



ENCEFALOPATIA EPILÈPTICA d'INICI PRECOÇ

UNA APROXIMACIÓ A L'ESTUDI GENÈTIC

SUMARI

1. INTRODUCCIÓ.....	pàg. 4
2. PUBLICACIÓ D'UN ARTICLE CIENTÍFIC.....	pàg 7
3. ENCEFALOPATIA EPILÈPTICA D'INICI PRECOÇ.....	pàg. 9
3.1 Què és?.....	pàg. 9
3.2 Història.....	pàg. 11
3.3 Causes.....	pàg. 12
3.4 Origen Genètic.....	pàg. 13
3.4.1 Malaltia Genètica Hereditària.....	pàg. 13
3.4.1.1 Homozigòtica.....	pàg. 13
3.4.1.2 Heterozigot Compost.....	pàg. 14
3.4.2 Mutació <i>de Novo</i>	pàg. 15
3.5 Síntomes.....	pàg. 17
3.6 Diagnòstic.....	pàg. 19
3.6.1 EEG.....	pàg. 19
3.6.2 IRM.....	pàg. 21
3.6.3 TC.....	pàg. 21
3.6.4 Seqüenciació de l'Exoma.....	pàg. 22
3.7 Tractaments.....	pàg. 25
4. PART EXPERIMENTAL.....	pàg. 26
4.1 PROTOCOL DE SELECCIÓ.....	pàg. 26
4.1.1 Presentació del cas i estudi del DNA.....	pàg. 26
4.1.2 Programa Informàtic: Processament de dades.....	pàg. 27
4.1.3 Filtratge per al cas d'estudi.....	pàg. 29
4.1.4 Obtenció de darreres mutacions possibles: Programa <i>IGV analysis</i>	pàg.30
4.1.5 Comprovació a l' <i>EXAC Browser</i>	pàg.30
4.1.6 Comprovació a l' <i>UCSC Browser</i>	pàg.30

4.1.7	Validació de la mutació amb Seqüenciació <i>Sanger</i>	pàg.32
4.1.7.I	Disseny dels <i>Primers</i>	pàg.32
4.1.7.I.a.	Filtratge: <i>Primer 3 Input</i>	pàg.33
4.1.7.I.b.	Comprovació disseny dels <i>primers</i>	pàg.33
4.1.7.I.b.I	<i>UCSC Browser</i>	pàg.33
4.1.7.I.b.II	<i>BLAST</i>	pàg.34
4.1.7.II	PCR.....	pàg.35
4.1.7.III	Purificació.....	pàg.35
4.1.7.IV	Reacció de Seqüència.....	pàg.35
4.2	Pacient 1.....	pàg.38
4.3	Pacient 2.....	pàg.47
4.4	Pacient 3.....	pàg.56
4.5	Pacient 4.....	pàg.65
4.6	Pacient 5.....	pàg.74
5.	CONCLUSIONS.....	pàg.84
6.	REFERÈNCIES.....	pàg.87
7.	IMATGES.....	pàg.89
8.	GLOSSARI.....	pàg.94
9.	BIBLIOGRAFIA i WEBGRAFIA.....	pàg.100

1. INTRODUCCIÓ

Aquest treball de recerca tracta sobre l'Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoç, EIEE en endavant. Sóc conscient que simplement amb pronunciar el nom de la patologia et pots espantar i sentir-te un complet ignorant vers la desconeixença cap a ella, si més no, és el que em va succeir a mi quan l'Ester Cuenca, investigadora en Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron (IRVH), em va proposar la malaltia com a objecte d'estudi.

He tingut la sort de poder treball amb un temari de tal rellevància, gràcies a la intervenció de la meva tutora Maria José Hellín. Ella actuà com a canal entre el centre i jo, i és per això que he pogut tractar de primera mà la malaltia, a més de submergir-me en el dia a dia dels investigadors científics.

El motiu pel qual vaig accedir a treballar amb una malaltia de la qual no havia sentit a parlar mai, va ser un seguit d'emocions i pensaments.

Accedint-hi m'estaria demostrant a mi mateixa fins a on podria arribar. Com la passió que dipositaria vers un tema em faria esforçar-me de tal manera que, quan assolís els límits que jo mateixa m'establís, em generaria una total i absoluta satisfacció. Una sensació gratificant, d'estar en pau amb mi mateixa.

Accedint-hi també faria adonar-me'n de la quantitat de malalties rares i desconegudes que ens trobem actualment a tot el món. No som conscients del que pateixen molts infants i adults, i en conseqüència les seves famílies i els que els envolten i, el pitjor de tot, és veure la gran quantitat feina que encara queda perquè aquestes s'eradiquin completament o com a mínim, que els afectats puguin gaudir d'una millor qualitat de vida.

Amb aquest treball vull aconseguir portar la malaltia a la societat. Desitjo que la coneguin, que sàpiguen d'ella i, que encara que sigui per uns instants, empatitzin amb els pares d'aquests infants afectats. Vull que entenguin com es deuen sentir al estar ells completament sans i trobar-se amb el seu nadó afectat per una encefalopatia i per

crisis epilèptiques i, que a més, encara no sàpiguen quin és el seu origen, on hi va haver l'error.

Així doncs, l'EIEE resulta una malaltia molt dura, amb altes taxes de mortalitat, pel que aquelles persones que decideixin indagar en ella, han de deixar a part els seus sentiments i actuar de la manera més racional possible.

Amb aquest treball m'he definit uns objectius que espero assolir a partir de la màxima capacitat que pugui tenir. Cal remarcar però, que en un inici la meva ambició va resultar massa gran. La hipòtesi inicial era massa complexa per una estudiant de segon de batxillerat, no solament a nivell de coneixements tècnics i mèdics, sinó també per la seva manca de funcionalitat. Estava plantejant un recurs final, en el que si els autèntics investigadors de l'IRVH aconseguissin arribar a demostrar un patró, l'acabarien aplicant, però per això es necessitaria tota la prèvia demostració.

És per això que gràcies a la primera negativa d'hipòtesi plantejada a causa de la seva complexitat, em va fer tocar de peus a terra. Havia de començar a ser realista, no trobaria la cura definitiva, però sí que podria portar la malaltia fora del que són els centres de recerca i plantejar una hipòtesi apte per al meu nivell.

Amb el treball pretenc aconseguir ELS OBJECTIUS següents:

- Saber exactament de què tracta la malaltia. Quines són les seves causes i com es produeixen.
- Classificar els diferents tipus d'origen genètic que la indueixen, i conèixer-los per intentar trobar generalitzacions.
- Saber la seva simptomatologia així com els tractaments que hi ha per guarir-la.
- Estudiar i aplicar el protocol establert actualment per a l'estudi de la malaltia (aquest objectiu correspondria a la Part Experimental).

Per tal de definir la hipòtesi del treball i definir així la línia de la investigació que portaré a terme, necessito primer contextualitzar de manera molt breu la malaltia d'objecte d'estudi.

Les encefalopaties epilèptiques precoces (EEP) són un conjunt de trastorns neurològics que apareixen en els primers mesos de vida caracteritzades per l'aparició de crisis epilèptiques associades a un patró electroencefalogràfic característic. Clàssicament han estat relacionades amb una etiologia simptomàtica, però, com a conseqüència del desenvolupament de les neurociències, el coneixement actual d'aquestes malalties permet afirmar que les EEP representen la via final d'un grup heterogeni de condicions estructurals, genètiques i metabòliques anteriorment desconegudes.

És per això que en aquest treball partirem d'una premissa fonamental per a poder comprendre la genètica de les epilèpsies: *mutacions en un mateix gen o en diferents gens poden provocar diferents síndromes epilèptics.*

Per tal d'assolir tots els objectius i treballar seguint la línia marcada en la hipòtesi, dividiré el treball en dos grans blocs: en el primer abordaré tota la part teòrica per definir la malaltia, estudiar els seus efectes i classificar les condicions genètiques que poden ser la causa de la seva generació. En el segon bloc, aplicaré el protocol d'estudi de la seqüència genètica a diferents casos per tal de trobar quin és el gen en el qual s'origina la malaltia en un pacient.

2. PUBLICACIÓ D'UN ARTICLE CIENTÍFIC

Abans de començar a parlar sobre l'EIEE, cal tenir ben clars tots els passos que es produeixen per a que qualsevol article científic resulti vàlid.

1. L'investigador té una idea per a un possible estudi.
2. La presentarà redactada als seus superiors i demanarà finançament a l'hospital, universitat, centre de recerca... On hi treballi o hi mantingui un cert contacte.
3. Aquesta proposta serà avaluada per un comitè ètic, centrat en la correcció de la metodologia, l'ètica i els diferents aspectes legals de qualsevol projecte de recerca que pugui comportar algun risc físic o psicològic en humans o animals, i per un comitè científic, que s'encarregarà de promoure una bona qualitat i tècnica pel que s'anirà a investigar.
4. Un cop el projecte sigui aprovat pel comitè ètic i científic i a més, el centre accedeixi a finançar-lo, ja es pot començar a treballar en ell.

Al finalitzar la investigació, el científic haurà de moure's i buscar la via adequada de publicació on pugui assolir el factor d'impacte desitjat.

Entre aquestes vies trobem les conferències científiques, on es poden fer presentacions orals o pòsters i, com a més destacades, les revistes científiques.

En elles segons la qualitat i el grau d'innovació del que es parli en el projecte, podrem trobar els *shorts*, els *letters* o els *articles*, d'entre d'altres formats.

Per a que una revista accedeixi a publicar un projecte, aquest ha d'anar superant diferents estadis:

En primer lloc l'editor de la revista, que acostuma a ser un científic que s'hi dedica a ella a temps complet, rep el *letter* que li envia.

Si ell el considera interessant i amb possibilitats de resultar apte, l'envia a 3 *referees* diferents.

Aquests resulten tres científics amb renom que treballen fora de la revista i que a nivell personal qualificaran el projecte com *accepted* o bé *rejected*.

En aquest darrer cas, significaria que no ha estat aprovat i en dirien els motius. Pot ser que els *referees* explicitin uns *majors comments*, és a dir, troben que hi ha greus errors en ell i que si no és capaç de demostrar-li el que es diu, no s'ho creuria, o bé uns *minors comments*, en el que s'especifiquen uns detalls més aviat estètics, que si es corregeixen, el projecte en si podria acabar essent *accepted*.

Un cop l'editor rep els comentaris dels seus tres *referees* i es troba amb un article acceptat pels tres, acostuma a creure-se'ls i en conseqüència, aprova el projecte i el publica en la seva revista.

3. ENCEFALOPATIA EPILÈPTICA D' INICI PRECOÇ

3. 1 QUÈ ÉS?

L'encefalopatia epilèptica d'inici precoç, EIEE/EOEE en anglès, també es coneguda com a síndrome d'Ohtahara. Resulta una malaltia força rara i desconeguda que té una incidència segons les estadístiques japoneses, d'un 0,04% sobre 2.378 casos d'epilèpsies detectades en una població menor de 10 anys¹.

Aquesta patologia és la causa de crisis epilèptiques en nadons així com d'una afectació neurològica, amb retards mentals i psicomotors, d'entre d'altres, molt greu.

La malaltia té el seu inici durant el període neonatal ¹⁻², abans dels tres mesos d'edat, freqüentment durant les dues primeres setmanes ³. Pateix una evolució en la que la meitat dels casos mor abans dels sis mesos ¹ i l'altra meitat evoluciona cap a altres subfenotips englobats en les patologies d'encefalopaties epilèptiques.

D'entre aquests subfenotips cal destacar la síndrome de West/Ohtahara i la de Lennox-Gastaut. Les sèries de l'estudi de Yamatogi i Ohtahara ² van manifestar que un 75% dels casos evolucionaven cap a la síndrome de West entre els dos i sis mesos d'edat, mentre que solament un 12% evolucionava posteriorment cap a la síndrome de Lennox-Gastaut. El 13% restant, evolucionava cap a altres subfenotips menys freqüents.

Tot ells presenten una preferència d'edat i de transmissió mútua, un tipus de convulsions freqüents i generalitzades, una heterogeneïtat etiològica, una resistència a teràpies convencionals així com uns pronòstics catastròfics de deteriorament neurològic ¹, pel que al trobar-ne tantes similituds entre ells, el que en un inici resultés un pronòstic d'EIEE, podria acabar essent errat.

L'EIEE és molt heterogènia clínica, genètica i fenotípicament. La principal causa de la malaltia és un error en el canal iònic quan s'està produint la sinapsi. Aquests canals estan implicats en trastorns neurològics paroxístics, en els que trobem les epilèpsies, trastorns de moviment, migranyes, atàxiques, etc.

^{1,2,3} Pàgina 87 de l'índex de Referències

El patró d'herència es pot classificar en dos grans blocs. Per una banda pot resultar una malaltia hereditària autosòmica recessiva, és a dir, una herència en la que es transmet una alteració dels al·lels dels cromosomes no sexuals dels pares.

Dins d'aquesta opció, el nadó pot ser homozigot o bé un *compound heterozygote* (chet).

Per l'altra, es pot donar el cas de que resulti una mutació genètica *de novo* dominant.

Des del 2012 molts centres de recerca, i en especial l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, estant treballant amb els *arrays de CBH* (hibridació genòmica comparada)⁵. Dintre d'aquests, trobem la tècnica de ràpida resposta, la MLPA (*múltiplex ligation-dependent probe amplification*). Gràcies a ella s'ha detectat que en un 8% dels casos, la malaltia prové per grans insercions o delecions en el cariotip del malalt, concepte que té relació amb el tipus de mutacions *de novo* dominants.

En els casos clínics, un 40% dels gens afectats corresponen a gens candidats (DNM1, GABBR2, FASN, RYR3, GABRB3, SCN2A, SRXBP1, SCN1A, KCNQ2, SCL25A22)⁴, gens pels quals s'hi ha trobat coincidències en diferents estudis. A més, gràcies a la seqüenciació de l'exoma clínic, s'ha vist que la patologia acaba afectant als 4800 gens més intolerants a la variació genètica humana.

Actualment, moltes universitats i centres de recerca d'arreu del món estan cooperant i treballant per trobar el veritable coneixement de la malaltia i poder fer així un consell genètic, en el que es puguin concloure tractaments per millorar la qualitat de vida dels malalts i, en un suposat utòpic, trobar tractaments que guareixin al fi una patologia pel moment incurable.

