utilitza per comprovar que els *primers* funcionen correctament i s'ha amplificat la regió del DNA abans de seguir endavant amb la seqüenciació. Es tracta d'una tècnica on la corrent elèctrica impulsa els fragments de DNA, o també altres macromolècules com RNA i proteïnes, a través de la matriu de gel fent que els fragments se separin segons la seva mida (Khan Academy, 2017). Els fragments de DNA presenten una càrrega negativa i, per tant, es desplacen des del pol negatiu fins al positiu. Així doncs, els fragments més petits travessen més ràpid el gel i els fragments de la mateixa longitud formen una “banda” que, com que el gel conté el marcador de DNA *midori green*²⁶, es pot visualitzar a través d'un equip específic per veure amb llum UV i obtenir-ne una fotografia.

PROTOCOL DE PREPARACIÓ DEL GEL D'AGAROSA

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

- Afegir 40ml de TBE i 0,48g d'agarosa en un pot de vidre.
- Escalfar la mescla al microones just fins el moment en què comença a bullir, d'aquesta manera ens assegurem que l'agarosa s'ha dissolt completament.
- Deixar refredar el pot de vidre dins d'aigua mentre es barreja el contingut amb l'ajuda d'un agitador magnètic.
- Afegir 1µl de *midori green*, un marcador que es col·loca entre les bases nitrogenades del DNA.
- Abocar la preparació a la cubeta petita amb la reixa que deixarà els forats per a 11 “pous”.
- Esperar 15 minuts mentre el gel solidifica. Es pot comprovar quan està apunt tocant una vora amb una punta de pipeta i veient que aquesta no s'enfonsa.

PROTOCOL PER CARREGAR LES MOSTRES AL GEL

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

²⁶ El *midori green* és un fluorocrom que s'afegeix als gels d'agarosa per poder visualitzar els àcids nucleics. Això és possible ja que es col·loca entre les bases nitrogenades del DNA, i per aquest motiu es tracta d'un reactiu mutagen.

- Treure la reixa i col·locar el gel a l'aparell d'electroforesi.
- Per cada mostra, afegir 2µl de marcador *loading buffer* sobre paper de *parafilm*.
- Agafar 4µl de la mostra obtinguda de la PCR i barrejar amb el *loading buffer* amb l'ajuda de la pipeta, procurant que no es formin bombolles d'aire.
- Col·locar els 6µl de preparació dins dels “pous” del gel amb molt de compte i a poc a poc, intentant arribar al fons i que no s'escapi mostra.
- Repetir el procés anterior amb cada un dels “pous” de la placa de la PCR.
- Tapar l'aparell d'electroforesi i programar-lo amb un voltatge de 130V durant uns 10-15 minuts.

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

8.3. EXOSAP

L'*Exosap* és una tècnica utilitzada per netejar el producte obtingut després de la PCR, ja que elimina els fragments petits que ja no necessitem, com per exemple els *primers* i els dNTPs restants. Els avantatges d'aquest mètode són que, en primer lloc, només tarda 30 minuts per fer la purificació dels productes de PCR i presenta un 100% de recuperació i purificació dels productes menors de 100 pb i majors a 20 pb, sense perdre mostra ni haver d'utilitzar altres tècniques per completar el procés.

PROTOCOL DE PREPARACIÓ DE L'EXOSAP

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

8.4. BIGDYE

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

PROTOCOL DE PREPARACIÓ DE LA REACCIÓ DE *BIGDYE*

Primer es prepara la mix per la reacció de *BigDye* amb H₂O lliure de nucleases, *BigDye* i *buffer*. La quantitat dels reactius dependrà del nombre de “pous” (N) que utilitzem a la placa, sempre és millor contar-ne un de més per evitar que ens pugui faltar mix. Per cada “pou” es necessiten 1,25µl d'H₂O, 0,75µl de *buffer* i 0,5µl de *BigDye*, i un cop la mix està preparada dividim el volum total pel nombre de “pous” (N) que necessitem. Aquest resultat ha de ser 2,5µl per cada un dels “pous”. Llavors s'afegeix 1µl de la mostra de DNA obtinguda de l'*Exosap* i 0,5µl del *primer* corresponent, ja sigui *forward* o bé *reverse* per separat, segons la planificació de la placa que fem prèviament a la preparació. Així doncs, el volum final de mostra a cada “pou” és de 4µl. Per últim, la placa es col·loca al termociclador seleccionant el programa *BIGDYE*.

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

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

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

8.5. PRECIPITACIÓ

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

PROTOCOL PER LA PRECIPITACIÓ

- Afegir 80µl d'etanol acetat (guardat a la nevera a 4°C) a cada “pou”.
- Tapar la placa amb film transparent i deixar reposar durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar la placa a 2000rpm durant 45 minuts.
- Retirar el líquid restant amb un cop sec a la pica.
- Col·locar la placa boca avall sobre un paper absorbent i centrifugar amb un *spin* (tant sols 5 o 6 segons fins arribar a les 1000rpm).
- Deixar assecar la placa durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Tapar la placa amb film transparent i centrifugar a 2000rpm durant 10 minuts.
- Afegir 150µl d'etanol 70% a cada “pou”.
- Retirar el líquid restant amb un cop sec a la pica.
- Col·locar la placa boca avall sobre paper absorbent i centrifugar un *spin*.
- Deixar assecar la placa durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 10µl de formamida (guardada a -20°C) a tots els “pous” fins a completar la columna, encara que estiguin buits. El nombre de columnes plenes sempre ha de ser parell perquè el seqüenciador té 16 capil·lars.
- Posar la tapa de silicona especial pel seqüenciador a la placa i fer un *spin*.
- Incubar la placa al termociclador utilitzant el programa INCUBATION_95 sense tancar la tapa. El programa té una durada de 7 minuts a 95°C de temperatura.

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

8.6. SEQÜENCIACIÓ SANGER

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

En el seqüenciador, els fragments de DNA passen a través dels capil·lars i, mitjançant un procés d'electroforesi, s'il·luminen amb un làser que detecta el pigment fluorescent dels nucleòtids i, per tant, ens permet determinar de quina base es tracta. El fragment més petit, que acaba just en un nucleòtid després del *primer*, serà el primer en passar pel làser, seguit pel pròxim fragment més petit, de dos nucleòtids després del *primer*, i així successivament. D'aquesta manera es pot conèixer la seqüència nucleòtid a nucleòtid (Khan Academy, 2017). Les dades obtingudes es mostren a través d'una sèrie de pics en el cromatograma (Figura 15).

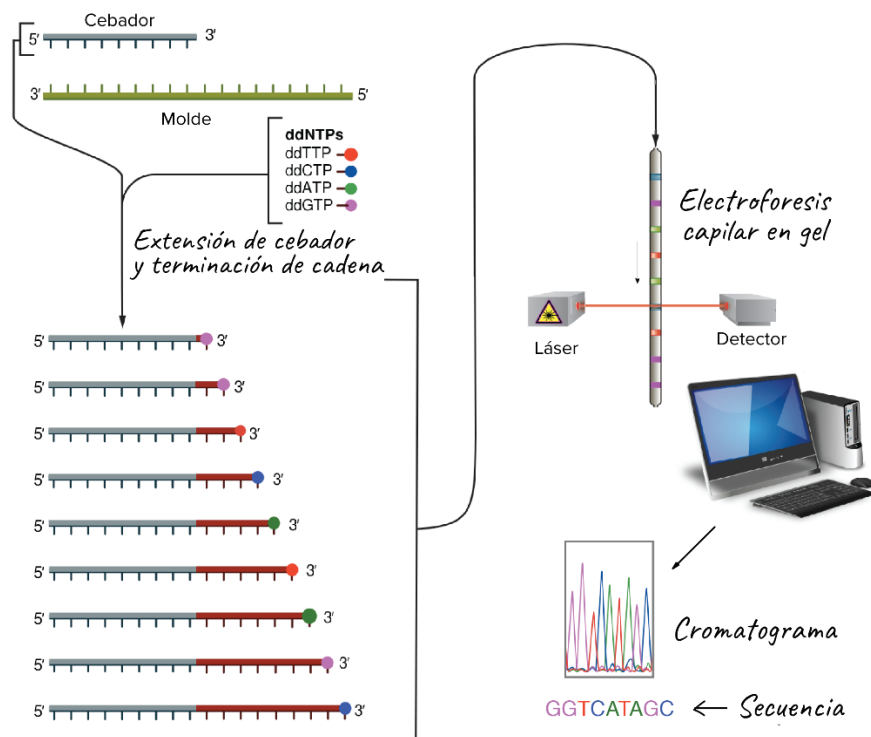


Figura 16: Esquema de la seqüenciació Sanger. A la banda esquerra es mostra el resultat després de la reacció de la *Bigdye*, quan s'obtenen fragments del DNA d'interès de diferents mides gràcies als ddNTPs que actuen com a terminadors de cadena. A la banda dreta es mostra el procés que té lloc dins el seqüenciador, la lectura nucleòtid a nucleòtid del làser fins a obtenir la seqüència completa