^{4,5} Pàgina 87 de l'Índex de Referències

3.2 HISTÒRIA

L'encefalopatia epilèptica d'inici precoç va ser descrita pel japonès Shunsuke Ohtahara l'any 1976 com una patologia diferent a la síndrome de West i a la de Lennox-Gastaut, ja que va veure que era la que es manifestava a menys edat dels afectes.

Ohtahara va néixer al 1930 a Okayama, Japó i va morir el 16 de març de 2013, als 83 anys d'edat, després d'haver estat hospitalitzat gairebé un any a causa d'una malaltia neurodegenerativa.

Es va graduar en pediatria a la Universitat d'Okayama i va començar a exercir com a tal, a la Okayama University Medical School. L'any 1979 va convertir-se en professor d'aquesta i va fundar-hi el departament de neurologia infantil.

Al llarg de la seva carrera va rebre rellevants premis internacionals, en els que s'inclouen: Ambaixador de la epilèpsia en la Lliga Internacional contra l'Epilèpsia; Ambaixador del Departament Internacional per l'Epilèpsia; Reconeixement al memorial Frank Ford de l'Associació de Neurologia Pediàtrica; Premi Hans Berger de la fundació Hans Berger a més del premi Fritz Dreifuss de la Fundació Epilèptica d'Amèrica.

A més, va ser el fundador de la societat Epilèptica de Japó.

L'any 1989 la Comissió de Classificació de Terminologia de la ILAE va descriure el concepte de síndrome epilèptic, com un grup de signes i símptomes que succeeixen habitualment junts, i que inclouen elements tal com el tipus de convulsió, l'etiologia, l'anatomia, els factors precipitants, l'edat d'inici, la gravetat, la conicitat, el circardià diürn, el ciclisme i a vegades, el pronòstic. I és en aquest mateix any que classifiquen la síndrome d'Ohtahara com a epilèpsia generalitzada simptomàtica.

L'any 2011 el seu esquema diagnòstic va proposar englobar la patologia dins la categoria d'encefalopatia epilèptica, ja que les anormalitats epilèptiques originaven una progressiva disfunció.

Al llarg dels anys, Ohtahara juntament amb col·laboradors com Yamatogi (2002, 2006) i Aicardi (2005) van anar publicant articles sobre la malaltia.

A més, si es sumen les publicacions de diferents universitats i centres de recerca d'arreu del món, han fet que avui en dia es coneguin molts més aspectes d'ella i així es pugui seguir treballant i cooperant amb més informació, per poder arribar a tractar-la millor.

3.3 CAUSES

La principal causa de l'EIEE són els CANALS IÒNICS activats per voltatge.

L'epilèpsia succeeix quan canvis permanents en el teixit cerebral fan que el cervell estigui massa excitat o irritable. En conseqüència, ens trobem davant d'unes crisis de convulsions i espasmes que poden malmetre greument la ment. Els canals iònics, que es troben també en l'adult, no solament en nadons i les seves malalties d'inici precoç, són responsables d'aquest fenotip epilèptic.

L'EIEE resulta una *canalopatía* de calci d'alt voltatge ⁶.

Els canals de (Ca_2^+), si es troben en un potencial de membrana en repòs, es mantenen tancats, però si es troben en potencials més positius, és a dir, on hi ha un cert voltatge, són capaços d'obrir-se ⁷.

A més, els ions de calci són capaços de traspasar la membrana cel·lular quan es produeix una despolarització d'aquesta ⁷. Al produir-se aquest pas, s'activen processos intracel·lulars com la contracció muscular ⁸, la transcripció de gens⁸, l'inici de la secreció⁸ i, concretament en les neurones, la secreció de neurotransmissors⁸ i la més important per al cas, l'activació del senyal elèctric⁸ en la sinapsi, és a dir, la transmissió de l'impuls nerviós.

^{6,7,8} Pàgina 87 de l'índex de Referències

De manera que quan hi ha un potencial de membrana positiu, amb voltatge, significa que la membrana està despolaritzada, pel traspassen més ions de (Ca_2^+) del que tocarien i s'activa així un senyal elèctric, que produeix una sobreexcitada sinapsi capaç de produir un atac epilèptic.

3.4 ORIGEN

L'encefalopatia epilèptica d'inici precoç ha estat vinculada a diferents tipus d'origen genètic:

3.4.1. Malaltia Genètica Hereditària

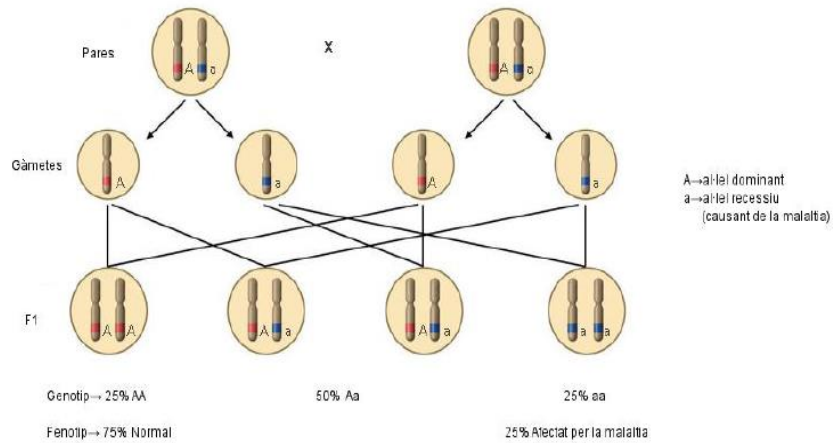
Una malaltia genètica és aquella que s'origina com a conseqüència de l'alteració en un o més gens del genoma. Les malalties genètiques s'originen quan els mecanismes de reparació de l'ADN són incapaços de restaurar la informació genètica correctament, ja sigui per la gravetat de les lesions en l'ADN o bé pel mal funcionament dels enzims de reparació.

L'EIEE pot resultar una malaltia genètica hereditària autosòmica recessiva, és a dir, una patologia que es transmet a partir dels cromosomes no sexuals, els autosomes.

Dintre d'aquesta possibilitat, trobem dos tipus diferents de recessivitat:

3.4.1.1 Homozigòtica: Perquè el nadó resulti homozigot, es necessita que els dos pares no afectats per la malaltia però sí portadors d'ella, tinguin en un gen específic l'al·lel recessiu de la malaltia, i en conseqüència de la unió dels dos gens amb els al·lells recessius, s'origini aquesta.

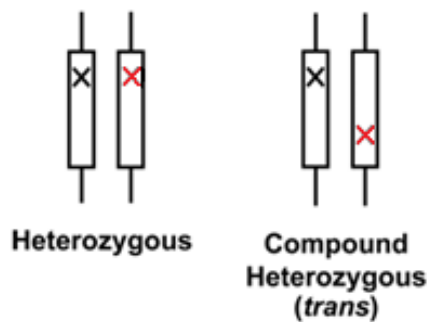
La possibilitat de tenir un fill afectat per una patologia autosòmica recessiva homozigòtica, entre dos persones portadores d'una sola copia del gen mutant, és d'un 25 %.



Fotografia 1. Patró d'Herència Autosòmica Homocigòtica

3.4.1.2 Heterozigot Compost: *chet*, en les seves sigles en anglès. Es tracta també d'una recessivitat transmesa pels cromosomes autosòmics dels pares, però amb la peculiaritat que el nadó tindrà un dels dos al·lels per un mateix locus mutat.

Aquesta imatge ho exemplifica:



Fotografia 2. Comparació entre Heterozigot estàndard i un Compound Heterozygous

En la imatge de l'esquerra es veu un individu heterocigot, és a dir, aquell que per a un gen determinat, té dos al·lels diferents en els dos locus d'un parell de cromosomes homòlegs.

En canvi, a la imatge de la dreta es veu un individu heterocigot compost que, continua tenint els al·lels diferents però aquests es troben en

diferents posicions d'un mateix gen, en un parell de cromosomes homòlegs. Es tracta de dos mutacions heterozigotes independents.

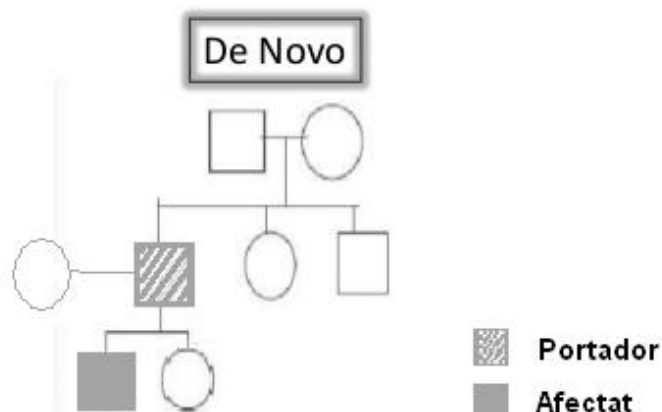
El problema es produeix quan el pacient té en un mateix gen dos mutacions heterozigotes que venen una de cada progenitor, i que passen a actuar com a homozigotes.

3.4.2 Mutació *de Novo*

Les mutacions *de novo* resulten mutacions dominants que apareixen per primera vegada en una família (on no hi ha familiars afectats), i que es produeixen a les cèl·lules germinals del pare o de la mare o al zigot.

En el fons totes les malalties que avui en dia es transmeten en herència algun dia van resultar una mutació *de novo* que aparegué en un avantpassat llunyà.

Així doncs, veure's afectat per una mutació d'aquesta mena és com començar de zero, ja que no hi ha referències exactes per definir-la.



Fotografia 3. Herència *de Novo*.

En aquesta imatge podem veure com apareix una malaltia *de novo*. En la major part dels casos o bé el pare o bé la mare són portadors d'algun tipus de malaltia.

El que succeeix és que s'uneix l'al·lel recessiu d'un gen de la mare o el pare i se li suma una mutació de l'al·lel del gen del fill en l'altre cromosoma homòleg. D'aquesta manera s'està donant lloc a un nadó amb una malaltia que no havia aparegut abans a una família i que tindrà un patró d'herència dominant.

Un 8% d'aquestes mutacions que es produeixen en els gens dels fills són originades per grans insercions o delecions de material genètic en el cariotip del malalt.

Aquestes insercions o delecions (segons el cas) es van començar a veure a partir del 2012 a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, gràcies al treball amb *arrays de CBH* (hibridació genòmica comparada) ⁵. Aquests resulten una nova tècnica per assolir un millor i més eficaç diagnòstic per al camp de les patologies lligades al retràs mental.

Segons Alberto Paja ⁵, responsable de Citogenètica Molecular de l'HUVH, "els *arrays* estan començant a substituir la tècnica per excel·lència durant més de 40 anys: l'estudi citogenètic o cariotip, triplicant el nombre de casos en els que s'arriba a un diagnòstic".

Dintre dels *arrays de CBH* trobem la tècnica de ràpida resposta, la MLPA (*múltiple ligation-dependent probe amplification*), en la que s'obtenen resultats en menys de cinc dies. Gràcies a ella es poden detectar anomalies molt puntuals en uns determinats síndromes coneguts.

A l'Hospital Universitari Vall d'Hebron s'està treballant amb 40 trios (120 individus). D'aquests solament sabem d'un 20% - 30% dels casos quins gens la causen, mentre que l'altre 70% encara no se sap.

⁵ Pàgina 87 de l'índex de Referències

Dins d'aquests gens coneguts, un 40% corresponen a gens candidat, és a dir, a un seguit de gens dels quals s'han fet varis estudis arreu del món ja que són bastants casos en el quals el fet de que es vegin afectats va lligat amb que el nadó tingui EIEE.

Aquests són:

Segons un estudi ⁹ en el que va analitzar 356 trios, on 264 d'aquests van ser analitzats prèviament pel consorci de l'Epi4K/EPGP, es van descobrir 429 mutacions *de novo*, en les que s'inclouen gens tals com el DNMT1 (mutat en 5 individus), el GABBR2 (mutat en dos individus), el FASN (mutat en dos individus), el RYR3 (mutat en dos individus).

En un altre estudi ¹⁰ fet pel mateix consorci, es van seqüenciar els exomes de 264 malalts juntament amb els dels seus pares, i es van confirmar 329 mutacions *de novo*. En aquestes mutacions es trobaven alterats gens tal com el GABRB3 (mutat en quatre individus) o el SCN2A (mutat en un individu).

També s'han trobat mutats en 265 casos ¹¹, el SCN1A, el KCNQ2 o el SCL25A22.

A més també és molt rellevant el gen STXBP1, ja que segons un estudi de Saitsu i col·laboradors ¹² en la que es van analitzar 54 casos d'EIEE, van veure que es trobava mutat en 14 de cada 43 casos en els que es van poder obtenir resultats.

Pel que fa referència a l'altra 60% dels gens que no coneixem, són de causa desconeguda.

3.5 SÍMPTOMES

Els símptomes que fan referència a la malaltia són:

-Retard mental.

-Retard psicomotor.

-Problemes de desenvolupament.

^{9,10,11,12} Pàgina 88 de l'índex de Referències

-Disminució del to muscular.

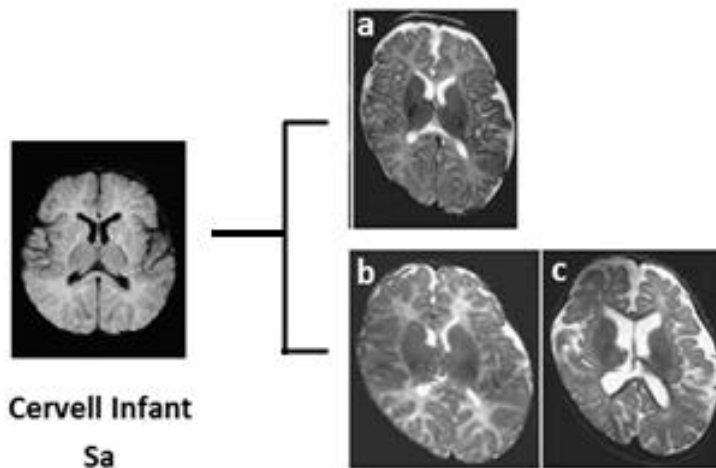
-Espasmes tòncics, és a dir, les contraccions mantingudes d'un múscul.

-Convulsions mioclòniques, és a dir, unes sèries alternades i rítmiques de contraccions i relaxacions breus en un grup muscular, que poden donar lloc a una pèrdua del coneixement.

-Microcefàlia, és a dir, una disminució de la mida del crani.

-Atròfia cerebral.

Aquestes darreres les podem veure representades en les següents imatges:



Fotografia 4. Comparativa entre un cervell d'infant sa amb cervells d'afectats per EIEE

En aquest esquema es pot veure un seguit de ressonàncies magnètiques cerebrals de diferents subjectes, amb el fi d'obtenir una comparativa entre l'estat del cervell d'afectats per l'EIEE i l'estat del cervell de nens sans.

En la imatge A es tracta del subjecte 1 afectat per la malaltia als tres mesos.

En la B es tracta del subjecte 2 als tres mesos.

En la C es tracta del subjecte 2 als tretze mesos.

En aquests casos es pot demostrar que el grau d'afectació varia segons l'infant i en el cas concret del malalt 2, es veu com a mesura que passen els mesos es va produint una malformació cranial cada cop més gran junt amb un augment del cos callós.

En tots ells es pot veure que aquest resulta més gran del normal a mesura que passa el temps. També es veu que el tàlem costa de definir-se així com *septum lucidum*, el nucli caudat i l'hipocamp.

3.6 DIAGNÒSTIC

El diagnòstic de l'EIEE es produeix un cop el nadó ja ha nascut. Resulta complicat detectar la malaltia al fetus, ja que la variabilitat d'implicació de gens que té aquesta és molt àmplia, a més, hi ha la peculiaritat de que els pares estiguin sans, i això no permet veure a través de les proves de diagnòstic prenatal [com les ecografies (tot i que es podria veure una clara malformació cranial en un fetus d'edat molt avançada) l'amniocentesi o la punció del cordó umbilical, d'entre d'altres] sí el nen es veurà afectat o no.

És per això que es detecta la malaltia a partir de totes les troballes clíniques, com veure una clara malformació cranial a més d'unes crisis epilèptiques molt precoces.

Les proves que es realitzen per a descartar l'EIEE són les següents:

3.6.1 EEG³

Un electroencefalograma és un examen indolor i sense efectes secundaris que permet mesurar l'activitat elèctrica del cervell.

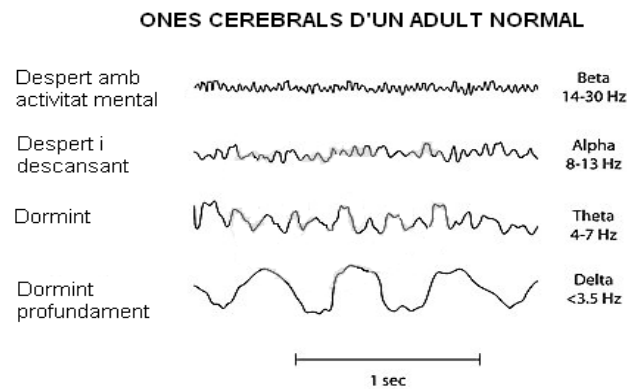
Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoç

Consisteix en col·locar uns elèctrodes a la superfície del cuir cabellut d'un pacient que, mentre es troba estirat i tranquil en una llitera, sense necessitat d'anestèsia ni sedació, van detectant la localització i intensitat de les descàrregues que produeixen les neurones en la transmissió de l'impuls nerviós.

Els elèctrodes són capaços de transmetre els impulsos a una gravadora, que converteix aquests en uns patrons amb línies ondejades observables en els respectius monitors o en paper.

D'aquesta manera, els especialistes són capaços de detectar en les línies ondulades si el pacient està sa o es veu afectat per alguna mena de malaltia.

Aquesta prova s'usa amb freqüència per a detectar epilèpsies.



Fotografia 5. Electroencefalograma d'un adult sa en diferents estadis.

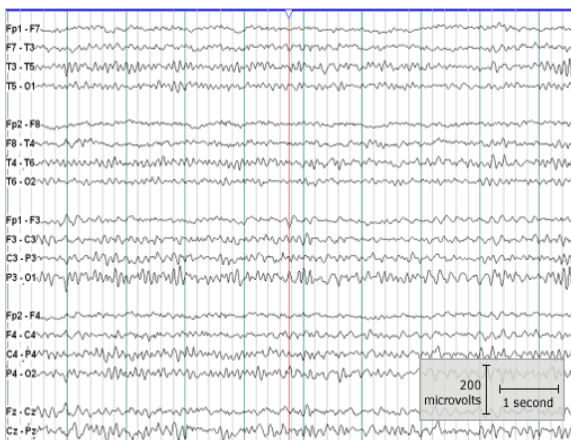


Foto 6. Electroencefalograma d'un subjecte sa.

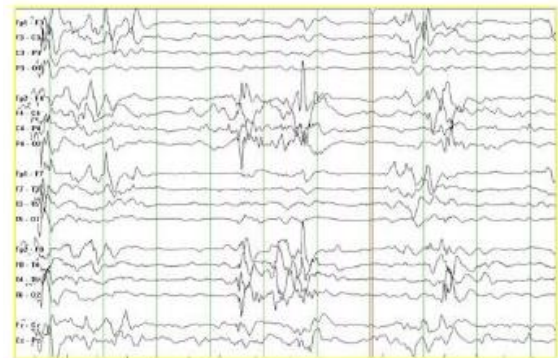


Foto 7. Electroencefalograma d'un subjecte afectat per EIEE.

En aquestes darreres imatges podem veure la comparació entre els resultats d'un EEG entre una persona sana i una malalta per EIEE.

En aquesta es veuen unes línies ondulatòries amb pujades i baixades centralitzades i pronunciades, que es van repetint al pas del temps. Això resulta un indicatiu de que el nadó es veu afectat per algun trastorn relacionat amb les epilèpsies i, gràcies a altres proves, es podria arribar a la detecció de l'encefalopatia epilèptica d'inici precoç.

3.6.2 IRM

La imatge per ressonància magnètica és un examen sense radiació que permet crear imatges del cervell i els seus teixits.

La prova utilitza imants i ones de ràdio molt potents situades en un escàner, que es situarà sobre del cap del pacient estirat. Perquè l'IRM funcioni, és necessari que el pacient es prengui un tint especial anomenat medi de contrast, que s'administra per via intravenosa abans de començar la prova. El medi de contrast més utilitzat és el gadolini, que resulta molt segur per la gran majoria de les persones.

L'examen sol durar de la mitja hora en endavant i gràcies a ell s'obté una clara i precisa imatge de l'encèfal, que permetrà detectar qualsevol anomalia al comparar-ho amb un de sa.

3.6.3 TC

La tomografia computeritzada, més coneguda com a TAC, és un examen que obté uns resultats molts semblants a la ressonància magnètica, però que té la peculiaritat d'usar radiació.

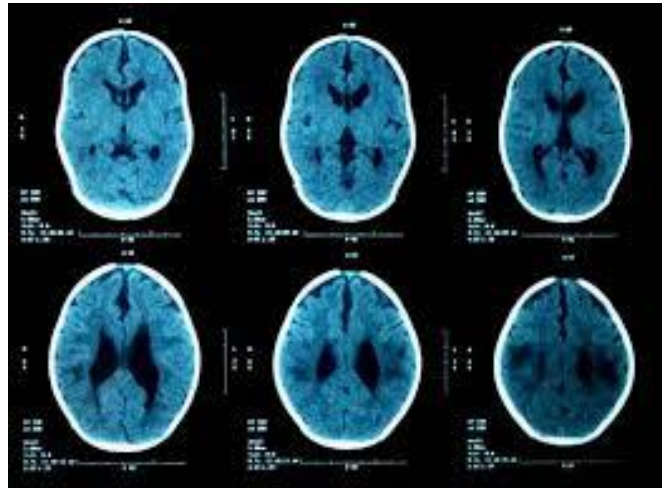
Així doncs aquesta prova consisteix en que un pacient estirat en una llitera, que prèviament se l'hi ha injectat el medi de contrast a través de via intravenosa, se li col·loca el tomògraf sobre la zona que es vol analitzar, en aquest cas el cervell, per poder iniciar un seguit de feixos de rajos X al seu voltant.

La prova acostuma a durar dels trenta segons a pocs minuts, i el resultat són imatges (fins i tot tridimensionals) del cervell de la persona.

El risc que té la prova és la gran quantitat de radiació que subministra el tomògraf, ja que pot acabar derivant en càncer, però si la prova no es realitza amb freqüència, té efectes innocus.



Fotografia 8. TC cervell sa.



Fotografia 9. TCS del seguiment d'un subjecte afectat per EIEE

3.6.4 SEQÜENCIACIÓ de l'EXOMA

L'exoma és la part del genoma que està format pels exons, és a dir, els fragments de DNA que es transcriuran per donar lloc a les proteïnes.

L'exoma humà està format per 180.000 exons i tots ells només representen l'1% del genoma total.

La seqüenciació de l'exoma es produeix quan molts gens poden causar una malaltia o quan no se sap quins gens la causen, de manera que amb ella es podrà saber l'ordre de les bases nitrogenades a la cadena de DNA. Per tant, s'estaria coneixent així tots els gens codificadors i, a partir d'aquí, es podria comparar el DNA del pacient amb el d'una persona sana, i així trobar on hi ha l'error i associar-lo amb una malaltia.

Aquesta darrera prova és la més important de totes ja que simplement amb una comparativa es podrà veure si el nadó tindrà EIEE o no.

Actualment podem fer aquesta seqüenciació exomàtica gràcies al Projecte Genoma Humà.

Aquest es va produir des de 1990 fins al 2003 i va resultar una iniciativa que promogué una col·laboració mundial amb el fi de localitzar i identificar tots els gens del DNA humà.

Tot i les respectives complicacions, finalment s'aconseguí l'objectiu i és per això que avui en dia es poden detectar moltes malalties poc freqüents simplement comparant la base de dades estàndard, la sana, amb la d'aquells que tenen alguna mena d'alteració.

És per això que en un futur és creu que els fàrmacs per tractar una malaltia genètica tindran relació amb els seus propis gens mutats.

3.7 TRACTAMENTS

L'EIEE és una malaltia que pel moment no se l'hi ha trobat una cura definitiva. El fet de que no gaudeixi d'un fàrmac infal·libre no nega la possibilitat d'utilitzar-ne d'altres, que intenten reduir els seus efectes al màxim així com millorar la qualitat i esperança de vida dels malalts.

D'aquesta manera, la patologia es basa en una gran supervisió i cura per part dels metges, i en l'ús de fàrmacs antiepilèptics.

Aquests, junt amb les quantitats que es subministraran, variaran segons el cas i el grau d'afectació que tingui.

En un primer moment, quan el nadó pateix una crisi epilèptica se l'hi administra fenobarbital juntament amb altes dosis d'àcid valproic. Això acostuma a frenar les convulsions. Posteriorment, si continuen els brots aguts se li proporciona clonazepam i midazolam³ amb la intenció de frenar l'atac i relaxar el nadó.

³ Pàgina 87 de l'índex de Referències

En estat d'observació, si els darrers medicaments no han obtingut bons resultats també és freqüent l'ús de la vigabatrina, el topiramato, la benzodiapina, el valproat, el levetiracetam o la piridoxina ¹⁻³, també coneguda com a vitamina B6, que s'administra com a complement alimentari. Tots ells són capaços de frenar atacs i convulsions epilèptiques i de provocar la relaxació d'un cervell sobreexcitat.

Darrerament, també ha tingut molt d'èxit la zonisamida ¹³. Resulta un fàrmac amb gran succés a Japó, que compta amb les mateixes garanties que els anteriors i, com ells, també necessita una vigilància mèdica, ja que sinó pot tenir efectes contraproductius greus. Tot i això, els seus resultats són millors, ja que són bastants casos a escala mundial en els que els nadons han patit grans avenços.

Deixant de banda els fàrmacs, últimament s'està posant de moda per a tractar la epilèpsia a qualsevol edat, un tipus de dieta anomenada cetogènica.

La Dieta Cetogènica consisteix en reduir la proporció de glúcids, és a dir, la dels hidrats de carboni, d'una manera força severa i, en conseqüència, augmentar la dels lípids, també coneguts com a greixos. D'aquesta manera, el cos ha de que recórrer als lípids, i s'està fomentant així la seva oxidació, fet que origina els cossos cetònics.

Els cossos cetònics s'originen al fetge i normalment s'oxiden en teixits perifèrics, però quan es troben davant d'un augment del catabolisme dels greixos, s'acumulen en excés i produeixen una cetosi i, en relació, neix una acidosi metabòlica, és a dir, un augment de l'acidesa del cos.

Aquests cossos cetònics seran usats pel cervell com a substitutius de la glucosa que aporten els hidrats de carboni, i l'acidosi que comporten en sí aquests, resulta d'alguna manera bona pels malalts d'epilèpsia, ja que provoca un mode de treballar diferent per al cervell.

La dieta està composta per una aportació de greixos del 80 o 90%, mentre que la dels hidrats és reduïda a un 10% o menys, depenent de la ingesta vitamínica, variable

^{1,3,13} Pàgina 87 i 88 de l'Índex de Referències

segons l'edat. En la dieta és prohibeix o és redueix dràsticament el consum de cereals, de farines, de llegums, i fins i tot, de fruites i verdures. A més, en varis moments el malalt es trobarà en dejú.

Aquesta dieta pot durar fins al tres anys o més, però sempre ha d'estar sota una supervisió mèdica, ja que si no es segueix adequadament pot tenir molts efectes secundaris que consten des de nàusees, vòmits, pèrdua de pes i marejos, fins d'altres més greus com irregularitats en els batecs cardíacs, orinar sang o dificultats motores i psicomotores.

Cal remarcar que en el cas de l'EIEE la dieta s'acostuma a recomanar quan el malalt ja és lo suficientment gran com per prendre farinetes o quan és apte per a menjar els aliments en si.

4. PART EXPERIMENTAL

Per a poder determinar quina és la causa de la malaltia que pateix un pacient, cal un previ procés al laboratori, on es seqüencia l'exoma i s'analitzen tots aquells gens associats prèviament a EIEE i aquells que, per funció, podrien ser responsables de la clínica que presenta el pacient. Gràcies a l'aplicació de diferents filtres que segueixen criteris qualitius, poblacionals i funcionals, en una gran part dels casos podrem deduir el potencial causant de la malaltia.

A partir d'aquí, caldrà transportar a la pràctica aquestes resultats amb estudis funcionals, com podria ser l'experimentació animal, per tal de provar la relació d'una mutació en un gen concret amb les EIEE.