(Font: Khan Academy)

9. PROGRAMES D'ANÀLISI I BASES DE DADES

9.1. PRIMER3

Primer3 és una pàgina web que permet dissenyar *primers* específics per posteriorment poder seqüenciar una regió d'interès del DNA. Automàticament, després de seleccionar una sèrie de paràmetres, el *primer3* ofereix una seqüència que compleix les característiques adequades per tal que sigui el màxim d'específic possible, tant en el *primer forward* com en el *reverse*. Aquestes característiques són: llargada d'unes 20 bases aproximadament, un contingut de CG no molt alt i que no tinguin afinitat per cap altre lloc de la cadena. S'hi pot accedir en línia gratuïtament a través de: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.

9.2. SEQUENCING ANALYSIS

Sequencing Analysis és un programa informàtic que permet editar i analitzar les dades de la seqüència de DNA obtinguda. Diem que hem obtingut una seqüència “neta”, quan presenta tots els pics clars i ben definits. En canvi, parlem de seqüència “bruta” quan presenta pics anòmals que dificulten la lectura correcta de les bases, degut per exemple a la presència d'impureses o un mal funcionament de la DNAPol (Figura 16).

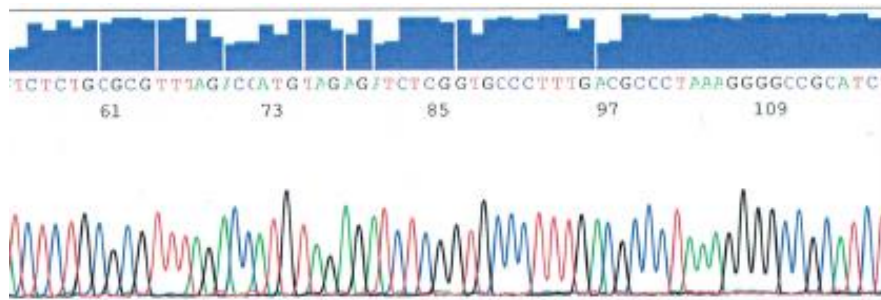


Figura 17: Cromatograma obtingut a través del *Sequencing Analysis*. En la imatge es mostra un fragment de la seqüència obtinguda amb el *primer reverse* del pacient RB12589 (Imatge pròpia)

9.3. SEQSCAPE

El programa *SeqScape* s'utilitza per comparar les seqüències de DNA obtingudes dels nostres pacients amb les seqüències del genoma de referència i, per tant, permet identificar-hi variants d'un sol nucleòtid, també anomenades SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Un cop s'han entrat les dades, és a dir, la seqüència de DNA de

referència i la seqüència a analitzar, el mateix programa s'encarrega d'alinear-les i fer-ne la comparació automàticament. A més a més, ofereix un munt d'eines per tal de facilitar la feina de l'investigador, ja que ens permet visualitzar els trams d'interès i ens indica els punts on apareixen les variants (Veure la figura 23 com a exemple).

9.4. *ENSEMBL GRCh37*

Ensembl GRCh37 és un projecte iniciat l'any 1999 amb l'objectiu de crear una base de dades i recollir el màxim nombre possible de genomes d'individus vertebrats i altres espècies eucariotes, fent que aquesta informació estigui disponible en línia gratuïtament, a través de la pàgina web: <https://grch37.ensembl.org/index.html>. En aquesta pàgina s'ha obtingut la seqüència consens de l'intró 1 del *SCN5A*, així s'ha pogut comparar la seqüència obtinguda al laboratori amb la consens publicada per observar les variants.

9.5. dbSNP

Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) és una base de dades pública on es recullen totes les variacions genètiques identificades perquè puguin ser utilitzades en la investigació. La informació està disponible en línia gratuïtament a través de la pàgina web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>. Aquesta base de dades s'ha consultat per buscar variacions ja publicades en les regions estudiades (veure l'apartat 11.3).

9.6. “1000 GENOMES PROJECT”

1000 genomes project és un projecte que va transcórrer entre el 2008 i el 2015 amb l'objectiu de crear la major base de dades de variacions i genotips humans, per tal de recollir les variants genètiques amb freqüències d'almenys un 1% en les poblacions estudiades. Aprofitant l'evolució de la seqüenciació, es van seqüenciar de 2504 individus i les dades obtingudes varen posar-se a bases de dades públiques a disposició de la comunitat científica mundial. La pàgina web oficial del projecte és: <http://www.internationalgenome.org/>.

10. PROCEDIMENT AL LABORATORI

10.1. DISSENY DELS PRIMERS

Primer de tot, s'agafa com a seqüència de referència el fragment inicial de l'intró 1 del gen SCN5A humà que proporciona la base de dades online anomenada *Ensembl*, on es troben un total d'onze llocs d'unió pels FT GATA, anomenats GATA-BS. Es dissenyen uns *primers* específics per aquesta regió per tal que ajudin la DNApol en la replicació del fragment d'interès i no un altre fragment del DNA. Pel disseny dels *primers* s'utilitza la pagina web *primer3*.

En primer lloc, es busca la seqüència d'interès a l'*Ensembl* i se selecciona la regió on es vol dissenyar a 5', és a dir, la regió del *primer forward*. Es còpia la regió al *primer3* i se seleccionen una sèrie de paràmetres segons com volem que sigui el *primer*: es deixa seleccionada l'opció "*Pick left primer, or use left primer below*" i es posa "2" a l'opció "*CG Clamp*". Llavors se selecciona la regió on es vol dissenyar el *primer reverse*, i en aquest cas es deixa seleccionada l'opció "*Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)*". El mateix *primer3* s'encarrega de trobar una regió que considera que té les característiques adequades per utilitzar-se com a *primer*. En el nostre cas, ens interessa tenir 4 parells de *primers* per seqüenciar una part de l'intró 1. Preferiblement, es vol que cada un d'ells seqüenciï un fragment amb un nombre de pb semblant i s'incloguin el mateix nombre de regions GATA-BS sense que quedin tallades.

10.2. HIDRATAR ELS PRIMERS

Després de fer la comanda, arriben els 4 parells de *primers* amb les seqüències *forward* i *reverse*, així doncs es tenen un total de 8 tubs *epENDORF*, dos per cada *primer*.

En primer lloc, cal hidratar-los i dissoldre'ls en 50% H₂O/TE a una concentració de 100µM per poder-los utilitzar. Es prepara una dissolució amb 5ml de TE i 5ml d'H₂O en un tub *epENDORF* i es fa un *spin* a la centrífuga perquè es barregin els dos components uniformement. El volum d'aquesta dissolució que s'ha d'afegir per hidratar cada un dels *primers* variarà en funció de la seva concentració (nmol), que apareix indicada en el mateix full de la comanda i juntament amb el volum (µl) de la dissolució 50% TE i 50% H₂O que hem d'afegir (Taula 1). Amb la pipeta adequada segons el volum, s'agafen les

quantitats de la dissolució i s'afegeixen als diferents tubs *eppendorf*, canviant en cada cas la punta de la pipeta per tal de no barrejar els *primers* entre ells.