4.1 PROTOCOL DE SELECCIÓ

4.1.1 Presentació del cas i estudi del DNA

1. Tot s'inicia quan un nen arriba a l'hospital amb les característiques pròpies de la malaltia. Així doncs els metges, a més d'intentar pal·liar les crisis epilèptiques i mantenir les seves constants estables, extreuen una mostra de sang a l'afectat i als seus pares [Annex I.i], sempre acompanyada de la signatura, per part dels pares, d'un consentiment informat per a poder ser inclòs dintre d'un estudi de recerca.
2. Al laboratori s'extreu el DNA de les mostres de sang.
3. Aquest s'envia al CNAG (Centre Nacional d'Anàlisi Genòmics), on es realitza una seqüenciació exòmica (*whole exome sequencing*) amb un seqüenciador HiSeq.
4. Els resultats obtinguts s'alineen amb el genoma de referència per tal d'identificar totes les variants pròpies del pacient.
5. En aquest punt, els resultats es retornen al laboratori de Neurologia Pediàtrica de la Vall d'Hebron, on seran analitzats al laboratori interessat.

Cal comentar que no totes les variants que hi pugui haver seran l'origen de la malaltia, és més, totes les persones, estiguin sanes o malaltes, pateixen mutacions al seu genoma, que els canvis siguin benignes, neutres o malignes serà el que determinarà l'estat final de l'individu. El problema només es produirà quan alguna d'aquestes variants resulti perjudicial.

4.1.2 Programa Informàtic: Processament de dades

Fins aquí, el procés és el mateix per a qualsevol patologia. És la anàlisi de les variants resultants el que caracteritzarà l'estudi de cada malaltia.

L'objectiu de la anàlisi de variants és reduir el nombre d'aquestes mitjançant l'aplicació de diferents filtres, per tal de trobar les mutacions en els gens que, per les seves característiques, tenen més probabilitat d'estar originant la malaltia. L'aplicació dels filtres, mitjançant l'ús d'un Excel, dependrà de es característiques de cada patologia.

Aquestes és la informació més rellevant que ens proporciona el resultat de l'exoma:

- Posició cromosòmica: número i coordenada cromosòmica per poder identificar el canvi al genoma de referència.
- Al·lel de referència i al·lel alternatiu: indica el canvi nucleotídic que pateix el pacient.
- Qualitat i cobertura de l'exoma resultant: paràmetre que ens indica com de fiable són els resultats i quantes vegades s'ha llegit cada base. Aquesta informació es proporciona amb diferents paràmetres, tant pel trio en general com per cada un dels individus que formen el trio.

A part, existeix un altre valor de qualitat anomenat *likelihood* que indica la probabilitat de que el genotip detectat per aquell individu sigui real.

- Gen i exó afectat per la mutació, canvi aminoacídic de la mutació, juntament amb les diferents isoformes de la proteïna.
- Predicció de l'impacte que tindrà la mutació sobre la funció del gen. Aquest pot ser *High, Moderate, Modifier* o *Low*.

En el cas dels *Highs*, la terminologia s'usarà en els casos que es produeixi algun canvi en les **posicions d'*splicings*** (senyals que marquen l'addició o no d'una seqüència genètica dins el RNA final), ja que això implica el fet d'incloure o extraure informació genètica de gran rellevància; en les **delecions en les quals es perd un tros d'exó**; en els ***Frame-shift***, ja que resulten mutacions que a la llarga produeixen un STOP que escurça la proteïna final; en els propis **STOPS** o en la **pèrdua d'un d'ells**, ja que implicaria proteïnes més llargues de l'esperat.

En els cas dels *Moderate* la terminologia s'usarà bàsicament quan es produeixi un canvi d'aminoàcid.

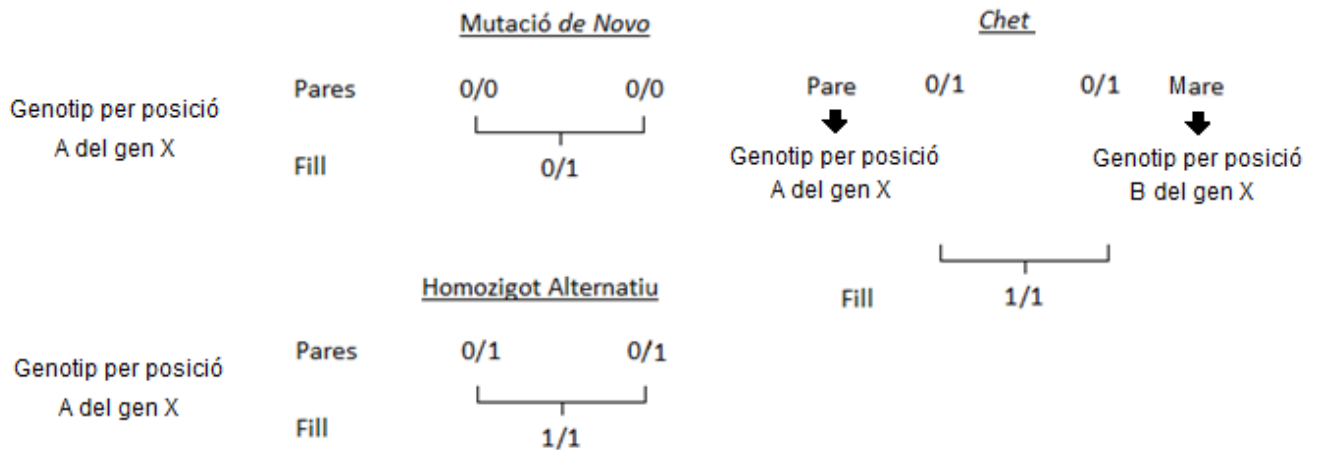
En el cas dels *Modifier* la terminologia s'usarà per a referir-se a alguna variant desconeguda, tot i que des d'un inici ja no es tindran en compte.

En el cas dels *Low* la terminologia s'usarà per a expressar un canvi en el nucleòtid però no en l'aminoàcid, pel que ja des de l'inici es determina com a variant no rellevant.

En el cas de l'EIEE els gens que voldrem obtenir hauran de produir un efecte *High* o *Moderate*, els altres, per ara, no es tindran en compte.

- Paràmetres de Freqüència Poblacional recollides en diferents bases de dades, tant en bases de dades de població sana com de malalties.

- Genotip dels pares i del pacient, i per tant, tipus d'herència de cada variant (*de novo*, homozigota o heterozigot compost). L'al·lel de referència s'indica amb un 0 i l'alternatiu amb un 1.



Fotografia 10. Representació dels diferents orígens genètics de l'EIEE amb els respectius al·lels de referència i alternatius.

4.1.3 Filtratge per al cas d'estudi

Un cop es coneixen totes les columnes i el que representen, es realitzarà el filtratge als resultats de cada pacient:

1. Per l'efecte, l'impacte que causa la mutació. Només s'escolliran els paràmetres *High* i *Moderate*.
2. Per freqüència poblacional. Es realitzarà un filtratge numèric en el qual es voldran obtenir resultats iguals o menors que 0,01, en les diferents bases de dades que s'inclouen.
3. Per qualitat. Els resultats hauran de ser majors o iguals a 20 (el màxim són 999).
5. Per *coverage*, per profunditat. Aquesta haurà de ser igual o més gran que 10.

A continuació s'anirà cap a les columnes situades més cap a la dreta de l'Excel, ja que fan referència als exomes de cada individu del trio, on primer hi ha la informació del pacient, després la de la mare i finalment la del pare.

1. Per les columnes que fan referència al *coverage*, es realitzarà un filtratge que ha de ser igual o major que 10.
2. Per les columnes que fan referència a la GQ, es realitzarà un filtratge major o igual que 20.
3. Per les columnes que fan referència a la dada estadística en la que s'expressa la possibilitat de que el genotip que s'està dient resulti real, s'eliminaran totes aquelles que en dues posicions siguin menors que 20.

4.1.4 Obtenció de darreres mutacions possibles: Programa IGV analysis

L'*IGV analysis* es tracta d'un control de qualitat en el qual es permet veure el context, és a dir, la zona al voltant de la mutació. A més, gràcies al *allele balance*, es podrà saber quantes vegades s'ha llegit cada al·lel, en quina posició dels fragments de la llibreria es troba la mutació (ens diu si hi ha més possibilitat o no de que sigui un error i no pas una mutació) i les vegades que s'ha llegit cada cadena en *forward* o *reverse*.

Casos on la lectura de la variant sigui desequilibrada en relació a la direcció de la cadena i proporció referència / alternatiu, descartarien la validesa de la variant.

4.1.5 Comprovació a l'EXAC Browser

Permet veure si alguna variant s'ha descrit anteriorment per l'EIEE o no.

4.1.6 Comprovació al UCSC Browser

L'*UCSC Browser* es tracta d'una base de dades on s'hi pot trobar el genoma de referència, i es dona informació de regions repetitives del genoma, polimorfisme, variants descrites prèviament i conservació de cada regió del genoma.

1. Al entrar-hi, s'ha de seleccionar el quadrat "*Genome Browser*".
 2. Clicar "*take me to genome-euro.ucsc.edu*".
 3. Clicar "*assembly*", és a dir, la versió genòmica corresponent al febrer del 2009, la usada pel CNAG per a fer la crida de variants.
 4. Per buscar el cromosoma que es vulgui, s'haurà de copiar "chr", més el nombre del cromosoma que es tracti, més dos punts i finalment, el nombre corresponent a la coordenada cromosòmica de la mutació.
 5. A l'entrar-hi, es veurà el nucleòtid que es modificarà. Si es miren les fletxes que faran referència a la seqüència, es podrà saber si estarà en *forward* o *reverse*.
 6. Si es centralitza en l'apartat titulat "*100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP*" es podrà veure el percentatge de conservació del nucleòtid (com més alt i si a més, compta amb una línia rosa, voldrà dir que la seva conservació serà major).
 7. Si s'observa l'apartat titulat "*Multiz Alignments of 100 Vertebrates*" es podrà veure la conservació d'aquest en diferents espècies.
- El motiu pel qual fixar-se en la conservació és tan important és degut al fet que, com més conservada estigui la posició del nucleòtid que pateix la mutació, la variant, més possibilitats hi ha que, aquest canvi que es produirà posteriorment en l'aminoàcid produeixi la mutació, i per tant resulti l'origen de l'EIEE que pateix el pacient en concret.
8. En la mateixa pàgina de l'UCSC Browser, pitjant el botó dret del ratolí s'ha d'entrar a l'apartat "*Refseq Genes*".
 9. S'ha de descarregar la seqüència del gen i copiar-la en un Word.
 10. Eliminar totes les introduccions que es pugin haver fet.
 11. Buscar el lloc exacte on s'ha produït la mutació i identificar-lo per a treballar-ho posteriorment.

4.1.7 Validació de la mutació amb Seqüenciació Sanger

La metodologia explicada fins ara, al resultar força nova, es complementa amb, la tecnologia de seqüenciació tradicional, anomenada **Sanger**.

Es tracta d'una tècnica ideada per Frederick Sanger l'any 1975 que consisteix bàsicament en la seqüenciació del DNA a partir de la replicació d'aquest, mitjançant la introducció de nucleòtids marcats amb fluorescència.

4.1.7.1 Disseny dels Primers

Els primers o oligonucleòtids, unes seqüències formades per unes 20 bases, complementàries al fragment de DNA que es vol replicar, que es trobaran a banda i banda de la mutació obtinguda per l'exoma, es dissenyaran al laboratori.

Són essencials en el procés ja que gràcies a ells el DNA polimerasa pot començar a afegir nucleòtids.

Per a dissenyar-los s'utilitza el programa *Primer 3*. A més, per a poder comprovar si els *primers* dissenyats són els adequats i aniran bé per a la seqüència, s'hauran de filtrar per una pàgina web.

Per a poder posar a punt els *Primers*, en primer lloc s'ha de fixar la temperatura. Aquesta es calcula segons la quantitat d'Adenines, Citosines, Timines i Guanines que tenim, ja que per cada A-T s'haurà d'augmentar dos graus centígrads la T^a i per cada C-G s'haurà d'augmentar quatre graus centígrads, ja que tenen tres ponts d'hidrogen vers els dos de l'A-T.

Si tot i així els resultats no són els desitjats, es pot anar modificant les concentracions del Magnesi, de DMSO (enganxa la polimerasa a la seqüència), d'ADN o dels mateixos *Primers*, és a dir, de tots els components que s'afegeixen per a realitzar el procediment que es produirà a continuació, la PCR.

4.1.7. I .a. Filtratge: Primer 3 Input

1. En el Word on hi ha tota la seqüència del gen amb la mutació ben marcada, es seleccionaran uns 70-80 nucleòtids per davant i per darrera i es deixaran entre tancaments, és a dir, entre [].
2. Anar a la pàgina d'internet Primer 3 Input i copiar tot el fragment que hi ha entre els tancaments més dos o tres línies per sota i per sobre.
3. Baixar la pàgina, fins arribar a l'apartat "*General Primer Picking Conditions*" i a l'apartat "*Primer Size*" s'ha de marcar el mínim com a 20, l'òptim com a 22 i el màxim com a 24.
4. A l'apartat "*Primer Tm*", que fa referència a la temperatura, la mínima ha de ser 57, l'òptima 59 i la màxima 67.
5. Modificar el tant per cent de Citosines i Guanines que tindrà el *primer (Primer GC%)* ja que el mínim ha de ser 30, l'òptim 60 i el màxim 80.
6. Clicar el botó "*Pick Primers*".
7. Al obtenir-los, com més zeros s'hi trobin en el *primer* en apartats com "*any_th*", "*3'_th*" o "*hairpin*" i com més igualades es trobin les temperatures (*tm*) entre el primer *forward* i el *reverse* millor, ja que voldrà dir que aquests podran actuar en condicions molt semblants i no caldran masses modificacions.

4.1.7. I .b. Comprovació Disseny dels *Primers*

4.1.7.I.b.I UCSC Browser

1. Anar a l'apartat superior de "*tools*".
2. Seleccionar "*In-silico PCR*".
3. Comprovar que la versió és la del febrer del 2009.

4. Copiar el *left primer* que s'ha obtingut en la pàgina Primer 3 Input, i enganxar-lo a aquesta en l'apartat "*Forward Primer*". El procés serà el mateix per a l'altre *primer*.
5. Vigilar que al tros que hem cercat i que se'ns veu representat no caigui alguna repetició.
6. Comprovar que a l'apartat "*repeat masker*" no s'hi trobi cap caixa de color gris, ja que voldrà dir que es tracta d'una zona repetitiva.