	CONCENTRACIÓ (nmol)	VOLUM DSÓ (μl)
SCN5A Intró1 1fw	26,4	264
SCN5A Intró1 1rv	17,1	171
SCN5A Intró1 2fw	23,9	239
SCN5A Intró1 2rv	24,8	248
SCN5A Intró1 3fw	28,7	287
SCN5A Intró1 3rv	22,3	223
SCN5A Intró1 4fw	21,7	217
SCN5A Intró1 4rv	25,3	253

Taula 1: Taula amb la concentració dels diferents *primers* i el volum de la dissolució (50% TE i 50% aigua) que cal afegir per fer la preparació, segons cada *primer*

10.3. PREPARACIÓ DELS PRIMERS

Una vegada es tenen els *primers* hidratats a una concentració “estoc”, es preparen les dilucions necessàries que s'utilitzaran en les reaccions de PCR.

D'una banda, es preparen 4 tubs *eppendorf*, un per a cada parell de *primers*, a una concentració de 20μM. Aquests tubs contenen 40μl d'H₂O amb 5μl de *primer forward* i 5μl de *primer reverse* que s'han hidratat anteriorment. D'altra banda, també es preparen 8 tubs *eppendorf* a una concentració de 10μM que només contindran un sol *primer*, *forward* o *reverse*. En aquest cas s'afegeix 45μl d'H₂O i 5μl del *primer* corresponent en cada cas.

Tots els tubs *eppendorf* es marquen prèviament amb el nom del *primer* i la concentració de la mostra que contenen. Les preparacions es guarden al congelador per mantenir-les i poder-les utilitzar quan sigui necessari.

10.4. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES DELS PACIENTS

S'han escollit deu pacients que pateixen SBr però no se'ls ha trobat la mutació causant de la malaltia en cap exó del gen SCN5A. Les mostres originals de DNA d'aquests pacients

es guarden en tubs *ependorf* dins el congelador a -80°C . La taula amb el registre de les dades dels deu pacients es troba a l'apartat d'annexes (Annex II).

Primer de tot es necessita conèixer la concentració de DNA de les mostres dels pacients. Mitjançant un aparell anomenat *Nanodrop*, s'agafa $1\mu\text{l}$ de cada mostra amb la pipeta i es col·loca a la punta de l'aparell, aquest ens indicarà la concentració de DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) a la pantalla de l'ordinador. Cal netejar el *Nanodrop* amb aigua cada vegada que s'utilitza per eliminar les restes dels primers anteriors. A partir de les concentracions obtingudes es calcula el volum de mostra i el volum d' H_2O que es necessita per preparar tots els DNAs en un volum de $50\mu\text{l}$ i una concentració de $20\text{ng}/\mu\text{l}$. Els càlculs a seguir són:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f \quad 50\mu\text{l} \times 20\text{ng}/\mu\text{l} = V_f \times C_f \quad V_f = \frac{50 \times 20}{C_f}$$

En els càlculs s'indica la concentració i el volum que volem obtenir. La C_f se substitueix per la concentració de les mostres de DNA que s'han obtingut a partir del *Nanodrop*. El resultat que obtenim, la V_f , indica el volum de la mostra del pacient que es necessita. Per calcular el volum d' H_2O només cal restar 50 menys el volum de la mostra obtingut anteriorment (Taula 2).

La preparació es fa en tubs *ependorf* que cal retolar amb el número del pacient i la concentració ($\text{ng}/\mu\text{l}$) final de la mostra. Es guarden al congelador per mantenir-los i poder-los utilitzar quan sigui necessari.

Codi dels pacients SBr	Concentració ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Volum mostra (μl)	Volum H_2O (μl)
RB12146	117,8	8,48	41,52
RB12589	71,7	13,94	36,06
RB12660	95,8	10,43	39,57
RB12685	90,9	11	39
RB12790	116,2	8,6	41,4
RB12809	171,1	5,84	44,16
RB12815	179,4	5,57	44,4
RB13079	68,3	14,64	35,36
RB13152	181,4	5,51	44,49
RB15304	175,6	5,69	44,31

Taula 2: Taula amb els codis dels pacients i la concentració de les seves mostres de DNA. També mostra el volum d' H_2O i de mostra de DNA que cal afegir per fer la preparació en cada cas.

10.5. SEQÜENCIACIÓ

A partir d'aquí ja es pot seqüenciar el fragment d'interès de l'intró 1 del gen *SCN5A* dels deu pacients. No es fan tots a la vegada sinó que es comença pels dos primers, per comprovar que els *primers* funcionen correctament i que la seqüenciació dóna bons resultats. A continuació es procedeix amb la resta de pacients. Un cop obtingudes les seqüències es podrà estudiar si els afectats per la malaltia presenten una variació a l'intró, i especialment fixar-se sobretot en les regions GATA-BS.

Es comença preparant la PCR per amplificar la regió d'interès del DNA. A partir de les dades del protocol, explicat anteriorment, es fan els càlculs segons el nombre de “pous” per trobar les quantitats de H₂O i *Taq Promega* per preparar la dissolució mix en un tub *eppendorf*. Es reparteix la mix en 10,5µl per cada “pou” i s'afegeixen les mostres de DNA dels pacients i els *primers* que contenen *forward* i *reverse* (Concentració: 10µM), ambdós en un volum de 1µl (Taula 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B					Control -							
C					12146 Intró 1/1	12589 Intró 1/1						
D					12146 Intró 1/2	12589 Intró 1/2						
E					12146 Intró 1/3	12589 Intró 1/3						
F					12146 Intró 1/4	12589 Intró 1/4						
G												
H												

Taula 3: Exemple de taula de la primera PCR. Es distribueixen els “pous” on es col·loca el DNA dels pacients RB12146 i RB12589 amb els 4 *primers*, a més a més del “pou” sense DNA que servirà de control.

Finalment, es tapa la placa amb una làmina d'alumini adhesiva procurant que quedi ben enganxada, sobretot la part dels voltants ja que amb les altes temperatures podria evaporar-se el contingut. La placa es porta al termociclador, on seleccionem el programa ja establert anomenat PCR_60, que segueix els cicles de temperatures explicats en la teoria, i s'espera aproximadament una hora i mitja a que finalitzi per retirar la placa i guardar-la a la nevera.

Un cop acabada la PCR es vol comprovar si els *primers* han funcionat correctament i s'ha produït l'amplificació del fragment d'interès. Per això cal preparar un gel d'agarosa on, a través d'electroforesi, es podrà observar el gradient de DNA de les mostres obtingudes. El gel es prepara a partir de TBE, agarosa i *midori green*, seguint el procés i les quantitats del protocol. Un cop el gel ha solidificat es carrega amb 2µl de *loading buffer* i 4µl de les mostres obtingudes a la PCR amb molt de compte i a poc a poc, intentant no perdre els 6µl de mostra total (Figura 17). Es programa l'aparell d'electroforesi amb un voltatge de 130V per deixar-lo entre 10 i 15 minuts. Finalment, amb l'aparell que emet llum ultraviolada s'obté una fotografia com la següent (Figura 18):

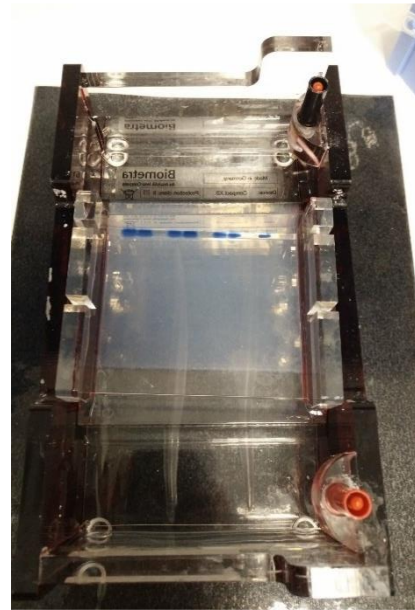


Figura 18: Imatge de l'aparell d'electroforesi mentre es carrega el gel d'agarosa amb les mostres, marcades amb el *loading buffer* (Imatge pròpia al IDIBGI)

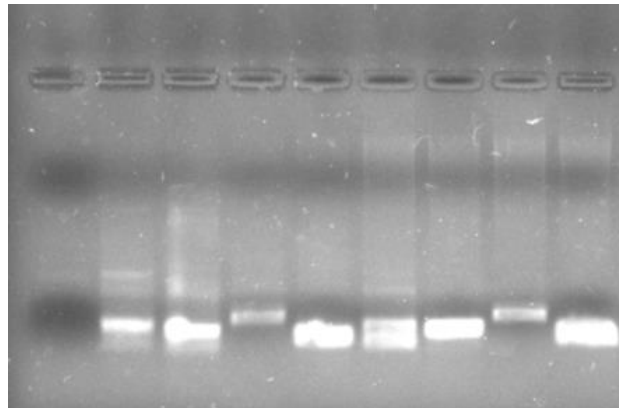


Figura 19: Resultats obtinguts en la primera PCR per comprovar el funcionament dels *primers* nous (Imatge pròpia al IDIBGI)

En el primer “pou” de la imatge no s’observa cap banda ja que es tracta del control negatiu i, per tant, la mostra no contenia els *primers*. Els quatre “pous” següents contenen les mostres dels 4 *primers* del pacient RB12146, els altres quatre “pous” contenen les mostres dels 4 *primers* del pacient RB12589. S’observen les bandes ben definides en la majoria dels casos, però en el *primer* número 1 d’ambdós pacients s’intueix una doble banda que podria indicar un mal funcionament del *primer* i, a partir d’això, es planteja afegir formamida en la següent PCR.

El següent pas és dur a terme l'*Exosap*, afegint 2,5µl de la preparació resultant de la PCR i 1µl d'*Exosap* en una placa nova i retolada. Ara ja no cal el “pou” de control. Es pot centrifugar amb un *spin* ràpid si es veu que ha quedat mostra a la paret d'algun “pou”. Al termociclador se selecciona el programa anomenat EXOSAP (Taula 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C					12146 Intró 1/1	12589 Intró 1/1						
D					12146 Intró 1/2	12589 Intró 1/2						
E					12146 Intró 1/3	12589 Intró 1/3						
F					12146 Intró 1/4	12589 Intró 1/4						
G												
H												

Taula 4: Exemple de taula del primer *Exosap* amb la distribució dels diferents “pous” segons les mostres obtingudes de la PCR anterior (Pacients: RB12146 i RB12589)

Un cop ha finalitzat el termociclador, es pot treure la placa i preparar la reacció de *BigDye*. Primer es prepara la mix amb H₂O, *buffer* i *BigDye* amb les quantitats esmentades al protocol segons el nombre de “pous” que es necessiten. Es reparteix la mix en 2,5µl per a cada “pou” i s'afegeix 1µl de la preparació de DNA resultant de l'*Exosap* anterior i 0,5µl del *primer* corresponent en cada cas (Taula 5). Així doncs, cal anar amb compte a l'hora de col·locar totes les mostres. Com que aquestes tenen un volum molt petit, és millor deixar-les al fons del “pou” per assegurar que s'afegeixen correctament i no es perden a la paret.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	12146 Intró 1/1 FW	12589 Intró 1/1 FW										
B	12146 Intró 1/2 FW	12589 Intró 1/2 FW										
C	12146 Intró 1/3 FW	12589 Intró 1/3 FW										
D	12146 Intró 1/4 FW	12589 Intró 1/4 FW										
E	12146 Intró 1/1 RV	12589 Intró 1/1 RV										
F	12146 Intró 1/2 RV	12589 Intró 1/2 RV										
G	12146 Intró 1/3 RV	12589 Intró 1/3 RV										
H	12146 Intró 1/4 RV	12589 Intró 1/4 RV										

Taula 5: Exemple de taula de la primera reacció de *BigDye*. Es distribueixen els “pous” segons continguin els *primers forward* o *reverse* dels dos pacients RB12146 i RB12589.

Una vegada finalitzada la reacció de *BigDye*, es precipiten les mostres seguint el protocol esmentat en l'apartat de les tècniques d'investigació. Durant la precipitació, mentre la placa es troba a la centrífuga, s'entren les dades del contingut de cada "pou" a l'ordinador del seqüenciador. En cada cas s'indica el número del pacient, el gen, l'intró, el *primer* i si es tracta del *forward* o del *reverse*. Així doncs, el primer "pou" de la placa d'exemple queda registrat de la manera següent: 12146_SCN5A_Intro1_1fw. També cal seleccionar els paràmetres per indicar el programa que es vol utilitzar: Secuenciacion - Ultra - Secuenciacion BDv3. Un cop la precipitació ha finalitzat, es pot introduir la placa al seqüenciador.

Un cop la seqüenciació ha acabat ja es poden recollir les seqüències. Es comprova el resultat utilitzant el programa *Sequencing Analysis* per veure si la seqüència ha sortit neta, és a dir, que els pics no se sobreposen els uns amb els altres i han quedat ben definits. Llavors es crea un nou projecte al programa *SeqScape* que ens servirà per identificar les possibles variacions en les seqüències dels nostres pacients. S'utilitza com a plantilla per la comparació el fragment de l'intró 1 del gen *SCN5A* obtingut de l'*Ensembl*. Per facilitar la feina, es crea un projecte on apareix tot el fragment de l'intró 1 però també es fa un segon projecte on només apareixen els GATA-BS, i d'aquesta manera es poden estudiar aquestes regions més detalladament.

11. RESULTATS

Després de tots els processos duts a terme al laboratori i explicats anteriorment, es va acabar obtenint la seqüència completa de la nostra regió d'interès dels deu pacients i és el moment d'estudiar-la a través de l'ordinador.

11.1. VARIACIONS DESCARTADES

Primer es realitza una visualització general de tot el fragment per observar les anomalies que marca el *SeqScape*. Un cop revisades, es considera que no es tracten de variacions, ja que es troben en el punt on un *primer* acaba i es produeix el canvi amb el següent *primer*, i per tant s'hi poden trobar algunes impureses quan s'observen els pics. La resta de la seqüència està completament neta, és a dir, no s'observa cap variació amb la seqüència del DNA patró (Figura 19).

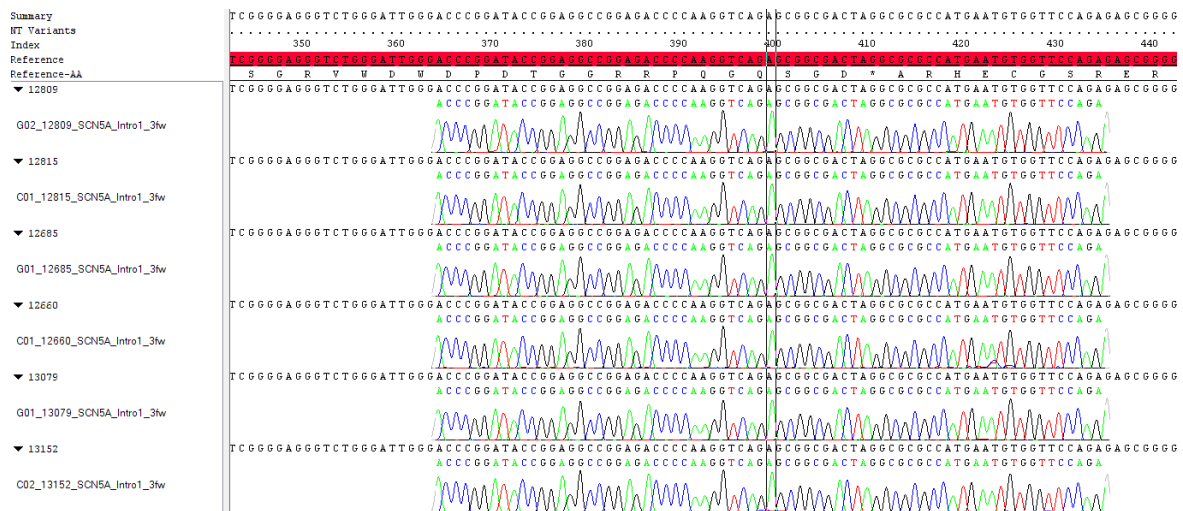


Figura 20: Cromatograma d'un fragment de les seqüències de DNA, vist a través del programa *SeqScape*. Les seqüències pertanyen als pacients: RB12809, RB12815, RB12685, RB12660, RB13079 i RB13152. Totes elles s'han obtingut a través del *primer 3 forward* (Imatge pròpia)