4.1.7.1.b.II BLAST

Es tracta d'una pàgina d'internet que s'encarrega d'alinejar qualsevol seqüència desitjada amb el genoma.

1. A l'entrar-hi, anar a l'apartat *primer-BLAST* present en la secció "*Specialized BLAST*".
2. A "*Primer Parameters*" s'ha de col·locar les seqüències del *primer* en *forward* i *reverse*.
3. Baixar a l'apartat "*Database*" que es troba dins de la secció "*Primer Pair Specificity Checking Parameters*", i en el lloc del "*Refseq mRNA*" s'ha de posar "*Genome*".
4. Clicar "*get primers*".
5. Comprovar que el "*product length*" d'aquesta pàgina sigui el mateix que el "*product size*" de la de Primer 3 Input.
6. Veure que tots els nombres que s'obtidran, pertanyents al *primer* en *forward* i *reverse*, siguin tots diferents.

Si es compleixen totes aquestes característiques tant en la primera pàgina com en la segona, significarà que els *primers* dissenyats són els correctes i només quedarà deixar-los ben marcats al Word en la seqüència (el que es troba en format *reverse* se li haurà de realitzar la seva seqüència complementaria. Al fer-ho, ja el podrem deixar ben marcat).

4.1.7. II PCR

Un cop s'obtenen els *primers* adequats, s'agafarà el DNA, un *buffer* especial, que conté tot el necessari per a que la polimerasa funcioni, magnesi, dNTPS, és a dir, nucleòtids que la polimerasa anirà afegint, i en darrer lloc, la polimerasa. A continuació, s'iniciarà la PCR [Annex I.ii].

Per a poder comprovar que els resultats de la PCR han sortit correctament, es correrà un gel d'agarosa, i després d'unes hores de repòs, es podrà veure si les bandes de DNA han sortit amb la mida que es volia. N'hi haurà quatre, una per al pacient, una per a la mare, una per al pare i una per a l'aigua sola, sense DNA, ja que si en els resultats aquesta queda tacada, significarà que la mostra està contaminada o hi ha hagut algun error en el procés.

4.1.7. III Purificació

Es realitzarà després de la PCR. Gràcies a ella s'extraurà tots els productes que puguin estar molestant a la seqüenciació. [Annex I.iii]

4.1.7. IV Reacció de Seqüència

1. Introducció dels resultats de la PCR purificada, d'un sol primer (o bé el *forward* o bé el *reverse*), d'un *buffer* amb la polimerasa, del magnesi i de dNTP i de dNTPS marcats amb fluorescència.

En aquesta reacció la funció de la polimerasa només serà amplificar una de les dues cadenes (que dependrà del *primer* que s'haurà afegit) i aturar la seqüenciació quan es trobi amb un dNTP marcat amb fluorescència.

2. La polimerasa s'anirà aturant cada cop que es trobi un dNTP marcat amb fluorescència, de manera que el resultat final serà milions de fragments amb llargades completament diverses amb el darrer nucleòtid marcat.

3. A aquest resultat obtingut se li correrà un gel d'agarosa de manera que es munta una espècie de puzle on es veu tota la seqüència amb la mutació.

5. Els resultats es presenten en format d'electroferograma.

6. Gràcies al *Bioedit* (tot i que es poden usar altres programes informàtics) es podrà veure els resultats dels electroferogrames en forma de pics, de manera que la normalitat regiria en un pic i per a la mutació un doble pic.

També cal comentar que si s'afegeix algun fragment o es produeix una deleció, a partir d'aquests, tots els resultats tindran format de doble pic.

Al finalitzar tot aquest procés [Annex I.iv], que es produeix des de l'obtenció de la sang del pacient, fins analitzar els resultats en forma d'electroferograma, s'haurà comprovat si realment aquella mutació que es prediu podria ser la causa, realment es troba en el genoma del pacient.

El següent pas seria transportar aquests estudis teòrics a la pràctica. En el cas de l'EIEE, és l'Hospital Universitari de Bellvitge que ha realitzat un pas més i gràcies als *Danio rerio*, els peixos zebra, estan intentant comprovar si aquests gens mutats són veritablement l'origen de la malaltia. Tot i això, encara queda molta feina per a fer pel que encara no se n'han pogut concloure resultats significatius.

El motiu pel qual es va triar el peix zebra és degut a que genèticament és molt més similar als humans que no pas la *Drosophila melanogaster*¹⁴ (la mosca del vinagre) o que els *Caenorhabditis elegans*¹⁴ (els cucs de terra). Carlos Torroja, investigador del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares) afirmà que "el 71% dels gens humans tenen la seva contrapartida en el peix, així com el 82% dels 3.200 gens humans implicats en alguna malaltia"¹⁵.

^{14,15} Pàgina 88 de l'índex de Referències

A més, són més fàcils de manipular i mantenir que no pas les cries de ratolí ¹⁴ i són capaços de reproduir atacs epilèptics pel que resulten idonis per a la realització de fàrmacs contra la epilèpsia, i per a la investigació de l'EIEE en si.



Fotografia 11 . Peix Zebra

A continuació s'aplicarà el protocol a cinc casos reals, les dades dels quals s'han proporcionat de manera anònima per a la realització d'aquest treball.

¹⁴ Pàgina 88 de l'Índex de Referències

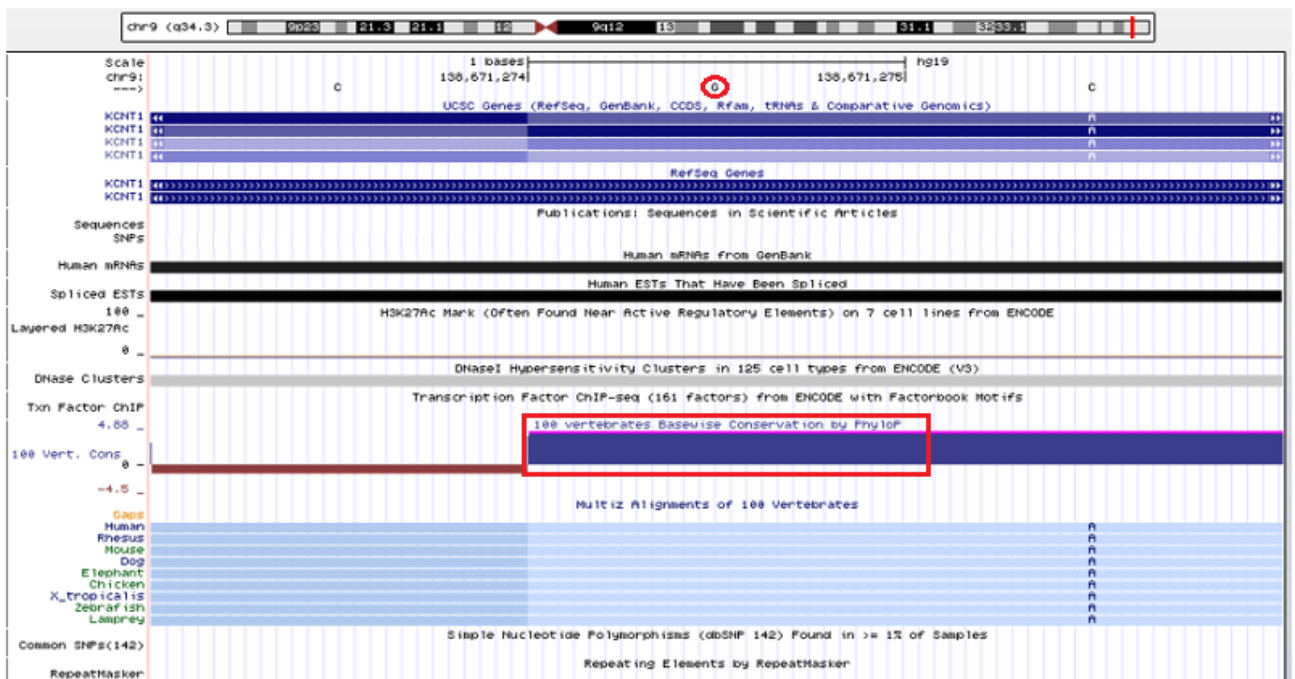
4.2 PACIENT 1

Gràcies als resultats del primer filtratge en l'Excel, en el qual s'apliquen tots els paràmetres descrits en el protocol i de la posterior comprovació en l'*Exac Browser* i l'*UCSC Browser* (el programa *IGV analysis* estava inoperatiu en els moments de cerca), es va poder arribar a la conclusió que en el pacient 1 d'entre totes les variants era la del cromosoma 9, posició 138671275, la que podia causar-li la malaltia, ja que el gen que es veia afectat era el *KCNT1*, descrit anteriorment en altres pacient de recerca per l'EIEE.

Variant	Chrom	Position	Consequence	Filter	Annotation	Flags	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
9:138671257 C / T	9	138671257	p.Arg929Cys	PASS	missense		2	121110	0	0.00001651
9:138671262 C / T	9	138671262	p.Phe929Phe	PASS	synonymous		3	121114	0	0.00002477
9:138671272 C / T (rs150395210)	9	138671272	p.Arg933Cys	PASS	missense		1	121106	0	0.000008257
9:138671274 C / T	9	138671274	p.Arg933Arg	PASS	synonymous		9	121100	0	0.00007432
9:138671289 C / T	9	138671289	p.Tyr938Tyr	PASS	synonymous		1	121018	0	0.000008263

Fotografia 12. Conservació del cromosoma 9, posició 138671275 a l'*EXAC Browser*.

Si s'observen les variants que es troben en el cromosoma 9, es veu que se'n produeixen d'altres però cap la que tindria el pacient, pel que està representant que aquesta variant no s'ha descrit abans i que per tant, s'hauria de continuar la investigació per a poder afirmar si és l'origen de l'EIEE o no.



Fotografia 13 . *UCSC Browser*. Canvi que es produeix en el gen (apareix una G i tindria que aparèixer una A).

En aquesta imatge del programa *UCSC Browser* es pot veure el canvi (encerclat en vermell) que es produeix en el gen *KCNT1*, ja que el pacient té una Guanina enlloc d'una Adenina.

A més, si s'observa l'apartat "*100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP*" es veu que és una regió que està molt conservada, ja que el percentatge (en blau) és molt alt i a més compta amb una regió rosa, que simbolitza una conservació molt i molt elevada.

Si s'observa també l'apartat "*Multiz Alignments of 100 Vertebrates*" es veu que el codó que formarà aquesta Guanina, més les dos Citosines que la segueixen, formaran segons la taula universal de codons, l'aminoàcid Alanina (Ala), quan en realitat tothom hauria de tenir l'aminoàcid Treonina (Thr) que es forma a partir del codó Adenina més dos Citosines.

Així doncs, a partir d'aquests resultats, en els quals veiem un canvi de nucleòtid en una regió molt conservada i posteriorment un canvi d'aminoàcid, ja es podria començar a determinar que possiblement aquest canvi d'aa, podria fer variar la proteïna i iniciar així una cadena d'elements que no farien la funció que els pertocaria, podent acabar provocant l'EIEE.

Gràcies als resultats obtinguts en els darrers programes d'internet, es pot concloure que d'entre totes, la variant del cromosoma 9, posició 138671275, afectant el gen *KCNT1* és la que té més possibilitats d'originar la malaltia.

A partir de les taules del següent Excel també es pot extraure altra informació com per exemple el fet de que es canviï una Guanina per una Adenina i que per tant l'efecte que causa és *Moderate*; que el paràmetre de qualitat és el màxim (999); que resulta un gen codificant; que el seu *coverage* és de 212; que es tracta d'un *SNP*, un canvi puntual i que es tracta d'una mutació *de-novo*, és a dir, que apareix per primera vegada en la família. Fet que es pot comprovar altra cop mirant els genotips del pacient i dels seus pares, ja que el primer és 0 / 1 i els darrers són 0 / 0.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	Effect	Effect_Impact	functional_Clas	Codon_Change	amino_Acid_chan	Gene_Name	Gene_BioType
chr3	138671275	G	A	889	SYNDUS_CODING	MODERATE	ENSEMBLE	GeofAcc	GeofAcc	NTUKCNTUKCNT1	lingprotein_coding
M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
Coding	Transcript	Exon	DP	DP4	INDEL	HVE	PV4	VDB	FQ	GTI	CHET
:CODING:CODING:ENST00000377757	6671295_138671316		212	73,903,112	SNP	NA	0,65,0,21,11	0,950395	889	de-novo	NA
Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
EIEE	GMAF	GSA	G5	CNAGI	CNAGS	RS	dbSNPBuildID	lrt	phyloP	avsift	pp2
KCNTUKCNT1								1	0,996557	0,11	0,012
AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV
mt	gerp**	LRT_pred	LRT_score	LRT_Omega	PhyloP_score	SIFT_score	polyphen2_score	rotationTaster	rotationTaster_sc	GERP_MFI	GERP_RIS
0,537532	3,61	U	1	0	0,996557	0,89	0,103	NA	NA	3,61	3,61
AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH
esp5400_all	esp5400_ea	esp5400_aa	sb0.05	medf5	bqb0.05	msb30	N850_GT	N850_DP	N850_GL	N850_GQ	N850_SP
							0,01	55	NA	99	0
BI	BJ	BK	BL	BIM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT
N850_PL	N851_GT	N851_DP	N851_GL	N851_GQ	N851_SP	N851_PL	N852_GT	N852_DP	N852_GL	N852_GQ	N852_SP
255,0,255	0,00	87	NA	99	0	0,255,255	0,00	63	NA	99	0
BU											
N852_PL											
0,173,205											

Fotografia 14 . Excel de la variant del pacient 1.

Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoc

KEYS (in order of precedence):

```
***** target
>>>>> left primer
<<<<<< right primer
```

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
1 LEFT PRIMER	120	21	59.45	57.14	0.00	0.00	0.00	ctgagacctctacaaccacc
RIGHT PRIMER	361	20	60.32	60.00	0.00	0.00	0.00	ctttcccttgagcccccttc
PRODUCT SIZE: 242, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
2 LEFT PRIMER	116	21	59.45	57.14	0.00	0.00	0.00	caccctgagacctctacaac
RIGHT PRIMER	352	21	61.46	57.14	0.00	0.00	0.00	gagccccctttctccactctt
PRODUCT SIZE: 237, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
3 LEFT PRIMER	89	20	60.11	55.00	1.18	1.18	0.00	ccccacagccacatgatcat
RIGHT PRIMER	354	20	61.20	60.00	0.00	0.00	0.00	ctgagccccctttctccact
PRODUCT SIZE: 266, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								

Statistics

	con	too	in	in	not	no	tm	tm	high	high	high	high	high	high
	sid	many	tar	excl	ok	bad	GC	too	any_th	3'_th	hair-	pin	poly	end
	ered	Ns	get	reg	reg	GC	clamp	low	high	compl	compl	pin	X	stab
Left	422	0	0	0	0	16	0	1	175	0	4	74	82	0
Right	546	0	0	0	0	11	0	1	192	0	0	0	41	0

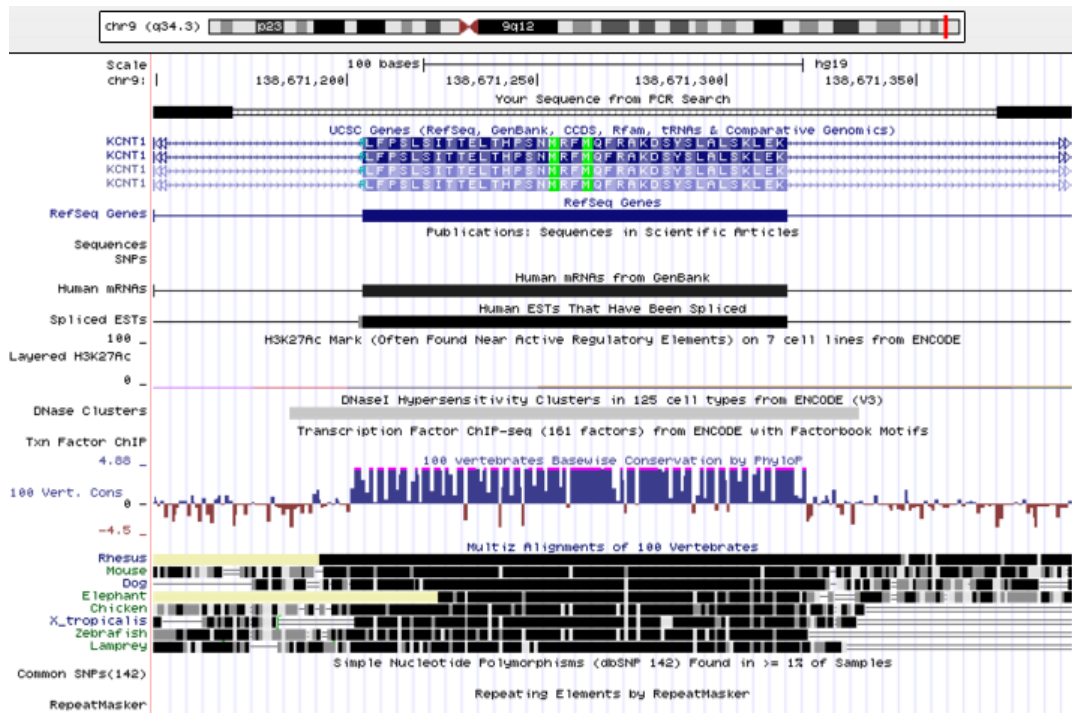
Pair Stats:

considered 36324, unacceptable product size 36262, tm diff too large 57, primer in pair overlaps a primer in a better pair 114593, ok 5 libprimer3 release 2.3.6

Fotografia 15. Primers dissenyats a la pàgina Primer 3 Input.

D'entre aquests possibles *primers*, es valorarà com a primera opció el que ens trobem en primer lloc. Compta amb molts zeros als apartats “*any_th*”, “*3'_th*” o “*hairpin*” i les temperatures del *primer* en *forward* o *reverse* disten molt poc, 0,08 graus centígrads.

Ara ja es pot comprovar si aquest que s'ha escollit és l'ideal o no. Per això, s'haurà d'anar a la pàgina *UCSC Browser* i aplicant paràmetres s'obindrà el següent:



Fotografia 16. Comprovació *primer* escollit a *UCSC Browser*.

En aquesta imatge es pot comprovar el fet de que en la variant no hi ha cap zona repetitiva ni cap caixa gris en l'apartat "repeat masker" (si l'hagués, també simbolitza una repetició).

Per poder comprovar per una altra via si els primers dissenyats són els correctes, s'haurà d'anar a la pàgina BLAST.

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGACCTCCTACAACCACCATG	21	59.09	52.38	4.00	4.00
Reverse primer	CCCCTTTCTCCCACTCTTTCT	21	59.01	52.38	1.00	0.00

Products on target templates
 >NC_000009.12 Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p2 Primary Assembly
 product length = 227
 Features associated with this product:
[potassium channel subfamily T member 1 isoform 1](#)
[potassium channel subfamily T member 1 isoform 2](#)

Forward primer	1	AGACCTCCTACAACCACCATG	21
Template	135779307	135779327
Reverse primer	1	CCCCTTTCTCCCACTCTTTCT	21
Template	135779533	135779513

Fotografia 17. Comprovació primer escollit a BLAST.

En aquesta imatge del programa, es pot comprovar com el "product length" (227) és el mateix que el "product size" de la pàgina Primer 3 Input. A més, si es baixa la pàgina Blast en la qual s'han obtingut els resultats de la imatge, es pot veure que els nombres corresponents al forward i reverse de la resta de possibles primers són tots diferents entre sí.

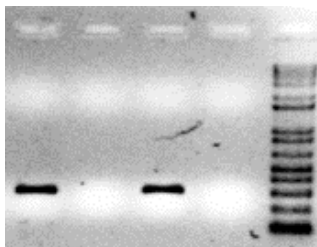
Aquest cúmulo de circumstàncies serveixen per verificar i acceptar el primer que s'ha dissenyat, format per AGACCTCCTACAACCACCATG en forward i CCCCTTTCTCCCACTCTTTCT en reverse. Aquests es deixaran ben especificats en el Word on es troba la seqüència (s'ha de recordar que per a al primer en reverse se l'hi haurà de fer el complementari). El resultat serà el següent:

```
cgtgggacctgcccctgagacccccatagccaagacagtgggccctgcccctgagacccccccacagccatgggaccccgcctgagac
ccccacagccacatgatcatgggccccacctgagacctcctacaaccaccatgggccccgcctgagccgct[gcctccccagGC
TCTTCCCCAGCCTCAGCATCACACGGAGCTCACCCACCCTTCCAACATGCGCTTCATGCAGTTCCGC G
CCAAGGACAGCTACTCTCTGGCTCTTCCAACTAGAAAAGgtgagcagccctgccccgtgccagctgccaccccag
aatccc]agaagagatgggagaaaggggctcaggggaaagggggccagtgccatgggaggctgggctcctgccccctcctgctggg
gaactcaggagatggcgtggggggcccagcatggacaggggtgctctgatggtggaaccaggagatggaggcagggcgt
```

Ara es realitzarà la PCR afegint tots els components necessaris.

	MOSTRA	GEN	Tm	MIDA (pb)
1	EP006	<i>KCNT1</i>	62	299
2	EP012	<i>KCNT1</i>	62	299
3	EP013	<i>KCNT1</i>	62	299
4	C-			

Testar en agarosa 1,5% (TBE 1X):

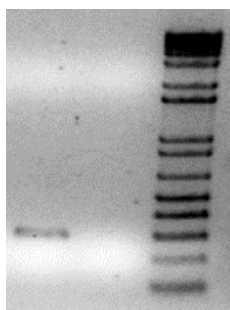


Fotgrafia 18. PCR amb primer que s'ha dissenyat. Mare error.

Com que al realitzar la tècnica només van sortir les bandes del pacient i del pare, però no la de la mare, i al no sortir cap banda a la part de l'aigua, volia dir que realment la PCR havia estat realitzada correctament però per algun motiu la de la mare no va sortir bé, pel que es va realitzar una altra específicament per ella.

	MOSTRA	GEN	Tm	MIDA (pb)
1	EP012	<i>KCNT1</i>	62	299
2	C-			

Testar en agarosa 1,5% (TBE 1X):



Fotgrafia 19. PCR en la qual la mare ja es veu.

Amb aquesta ja es van obtenir els resultats desitjats en el gel d'agarosa 1,5% i per tant la tècnica va sortir correctament.

A les mostres de la PCR se li van realitzar la Purificació amb el procediment adequat, per poder acabar de netejar alguna possible brutícia.

Mostres per a purificar:

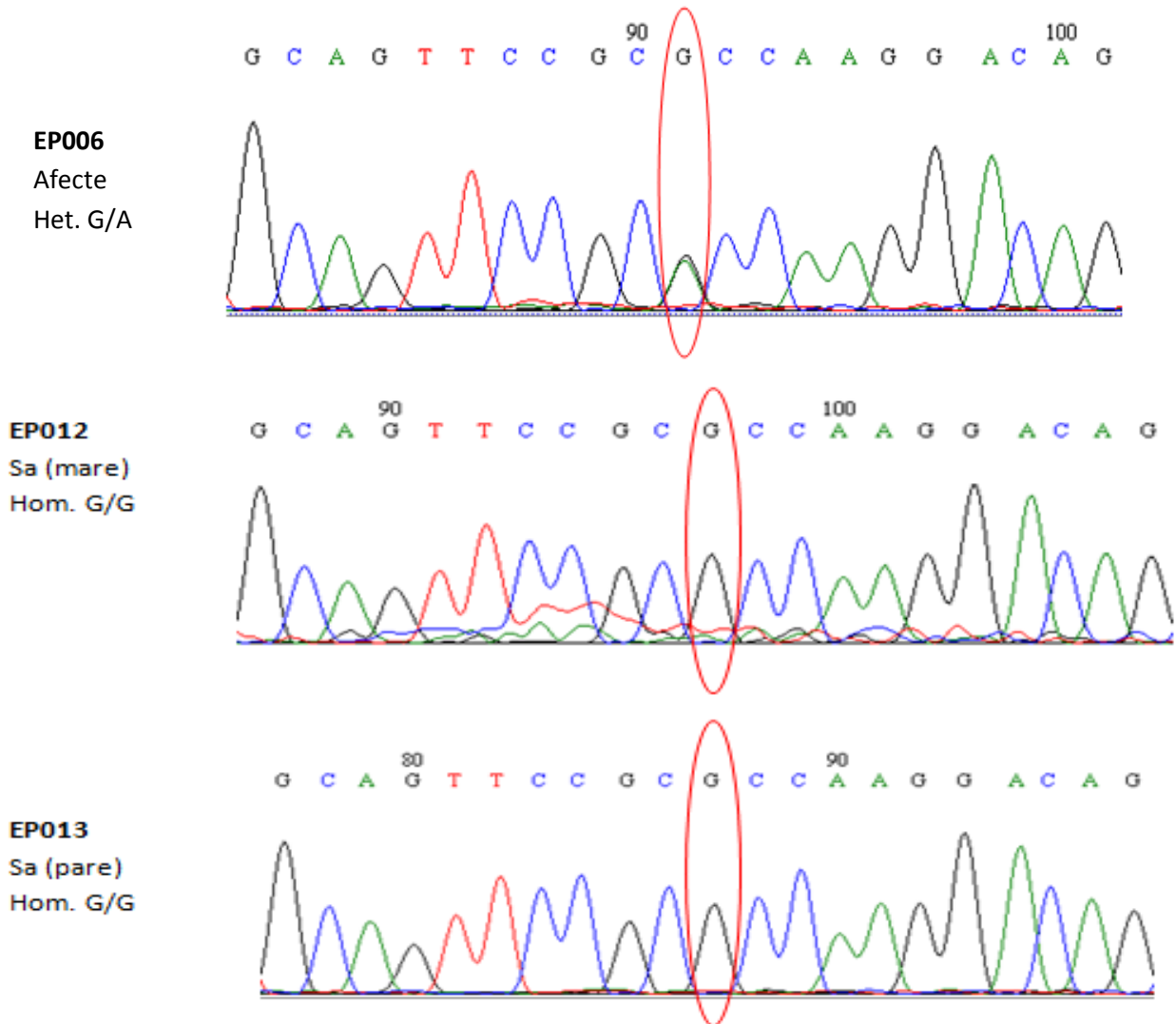
Num	PACIENT	PCR
1	EP006 KCNT1	PCR 3246-13
2	EP012 KCNT1	PCR 3247-13
3	EP013 KNCT1	PCR 3246-13

I finalment es va produir la seqüenciació de les mostres purificades.

Mostres:

1	EP006_KCNT1_350635_F (PUR 671/13 14)	2µl
2	EP012_KCNT1_350635_F (PUR 671/13 15)	2µl
3	EP013_KCNT1_350635_F (PUR 671/13 16)	2µl

En el procés, la polimerasa es va aturar cada cop que es va trobar amb un dNTP de fluorescència, de manera que el resultat final va ser milions de fragments amb llargades completament diverses amb el darrer nucleòtid marcat. A aquests se'ls hi va córrer un gel d'agarosa i es van enviar a un equip especialitzat del centre on gràcies al *Bioedit* es van poder veure en forma d'electroferogrames:



Fotografia 20. Electroferogrames del pacient, mare i pare en el *Bioedit*.

En la imatge es pot comprovar com en la mateixa regió on al pacient se li produeix la variant, ell compta amb un doble pic mentre que els seus pares solament en tenen un.

Amb això es pot concloure que aquesta mutació estudiada és la causa de l'EIEE, ja que ha estat descrita prèviament en un pacient amb aquesta patologia.