Un fet a destacar és que, quan s'estudiava la seqüència al complet, apareixien dues variacions en el mateix punt en dos dels pacients, RB12146 i RB1589. En aquest cas no es tractava d'una regió de canvi de *primer* i els dos pics de la seqüència es podien veure amb claredat. En ambdós casos es produïa el canvi d'una guanina (marcada per un pic de color negre) per una timina (marcada per un pic de color vermell) (Figura 20). Així doncs, en aquest cas sí podria haver-se tractat d'una variant, però analitzant la resta de pacients vam observar que aquesta anomalia es produïa en tots ells en el cas del *primer 2 reverse*, mentre que la seqüència obtinguda pel *primer 2 forward* era correcte. Per aquest motiu el

programa *SeqScape* no ho reconeixia com una variant, ja que només es troba en una de les dues seqüències, i tant sols ens ho indica amb un petit punt vermell. Les dues hipòtesis principals d'aquest fet serien un error de la DNAPol o un problema del *primer 2 reverse*.

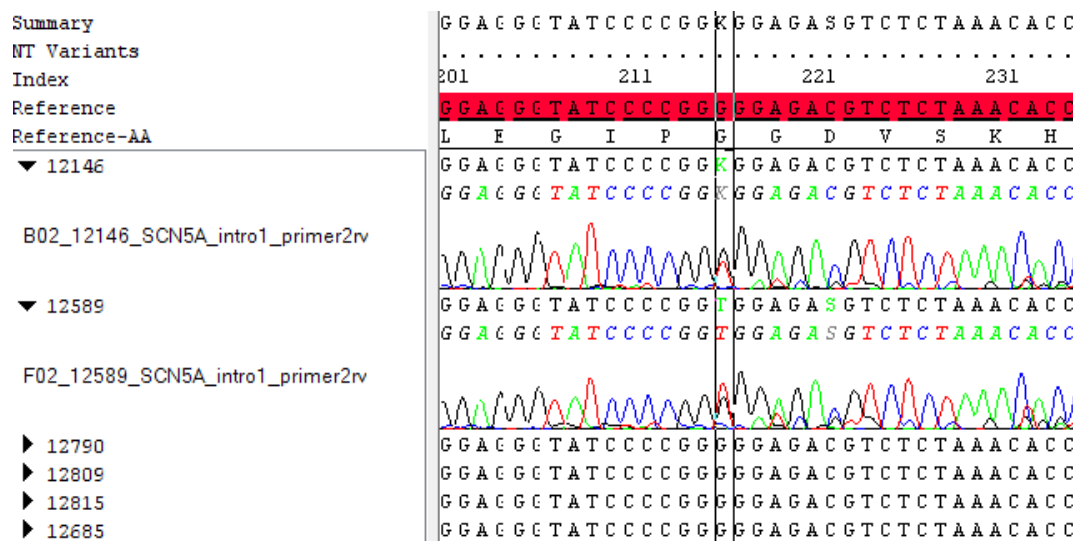


Figura 21: Cromatograma on apareix marcada la possible variant. La identifiquem gràcies als dos pics de diferent color que apareixen, en vermell la timina i en negre la guanina, i també perquè la base que presenten no coincideix amb la seqüència de referència (marcada de color vermell a la part superior) (Imatge pròpia)

11.2. CAP MUTACIÓ IDENTIFICADA A LES REGIONS D'INTERÈS DELS 10 PACIENTS

Posteriorment s'estudien les onze regions GATA-BS que es troben en el nostre fragment de l'intró 1. A la següent figura es pot observar un exemple de cadascuna de les 11 regions escollides. Després d'analitzar els resultats obtinguts en una seqüència *forward* i una *reverse* de cada pacient, no s'ha trobat cap mutació en aquestes regions en cap d'ells (Figura 21).

GATA-BS 1 Pacient RB12790 <i>Primer 1rv</i>	GATA-BS 2 Pacient RB12809 <i>Primer 2rv i primer 1fw</i>	GATA-BS 3 Pacient RB12790 <i>Primer 2rv i primer 1fw</i>
GATA-BS 4 Pacient RB12815 <i>Primer 2fw i primer 3fw</i>	GATA-BS 5 Pacient RB12146 <i>Primer 3rv i primer 3fw</i>	GATA-BS 6 Pacient RB12589 <i>Primer 3rv i primer 3fw</i>
GATA-BS 7 Pacient RB12146 <i>Primer 3rv i primer 3fw</i>	GATA-BS 8 Pacient RB12809 <i>Primer 3fw i primer 4rv</i>	GATA-BS 9 Pacient RB12790 <i>Primer 3fw i primer 4rv</i>
GATA-BS 10 Pacient RB12809 <i>Primer 4fw</i>	GATA-BS 11 Pacient RB12146 <i>Primer 4fw</i>	

Figura 22: Seqüències dels 11 GATA-BS de l'intró 1 obtingudes en els pacients indicats. La seqüència de referència es mostra en blau, i la seqüència del pacient obtinguda al laboratori en blau. En tots els casos les seqüències de referència i dels pacients coincideixen i, per tant, no hi ha cap variació (Composició pròpia)

11.3. CERCA DE VARIANTS A LES REGIONS ESTUDIADES A LES BASES DE DADES PÚBLIQUES

Després d'observar que les seqüències dels deu pacients no presentaven cap variant en la nostra regió d'interès que pogués ser la causant de la SBr, vàrem decidir consultar la base de dades del *1000 genomes project*, que es recull al *dbSNP*. Es van identificar dues variants en les regions GATA-BS de l'intró 1 del gen *SCN5A*, registrades amb el nom de rs369277258 i rs530854013 (Taula 6).

	Canvi	Població	Regió GATA-BS	Seqüència
rs369277258	T → C	-	GATA-BS 1	5' cccgatc <u>a</u> gt3'
rs530854013	G → A	Sud asiàtic (Bangladesh i Pakistan) 2/2504 pers. (dones) Freqüència: 0,001	GATA-BS 10	5' ccgcatct <u>c</u> ct3'

Taula 6: Taula amb la descripció de les dues variants identificades en regions GATA-BS de l'intró 1 del gen *SCN5A*, que es troben registrades al *dbSNP*.