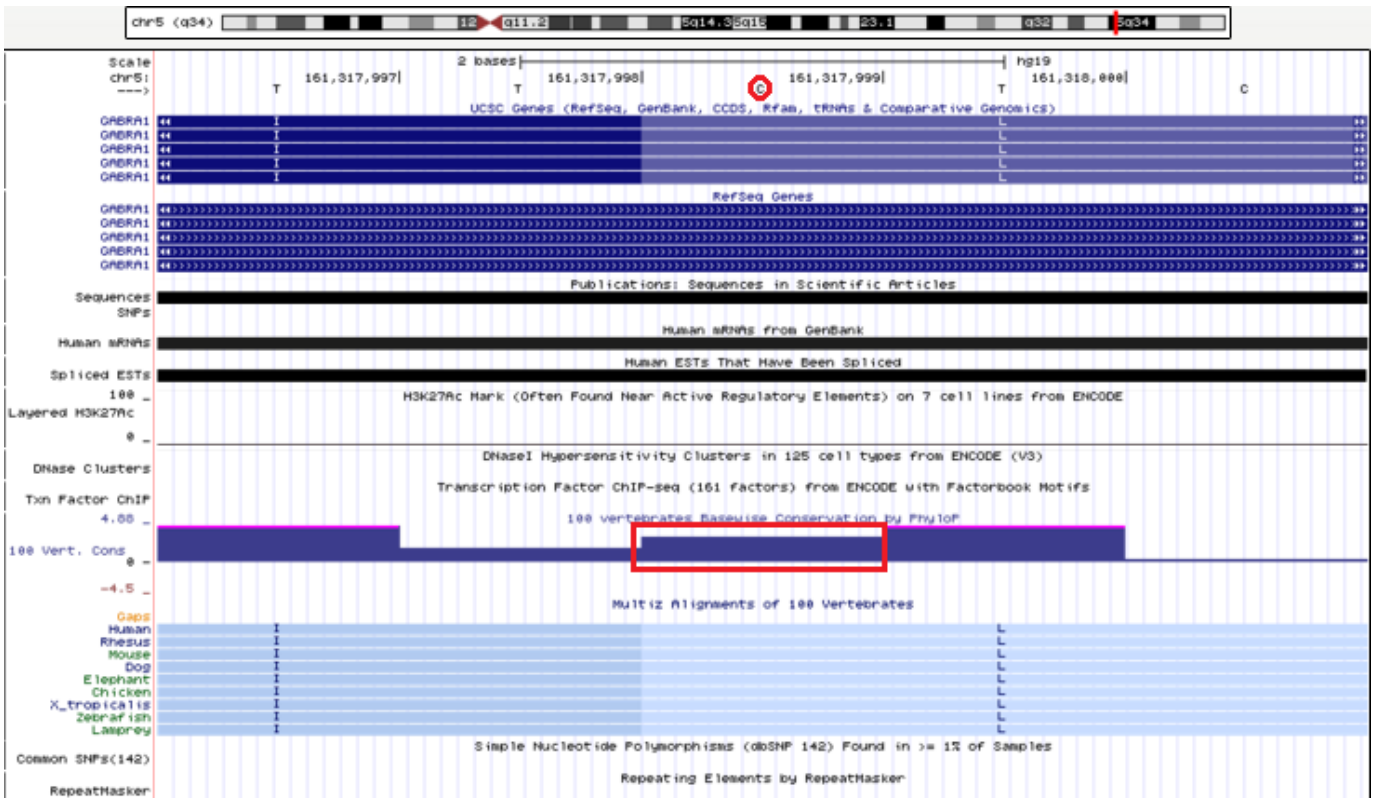
4.3 PACIENT 2

Gràcies als resultats del primer filtratge en l'Excel, en el qual s'apliquen tots els paràmetres descrits en el protocol i de la posterior comprovació en l'*Exac Browser* i l'*UCSC Browser* (el programa *IGV analysis* estava inoperatiu en els moments de cerca), es va poder arribar a la conclusió que en el pacient 2 d'entre totes les variants era la del cromosoma 5, posició 161317999, la que podia causar-li la malaltia, ja que el gen que es veia afectat era el GABRA1, descrit anteriorment en altres estudis d'altres centres de recerca per l'EIEE.



Fotografia 21. Conservació del cromosoma 5, posició 161317999 a l'*EXAC Browser*

En aquesta imatge de l'*EXAC Browser* es pot veure com no hi ha cap variant descrita anteriorment i vol dir que s'hauria de continuar la investigació per a poder afirmar si és l'origen de l'EIEE o no.



Fotografia 22. *UCSC Browser*. Canvi que es produeix en el gen (apareix una C i tindria que aparèixer una G)

En aquesta imatge del programa *UCSC Browser* es pot veure el canvi (encerclat en vermell) que es produeix en el gen *GABRA1*, ja que el pacient té una Citosina enlloc d'una Guanina. A més, si s'observa l'apartat "*100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP*" es veu que és una regió que està conservada, ja que el percentatge (en blau) és força alt.

Si s'observa també l'apartat "*Multiz Alignments of 100 Vertebrates*" es veu que el codó que formarà aquesta Citosina, més la Timina (que serà l'Uracil) i l'altra Citosina que la segueixen, formaran segons la taula universal de codons, l'aminoàcid Leucina (Leu), quan en realitat tothom hauria de tenir l'aminoàcid Valina (Val) que es forma a partir del codó Guanina, Timina (que serà l'Uracil) i Citosina.

Així doncs, a partir d'aquests resultats, en els quals veiem un canvi de nucleòtid en una regió conservada i posteriorment un canvi d'aminoàcid, ja es podria començar a determinar que possiblement aquest canvi d'aa, podria fer variar la proteïna i iniciar així una cadena d'elements que no farien la funció que els pertocaria, podent acabar provocant l'EIEE.

Gràcies als resultats obtinguts en els darrers programes d'internet, es pot concloure que d'entre totes, la variant del cromosoma 5, posició 161317999, afectant el gen *GABRA1* és la que té més possibilitats d'originar la malaltia.

A partir de les taules del següent Excel també es pot extraure altra informació com per exemple el fet de que es canviï una Citosina per una Guanina i que per tant l'efecte que causa és *Moderate*; que el paràmetre de qualitat és el màxim (999); que resulta un gen codificant; que el seu *coverage* és de 175; que es tracta d'un *SNP*, un canvi puntual i que es tracta d'una mutació *de-novo*.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	Effect	Effect_Impact	unctional_Clas	Codon_Changenino	Acid_chan	Gene_Name	Gene_BioType
chr5	161317999	C	G	999	MODERATE	MISSENSE	tcCtc/Gtc/Ctc/Gtc	267Y/L267Y/L267Y/L267Y	GABRA1	GABRA1	ligprotein_coding
M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
Coding	Transcript	Eson	DP	DP4	INDEL	HVE	PV4	YDB	FQ	GTI	CHET
coding	ENST00000444819	317904_161318056	175	85,79,9,17	SNP	NA	0,39,0,1,1,0,39	0,2611955	999	de-novo	NA
Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
EIEE	GMAF	G5A	G5	CMAGI	CNAGS	RS	dbSNPBuildID	lrt	phglop	avsift	pp2
GABRA1	GABRA1										
AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV
mt	gerp**	LRT_pred	LRT_score	LRT_Omega	PhyloP_score	SIFT_score	polyphen2_secon	Taster_pi	Taster_sc	GERP_NIR	GERP_RS
AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH
esp5400_all	esp5400_ea	esp5400_aa	sb0.05	mrd15	bqb0.05	msb30	N850_GT	N850_DP	N850_GL	N850_GQ	N850_SP
BI	BJ	BK	BL	BM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT
N850_PL	N851_GT	N851_DP	N851_GL	N851_GQ	N851_SP	N851_PL	N852_GT	N852_DP	N852_GL	N852_GQ	N852_PL

Fotografia 23. Excel de la variant del pacient

Ara s'iniciarà la tècnica Sanger amb el disseny dels *primers*, però abans de que això succeeixi, s'haurà d'anar al Word on hi ha tota la seqüència, i s'hauran de seleccionar uns 70-80 nucleòtids per davant i per darrera i es deixaran entre tancaments, és a dir, entre []. El resultat serà el següent:

aaacttttccctccaagaactggatgtcacatggagaaaggatgtgtctaattcccagacctttggactcatagtaaacctcagagatt
 accttttctaaagtcaaattgctcatctttctgtgtgtttacttctcagGAGAATATGTTGTTA[TGACCACTCATTTCCAC
 TTGAAGAGAAAGATTGGCTACTTTGTTATTCAAACATACCTGCCATGCATAATGACAGTGATTCTCTCA
 CAAGTCTCCTTCTGGCTCAACAGAGAGTCTGTACCAGCAAGAACTGTCTTTGgtaagtccaatcaagatacat
 a]cgcaaggaagggtatggaagacaagttatgcatatctgtgacactgaaagagaataaaaaaaaaatacactcaaatattaag
 tcatataacagaaagttcaaggaattgccactctcattatggtatatatTTTTAAACTTTAactagcaagctgtttt

Un cop realitzat això, s'haurà d'anar a la pàgina d'internet Primer 3 Input, i copiant tot aquest fragment i aplicant els procediments adequats descrits al protocol, s'obtindrà el següent:

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len  tm  gc%  any_th  3'_th  hairpin  seq
LEFT PRIMER    111  23  57.42  34.78  0.00  0.00  0.00  tgctcatctttctgtgtgtttt
RIGHT PRIMER   344  22  58.47  45.45  0.00  0.00  0.00  acttgtcttccatacccttctt
SEQUENCE SIZE: 487
INCLUDED REGION SIZE: 487

PRODUCT SIZE: 234, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
TARGETS (start len

1 aaacttttccctccaagaactggatgtcacatggagaaaggatgtgtctaattcccagac

61 ctttggactcatagtaaacctcagagattaccttttctaaagtcaaattgctcatctt
    >>>>>>>>>>

121 tcttgtgtgttttacttctcagGAGAATATGTTGTTATGACCACTCATTTCCACTTGAAG
    >>>>>>>>>> *****

181 AGAAAGATTGGCTACTTTGTTATTCAAACATACCTGCCATGCATAATGACAGTGATTCTC
    *****

241 TCACAAGTCTCCTTCTGGCTCAACAGAGAGTCTGTACCAGCAAGAACTGTCTTTGgtaag
    *****
```

Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoç

```

301 tcccaatcaagatacatacgcaaggaagggtatggaagacaagttatgtcatatctgtga
    ***** <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
361 cactgcaaagagaaataaaaaaaaaatatacactcaaataaagttcatataacagaaag
421 ttcaaggaattgccactctcattatggtatatatTTTTTTTaaaactatttaactagcaag
481 ctgtttt

```