Tal com indica la taula anterior, la variant rs369277258 consisteix en un canvi d'una timina per una citosina i es produeix en la regió GATA-BS 1, mentre que la variant rs530854013 consisteix en un canvi d'una guanina per una adenina i es troba en la regió GATA-BS 10 (Figura 22). En aquest segon cas també tenim informació sobre la procedència de les dues persones que presenten la variant d'un total de 2504 persones estudiades, per tant la freqüència en que es dona aquesta variant és de 0,001. Ambdós pacients afectats per la mutació són dones i procedeixen de països del sud asiàtic (Bangladesh i Pakistan). En cap dels dos casos, però, s'han dut a terme estudis que confirmin quin efecte tenen en l'expressió del gen, ni tampoc es coneix si aquests individus afectats estan diagnosticats o no de SBr.

gtgagcgagtgccccgcgcgcggcagccctggccggcgcgagccccctcgctgcg
ccgcccactttctccccgagggccgaagcctccagtcctcggtgctctccctgcc
cgggtccgcccagccgctccctcccgatcagtgccccagagagccggagggggagaagg
ggcgcagatccgcccggctggaagggtatcccgggggagacgtctctaaacacgtg
cccccttcccttcccttcccttcccggttcccggtgcgctgcgagggccggggagg
ggagctgcggccccagcttcccgccatccctggcgcaggtccggggagggtctggatt
gggacccggataccggaggccggagacccaaggtcagagcggcgactaggpccgcca
aatgtggttccagagagcggggttgcgggggtgaccgagcaggctcggtatgggga
ggaagccacgcacccctttctctggggccagggggagaccgcctcggtgggctgctct
ctgtggagcagatctctgcgcgttagaccatgtagagatctcggtgccttgacgc
ctaaaggggcccgcattcctctgtctgtatctctgtcttctgaaggggtggagatctct

Figura 23: Seqüència de referència del fragment inicial de l'intró 1 obtinguda de l'*Ensembl* que s'ha seqüenciat al laboratori per dur a terme la recerca. S'hi inclouen les 11 regions GATA-BS i també la posició on es produeixen les dues variants (rs369277258 i rs530854013), marcades de color vermell (Font: TD A. Tarradas)

12. DISCUSSIÓ

Responent a la pregunta de recerca inicial, “Per què un percentatge elevat dels pacients amb SBr no se’ls hi troba la mutació genètica causant de la malaltia?”, podem pensar que és perquè la mutació no es troba en regions exòniques del DNA, les més estudiades actualment, sinó que podria trobar-se en una regió intrònica que encara no ha estat estudiada amb tant detall.

A l’intró 1 del gen *SCN5A*, el principal gen patogen de la SBr, s’hi troben les zones d’unió del FT GATA4 que són molt importants per la transcripció. Tal com s’explica en el plantejament, el FT GATA4 té un paper essencial en la regulació transcripcional cardíaca, per tant, en el cas que no reconeguéssim la seqüència específica dels GATA-BS, perquè aquestes regions contenen una variant, el FT GATA4 no s’hi uniria. Aquest fet provocaria un mal funcionament de la transcripció cardíaca afectant en l’activació de l’expressió del gen *SCN5A*. A l’article de l’Anna Tarradas es confirma que els FT GATA4 i GATA5 activen el promotor del gen *SCN5A* després d’observar una relació entre els nivells de transcripció del FT GATA4 i del *SCN5A* en el cor (Tarradas, A., et al. 2017).

De totes maneres, al final del procés de seqüenciació del fragment inicial de l’intró 1 del gen *SCN5A* en deu pacients que pateixen SBr, però sense mutació trobada prèviament en els gens associats a la malaltia, no s’ha identificat cap variant en la regió estudiada que pugui ser la causant. Així doncs, tant les regions GATA-BS com el fragment sencer de l’intró 1 es troben “nets” en aquests pacients i concorden perfectament amb la seqüència del DNA de referència.

Amb tot això es poden plantejar tres hipòtesis sobre la causa dels resultats:

La primera hipòtesi i un fet a tenir en compte és que aquests deu pacients són una mostra molt petita i, per tant, seria convenient que en estudis posteriors es pogués augmentar la població d’estudi, ja sigui per confirmar els resultats obtinguts en aquest treball, o bé per seguir buscant possibles variants causants de la malaltia. Actualment, el procés de seqüenciació es pot realitzar de forma massiva per poder obtenir resultats de molts pacients amb poc temps, i no només informació genètica de les zones codificants del DNA sinó també de les zones reguladores, gràcies a altres tècniques més ràpides, com l’anomenada seqüenciació d’última generació o “*Next Generation Sequencing*”, i

programes més especialitzats. D'aquesta manera es podria observar si hi ha alguna possible mutació en aquestes regions a molts pacients a la vegada.

La segona hipòtesi seria que es tracten d'unes regions molt protegides i conservades al llarg del temps en les que no poden haver-hi mutacions. Això concorda amb la comparativa entre diferents espècies, que es pot veure en la imatge següent, on s'observa que aquestes regions GATA-BS s'han mantingut i, per tant, això demostra que són d'una gran importància (Figura 23).

Human	CCCAATCCC
Chimpanzee	NNNNNNNN
Gorilla	CCCAATCCC
Orangutan	CCCAATCCC
Mouse	CCCAATCTC
Rat	CCCAATCTC
Pig	TCCAATCTC
Dog	CCCAAGCCC

Figura 24: Alineació de la seqüència humana de la regió GATA-BS5 amb les seqüències d'altres espècies. S'observa com la seqüència humana és idèntica a la dels altres primats (gorilla i orangutan) i que varia en una o dues bases amb les seqüències d'animals com el ratolí, la rata, el porc i el gos. Això demostra que aquestes regions reguladores s'han conservat i, per tant, són de gran importància (la lletra N que apareix en el cas del ximpanzé significa que aquesta seqüència no està registrada) (Font: *Ensembl*).

Podríem plantejar-nos, per tant, que en el cas que hi hagués una variant en aquestes regions GATA-BS, aquest fet fos incompatible amb la vida i per aquest motiu no es pot trobar l'alteració genètica causant. De totes maneres, aquesta opció es podria refutar ja que en l'estudi de les bases de dades s'ha trobat que, fins a l'actualitat, s'han descrit dues variants en regions GATA-BS de l'intró 1 del gen *SCN5A*, rs369277258 i rs530854013, que es recullen a la bibliografia *dnSNP*. Seria interessant conèixer si realment les tres persones que presenten aquestes variants estan afectades, o no, per SBr o alguna altra malaltia.

La tercera hipòtesi és que la recerca s'ha centrat només en els 11 llocs d'unió del FT GATA4 de la regió inicial de l'intró 1 del gen *SCN5A*, i per tant aquests són els que s'havien localitzat com a regions importants de regular l'expressió del gen *SCN5A* (Tarradas, A., et al. 2017). De totes maneres, això no descarta que altres regions d'aquest intró i del promotor del *SCN5A* puguin ser els causants de la malaltia d'aquests pacients, de la mateixa forma que també hi poden estar involucrades les zones reguladores d'altres gens, ja descrits per la SBr, o regions no identificades fins al moment.

Finalment dir que els resultats obtinguts, però, demostren que cal seguir investigant les regions no codificants del DNA en un futur, ja que s'ha observat que són importants per la regulació de l'expressió gènica. Concretament, aplicat a la recerca d'aquest treball, s'ha observat que aquestes regions si són importants en la regulació transcripcional del *SCN5A*, un gen clau pel bon funcionament del cor. A més, també caldrà estudiar quins efectes produeix la variant en l'expressió final del gen, un cop aquesta ha estat identificada dins de les regions reguladores, perquè d'aquesta manera es facilitarà la recerca de la cura de la malaltia en qüestió.

CONCLUSIONS

Una vegada finalitzada la recerca s'han obtingut les següents conclusions:

En primer lloc, i en base als objectius teòrics, s'han obtingut els coneixements essencials sobre el cor, especialment l'activitat elèctrica cardíaca i el PA cardíac. Un problema en aquests processos pot provocar una malaltia amb un alt risc de patir MSC, com en la SBr, una canalopatia que afecta el corrent de Na^+ . El principal gen patogen de la SBr és el *SCN5A*, que codifica per la subunitat α del $\text{Nav}1.5$, malgrat que entre un 60-75% dels pacients no se'ls ha identificat la mutació causant. En els últims estudis s'ha confirmat que el promotor i l'intró 1 d'aquest gen són importants regions reguladores de la seva expressió.

Seguidament, i en resposta al primer objectiu pràctic, després de fer una recerca bibliogràfica al laboratori i d'acord amb els estudis de la tesi doctoral de l'Anna Tarradas (Tarradas, A., 2017), on es remarca la importància del FT GATA4 com a activador i regulador de la transcripció del *SCN5A*, es van escollir les 11 regions reguladores de l'intró 1 d'aquest mateix gen com a possibles llocs d'unió del FT GATA4. Així doncs, l'estudi genètic s'ha dut a terme seqüenciant aquestes regions en un total de deu pacients. Aquest objectiu va portar al plantejament de la recerca i a la part pràctica del treball.

Respecte el segon i últim objectiu pràctic, i després d'haver seqüenciat i analitzat les 11 regions GATA-BS de l'intró 1 en deu pacients amb SBr sense mutació trobada prèviament, s'ha arribat a les següents conclusions:

1. En els pacients estudiats no s'ha trobat cap mutació en les 11 regions identificades a l'intró 1 del gen *SCN5A* com a possibles llocs d'unió amb el FT GATA4. Aquest fet posa sobre la taula la necessitat d'augmentar el nombre de pacients estudiats per tal d'observar si es confirma el fet que no es troben variacions en aquestes regions.
2. D'altra banda, també és important seguir investigant per tal de trobar altres regions intròniques probables de ser participants de la regulació de la transcripció del *SCN5A*, per tal de revelar noves causes pel 60-75% dels pacients amb SBr que actualment encara no se'ls ha identificat quina és la causa de la seva malaltia.

Finalment, i en referència a la pregunta de recerca, la investigació del marc pràctic duta a terme al laboratori no ha permès respondre-la amb total seguretat, ja que no s'ha confirmat que les variants causants de la SBr es puguin trobar en les regions no codificants del DNA estudiades, tal com s'havia especificat en la hipòtesi. Però, com que es tracta d'un tema científic que està en continu estudi, és probable que en un futur es pugui respondre finalment la pregunta. Per tant, la hipòtesi d'aquest treball podrà acabar sent refutada o confirmada en estudis posteriors.

BIBLIOGRAFIA

Ackerman, M. J., Marcou, C. A., Tester, D. J., (2013) *Medicina personalizada: diagnóstico de cardiopatías/canalopatías hereditarias*, Revista Española de Cardiología, 66(4), 298-307 <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2012.12.010> Consultat el juny del 2017.

Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., Tan, H. L. (2010) *Cardiac sodium channelopathies*. Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 460(2), 223-237 <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0> Consultat el juny del 2017.

Amin, A. S., Tan, H. L., Wilde, A. A. M. (2010) *Cardiac ion channels in health and disease*. Heart Rhythm, 7(1), 117-126 <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.08.005> Consultat el juliol del 2017.

Antzelevitch, C. (2016) *Brugada Syndrome. Clinical, genetic, molecular, cellular and ionic aspects*. HHS Public Access, 1(2), 177-85 <https://doi.org/10.1586/14779072.1.2.177> Consultat el juliol del 2017.

Brugada, P., Brugada, J. (1992) *Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome*, Journal of the American College of Cardiology, 20(6), 1391-1396 [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90253-J](https://doi.org/10.1016/0735-1097(92)90253-J) Consultat el juny del 2017.

Brugada, J., Brugada, R., Brugada, P. (2007) *Channelopathies: A new category of diseases causing sudden death*. Herz, 32(3), 185-191 <https://doi.org/10.1007/s00059-007-2976-1> Consultat el juliol 2017.

Brugada, R. (2008) *Genètica i caos elèctric. El canal de sodi en la Síndrome de Brugada*. Tesi doctoral. En línia. Internet. Accessible a <http://www.tdx.cat/handle/10803/4510> Consultada el juliol del 2017.

Brugada, P., Benito, B., Brugada, R., Brugada, J. (2009) *Brugada syndrome: Update 2009*. Hellenic Journal of Cardiology, 50(5), 352-372 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767278> Consultat el juny del 2017.

Edic College. Cabrera, L. (2015) *Lectura, comprensión e interpretación del electrocardiograma*. En línia. Internet. Accessible a <http://ediccollege.edu/wp-content/uploads/2016/01/Lectura-Comprension-EKG.pdf> Consultada el juny del 2017.

Fernández-Falgueras, A. et al. (2017) *Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances*, *Biology*, 6(1), 7 <http://dx.doi.org/10.3390/biology6010007> Consultat el juliol del 2017.

Fundació Brugada (2014) *Muerte súbita*. En línia. Internet. Accessible a <http://brugada.org/muerte-subita-y-sindrome-brugada/muerte-subita/> Consultada el maig del 2017.

Fundació Brugada (2014) *Síndrome de Brugada*. En línia. Internet. Accessible a <http://brugada.org/muerte-subita-y-sindrome-brugada/sindrome-de-brugada/> Consultada el juliol del 2017.

Genetics Home Reference (2017) *SCN5A gene*. En línia. Internet Accessible a <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SCN5A> Consultada el juliol del 2017.

Investigación Traslacional de Arritmias Cardíacas Secundárias a Canalopatías (2010) *Canalopatías. Canales iónicos cardíacos*. En línia. Internet. Accessible a <https://www.itaca.edu.es/canales-sodio.htm> Consultada el juliol del 2017.

Investigación Traslacional de Arritmias Cardíacas Secundárias a Canalopatías (2010) *Canalopatías. Potencial de acción cardíaco*. En línia. Internet. Accessible a <https://www.itaca.edu.es/potencial-accion-cardiaco.htm> Consultada el juny del 2017.

Jimeno, A., Ugedo, L., Rodríguez, S. et al. *Biología 1r batxillerat*. Editorial Santillana. Barcelona, 2016. ISBN 978-84-9047-672-7. Consultat el setembre del 2017.

Khan Academy (2017) *Métodos de análisis del ADN*. En línia. Internet. Accessible a <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr> Consultada l'agost del 2017.

Llorà, O. (2017) *Effects of class I and class II histone deacetylases on SCN5A expression via GATA4 transcription factor*. Proporcionat per IDIBGI durant l'estada al laboratori. Consultat el juliol del 2017.

Marbán, E. (2002) *Cardiac channelopathies*. Medicine (United Kingdom), 415(6868), 213-8 <https://doi.org/10.1038/415213a> Consultat el juny del 2017.

National heart, lung and blood institute (2011) *What is the heart?* En línia. Internet. Accessible a <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hhw#> Consultada l'abril del 2017.

Nielsen, M. W., Holst, A. G., Olesen, S. P., Olesen, M. S. (2013) *The genetic component of brugada syndrome*, Frontiers in Physiology, 1-11 <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00179> Consultat el juliol del 2017.

Riuró, H. (2014) *El paper de les subunitats beta en la regulació del canal de sodi cardíac associat a la mort sobtada*. Tesi doctoral. En línia. Internet. Accessible a <http://www.tdx.cat/handle/10803/285269> Consultada el juliol del 2017.

Tarradas, A. (2017) *Els factors GATA4 i GATA5 en la regulació transcripcional del gen que codifica pel canal de sodi cardíac (SCN5A)*. Tesi doctoral. Proporcionat per IDIBGI durant l'estada al laboratori. Consultada l'agost del 2017.

Tarradas, A. et al. (2017) *Transcriptional regulation of the sodium channel gene (SCN5A) by GATA4 in human heart*, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 102, 74-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.10.013> Consultat l'agost del 2017. Consultat a l'agost del 2017.

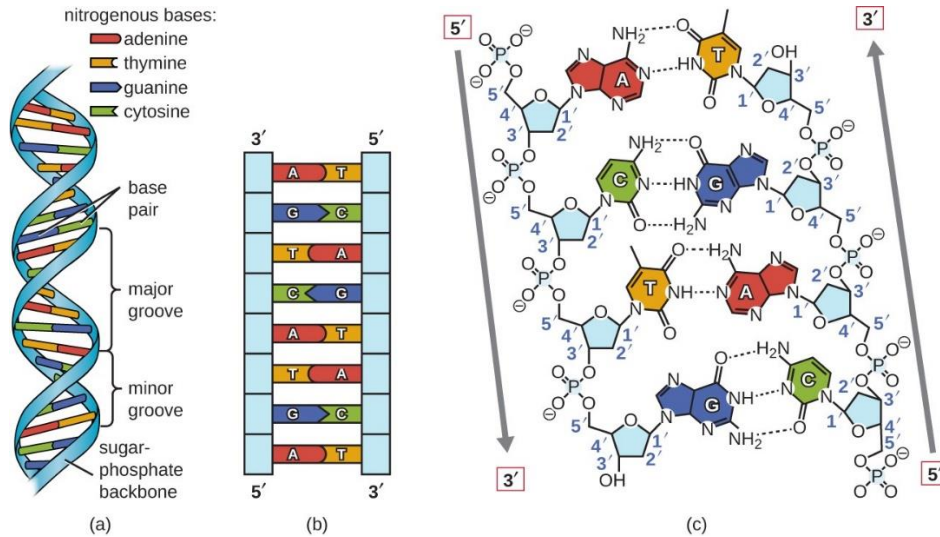
Taylor, T. (2012) *Heart*. En línia. Internet. Accessible a <http://www.innerbody.com/image/card01.html> Consultada l'abril del 2017.

Texas Heart Institute (2016) *Síndrome de Brugada*. En línia. Internet. Accessible a http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/brugada_sp.cfm Consultada el juliol del 2017.

Texas Heart Institute (2016) *Paro cardíaco súbito*. En línia. Internet. Accessible a http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/SCA_sp.cfm Consultada el juny del 2017.

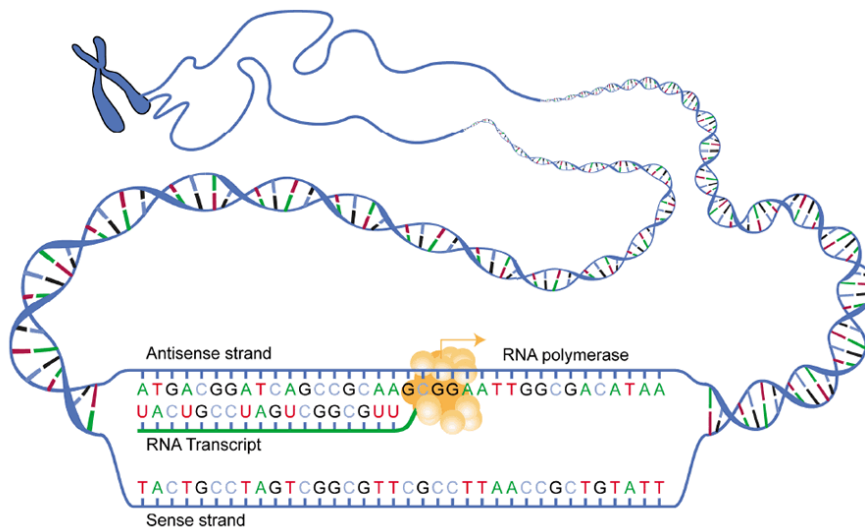
ANNEXOS

ANNEX I: Figures corresponents a l'apartat de genètica, per tenir una millor comprensió del contingut.



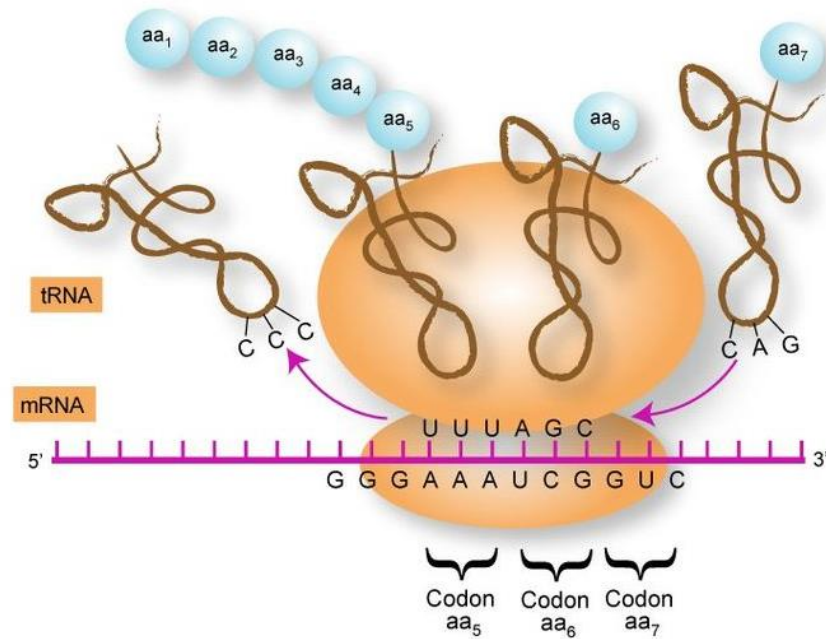
Annex I A: Estructura del DNA, presentada des de tres punts de vista.

- A. Es mostra la doble hèlix del DNA dextrogiro
 - B. S'observa la complementarietat de bases i les dues cadenes antiparal·leles
 - C. Es mostra la forma dels nucleòtids en detall. S'indica la numeració dels carbonis de les pentoses i el nombre de ponts d'hidrogen que enllacen els nucleòtids segons les bases que s'uneixen
- (Font: Rice University, Microbiology)



Annex I B: Transcripció del DNA. Mostra com es descondensa un fragment del DNA per tal que la RNAPol pugui reconèixer les bases i fer una cadena de RNA complementària a la cadena de DNA.

(Font: National Human Genome Research Institute)



Annex I C: Traducció del DNA als ribosomes. Els codons del RNAm es complementen amb els anticodons del RNAt i aquests alliberen l'aminoàcid específic que formarà la proteïna determinada pel RNAm, transcrit prèviament del DNA.

(Font: Wikipedia)

ANNEX II: Taula amb les dades dels deu pacients que pateixen SBr estudiats

PACIENT	ÈTNIA	GÈNERE	EDAT	SÍMPTOMES	FAMÍLIA	ECG	FÀRMACS	EFF	DAI	ORIGEN MOSTRA
RB12146	Caucasià	M	55	Síncope	Sí	Tipus II	+	N/P	Sí	Hospital Clínic BCN (sang)
RB12589		M	50	No	No	Tipus III	+	-		Hospital Clínic BCN (sang)
RB12660	Caucasià	M	49	No	No	Tipus III	+	-	No	Hospital Clínic BCN (sang)
RB12685	Caucasià	M	57	MSC	No	Tipus I	N/P	+	Sí	Hospital Clínic BCN (sang)
RB12790	Caucasià	M	27	No	No	Tipus III	+	-	No	Hospital Clínic BCN (sang)
RB12809	Caucasià	M	59	No	No	Tipus II	+	-	No	Hospital Clínic BCN (sang)
RB12815	Caucasià	F	32	No	No	Tipus I	N/P	-	No	Hospital Clínic BCN (sang)
RB13079	Caucasià	M	21	No	No	Tipus II	+	-	No	Hospital Clínic BCN (sang)
RB13152	Caucasià	M	50	No	Sí	Tipus II	+	+	Sí	Hospital Clínic BCN (sang)
RB15304	Caucasià	M	42	No	No	Tipus I	+	N/P	Sí	Hospital Rio Ortega, Valladolid (sang)

Annex II: Taula amb les dades dels 10 pacients. Es mostra la informació bàsica, ètnia, gènere i edat, i després informació sobre l'estat del pacient quan va ser diagnosticat amb SBr, segons si presentava símptomes, quins tipus d'ECG s'observa, el resultat obtingut en proves complementàries com l'administració de fàrmacs o EFF o si se li ha implantat un dispositiu DAI. A més a més també s'indica l'hospital de procedència de la mostra i d'on va extreure's el DNA (Font: Laboratori IDIBGI)