```

KEYS (in order of precedence):
***** target
>>>>> left primer
<<<<<< right primer

```

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
1 LEFT PRIMER	108	23	57.22	34.78	0.00	0.00	0.00	aattgctcatctttctgtgtgt
RIGHT PRIMER	341	22	60.03	50.00	0.00	0.00	0.00	tgtcttccatacccttccttgc
PRODUCT SIZE: 234, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
2 LEFT PRIMER	122	24	57.71	41.67	0.00	0.00	0.00	cttgtgtgttttacttctcagGAG
RIGHT PRIMER	371	23	57.85	39.13	0.00	0.00	0.00	tctttgcagtgtcacagatatga
PRODUCT SIZE: 250, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
3 LEFT PRIMER	103	24	57.35	33.33	0.00	0.00	0.00	agtcaaattgctcatctttctgt
RIGHT PRIMER	375	22	58.13	40.91	0.00	0.00	0.00	tttctctttgcagtgtcacaga
PRODUCT SIZE: 273, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
4 LEFT PRIMER	21	22	59.09	45.45	0.00	0.00	0.00	tggatgtcacatggagaaagga
RIGHT PRIMER	449	23	58.79	43.48	0.00	0.00	0.00	accataatgagagtggcaattcc
PRODUCT SIZE: 429, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 7.93								

Statistics

	con	too	in	in	not		no	tm	tm	high	high	high	high		high
	sid	many	tar	excl	ok	bad	GC	too	too	any_th	3'_th	hair-	poly	X	end
	ered	Ns	get	reg	reg	GC%	clamp	low	high	compl	compl	pin			stab
Left	645	0	0	0	0	67	0	389	0	0	0	54	13	0	122
Right	739	0	0	0	0	395	0	246	0	0	0	25	1	0	72

Pair Stats:

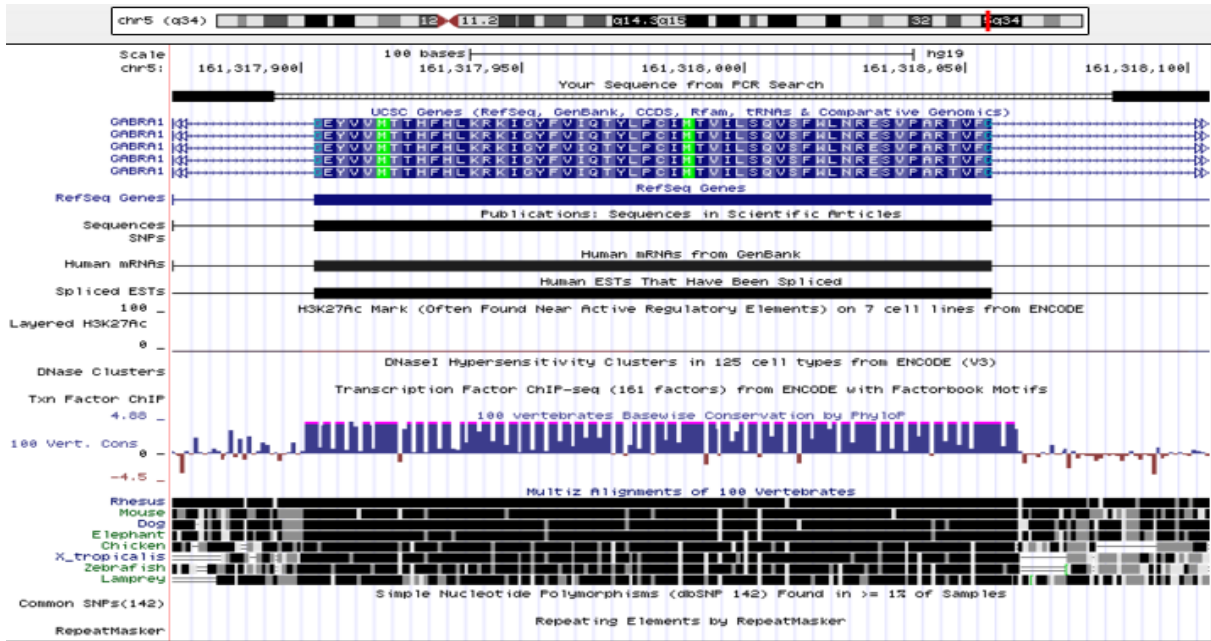
considered 24097, unacceptable product size 24091, primer in pair overlaps a primer in a better pair 2372, ok 6 libprimer3 release 2.3.6

(primer3_results.cgi release 4.0.0)

Fotografia 24. Primers dissenyats a la pàgina *Primer 3 Input*.

D'entre aquests possibles *primers*, es valorarà com a primera opció el que ens trobem en primer lloc. Compta amb molts zeros als apartats "*any_th*", "*3'_th*" o "*hairpin*" i les temperatures del *primer* en *forward* o *reverse* disten poc, 1'05 graus centígrads.

Ara ja es pot comprovar si aquest que s'ha escollit és l'ideal o no. Per això, s'haurà d'anar a la pàgina *UCSC Browser* i aplicant paràmetres s'obtindrà el següent:



Fotografia 25. Comprovació primer escollit a UCSC Browser.

En aquesta imatge es pot veure el fet de que en la variant no hi ha cap zona repetitiva ni cap caixa gris en l'apartat "repeat masker" (si l'hagués, també simbolitza una repetició).

Per poder comprovar per una altra via si els primers dissenyats són els correctes, s'haurà d'anar a la pàgina BLAST.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCTCATCTTCTGTGTGTTTT	23	57.42	34.78	2.00	0.00
Reverse primer	ACTTGTCTCCATACCCTTCCT	22	58.47	45.45	2.00	0.00

Products on target templates

>NC_000005.10 Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 234

Features associated with this product:

[gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1 precursor](#)

[gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1 precursor](#)

Forward primer	1	TGCTCATCTTCTGTGTGTTTT	23
Template	161890866	161890888
Reverse primer	1	ACTTGTCTCCATACCCTTCCT	22
Template	161891099	161891078

Fotografia 26. Comprovació primer escollit a BLAST.

En aquesta imatge del programa, es pot comprovar com el “*product length*” (234) és el mateix que el “*product size*” de la pàgina *Primer 3 Input*. A més, si es baixa la pàgina *Blast* en la qual s’han obtingut els resultats de la imatge, es pot veure que els nombres corresponents al *forward* i *reverse* de la resta de possibles *primers* són tots diferents entre sí.

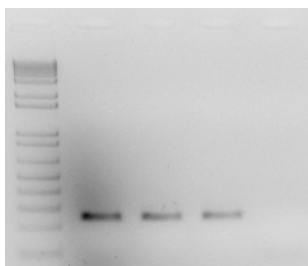
Aquest cúmul de circumstàncies serveixen per verificar i acceptar el *primer* que s’ha dissenyat, format per TGCTCATCTTTCTTGTGTGTTTT en *forward* i ACTTGTCTTCCATACCCTTCCT en *reverse*. Aquests es deixaran ben especificats en el Word on es troba la seqüència (s’ha de recordar que per a al *primer* en *reverse* se l’hi haurà de fer el complementari). El resultat serà el següent:

aaactttccctccaagaactggatgtcacatggagaaaggatgtgtctaattcccagaccttggactcatagtaaacctcagagatt
 accttttctaagtcaaattgctcatcttctgtgtgttttacttctcagGAGAATATGTTGTTA[TGACCACTCATTCCAC
 TTGAAGAGAAAGATTGGCTACTTTGTTATTCAAACATACCTGCCATGCATAATGACAGTGATTCTCTCA
 CAAGTCTCCTTCTGGCTCAACAGAGAGTCTGTACCAGCAAGAACTGTCTTTGgtaagtccaatcaagatacat
 a]cgcaaggaagggtatggaagacaagttatgtcatatctgtgacactgcaaagagaaataaaaaaaaaatacactcaaatattaag
 ttcataaacagaaagttcaaggaattgccactctcattatggtatatatTTTTTaaactatttaactagcaagctgtttt

Ara es realitzarà la PCR afegint tots els components necessaris.

	MOSTRA	GEN	Tm	MIDA (pb)
1	NP0067-1	GABRA1_NP0067	57.2	250
2	NP0067-2	GABRA1_NP0067	57.2	250
3	NP0067-3	GABRA1_NP0067	57.2	250
4	C-		57.2	

Testar en agarosa 1,5% (TBE 1X):



Fotografia 27. PCR amb *primer* que s’ha dissenyat.

La PCR de les mostres on se lis va córrer un gel d'agarosa al 1,5 %, va sortir correctament, ja que es poden visualitzar les bandes del pacient, de la seva mare i del seu pare, però no en les que hi havia solament aigua (serveix per a comprovar que la tècnica es produeixi correctament).

Després es va realitzar la Purificació amb el procediment adequat, per poder acabar de netejar alguna possible brutícia.

Mostres per a purificar:

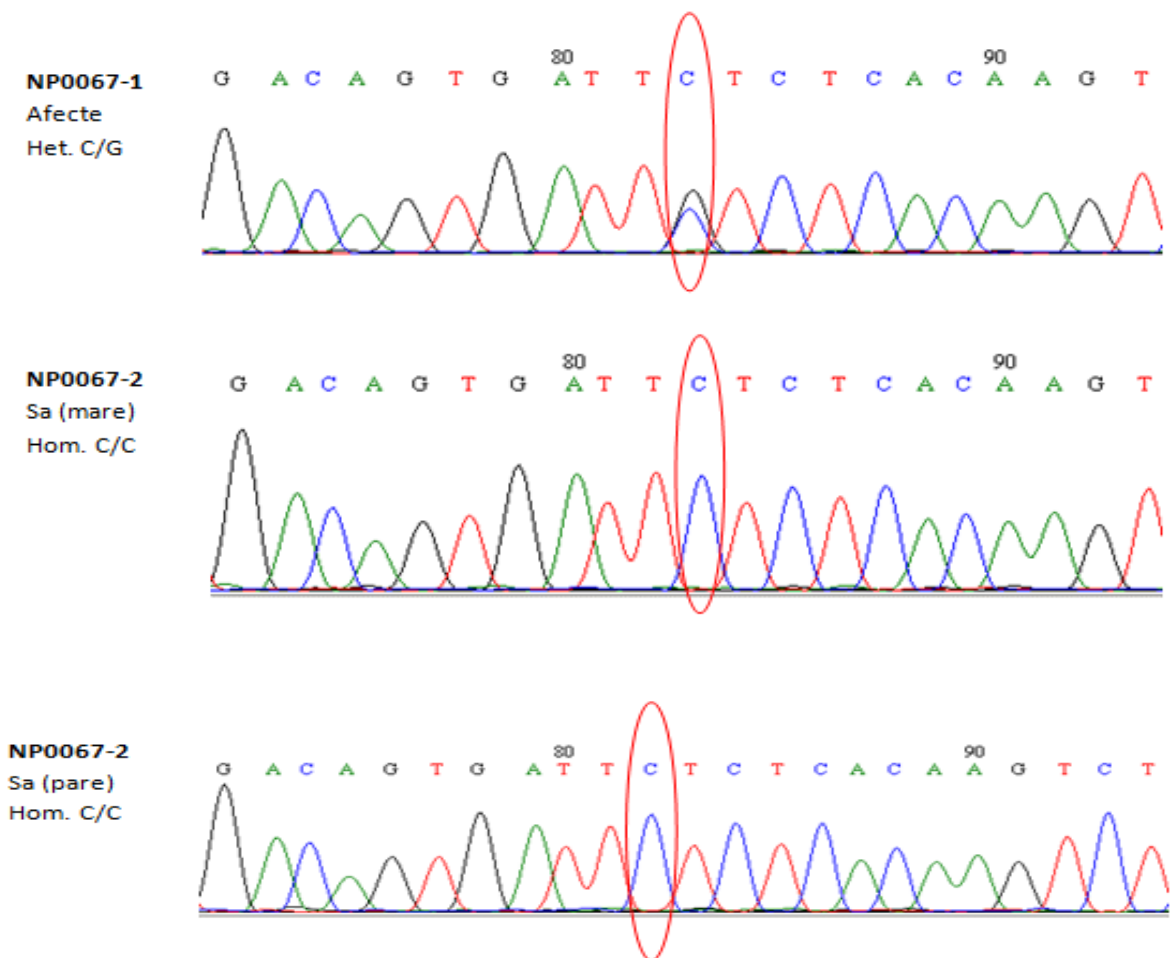
Num	PACIENT	PCR
1	NP0067-1_GABRA1_NP0067	PCR 3254-13 1
2	NP0067-2_GABRA1_NP0067	PCR 3254-13 2
3	NP0067-3_GABRA1_NP0067	PCR 3254-13 3

I finalment es va produir la seqüenciació de les mostres purificades.

Mostres:

1	NP0067-1_GABRA1_NP0067_F (PUR 674/13 3)	2µl
2	NP0067-2_GABRA1_NP0067_F (PUR 674/13 4)	2µl
3	NP0067-3_GABRA1_NP0067_F (PUR 674/13 5)	2µl

En el procés, la polimerasa es va aturar cada cop que es va trobar amb un dNTP de fluorescència, de manera que el resultat final va ser milions de fragments amb llargades completament diverses amb el darrer nucleòtid marcat. A aquests se'ls hi va córrer un gel d'agarosa i es van enviar a un equip especialitzat del centre on gràcies al *Bioedit* es van poder veure en forma d'electroferogrames:



Fotografia 28. Electroferogrames del pacient, mare i pare en el *Bioedit*.

En la imatge es pot comprovar com en la mateixa regió on al pacient se li produeix la variant, ell compta amb un doble pic mentre que els seus pares solament en tenen un.

Amb això es pot concloure que aquesta mutació estudiada és la causa de l'EIEE, ja que ja ha estat descrit prèviament com a causant de la malaltia.

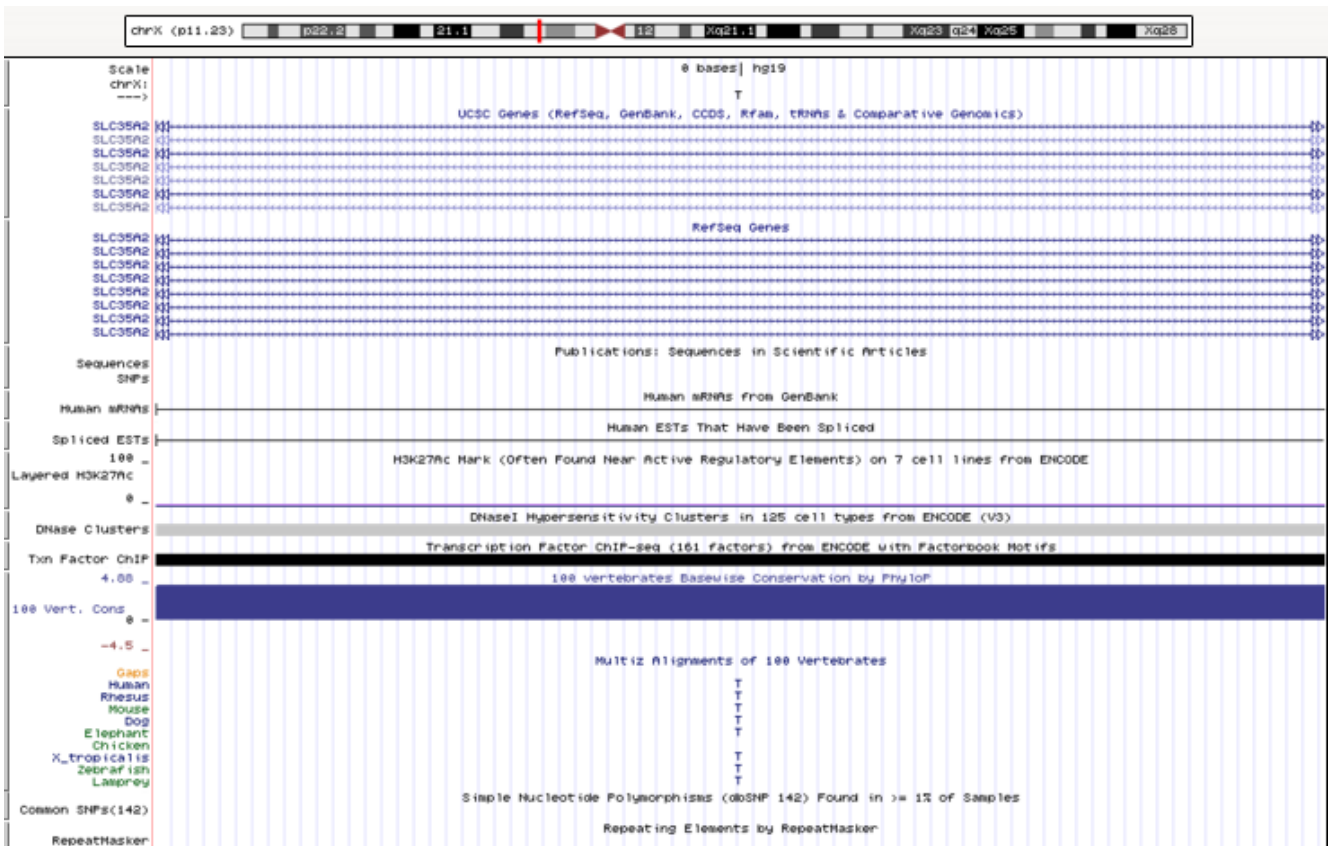
4. 4 PACIENT 3

Gràcies als resultats del primer filtratge en l'Excel, en el qual s'apliquen tots els paràmetres descrits en el protocol i de la posterior comprovació en l'*Exac Browser* i l'*UCSC Browser* (el programa *IGV analysis* estava inoperatiu en els moments de cerca), es va poder arribar a la conclusió que en el pacient 3 d'entre totes les variants era la del cromosoma X (cromosoma sexual), posició 48767275, la que podia causar-li la malaltia, ja que el gen que es veia afectat era el SLC35A2, descrit anteriorment en altres estudis d'altres centres de recerca per l'EIEE.

Variant	Chrom	Position	Consequence	Filter	Annotation	Flags	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Number of Heterozygotes	Allele Frequency
X:48767254 C / T	X	48767254	PAGG	Intron			3	63555	0	1	0.00004719

Fotografia 29. Conservació del cromosoma X, posició 48767275 a l'*EXAC Browser*.

En la imatge de l'*EXAC Browser* es pot veure com hi ha una variant, però al no resultar la mateixa que la del pacient, s'hauria de continuar la investigació per a poder afirmar si és l'origen de l'EIEE o no.



Fotografia 30. *UCSC Browser. Splicing.*

En aquesta imatge del programa *UCSC Browser* es pot veure com en aquest cas, el gen no pateix una variant en quan a canvi de nucleòtid i posterior canvi d'aminoàcid, sinó que pateix una mutació en l'*splicing*. Aquest resulta un senyal i un error en ell implica el fet d'incloure o extraure informació genètica de gran rellevància.

És per això que en l'apartat "*100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP*" es pot observar que es tracta d'una regió concreta molt conservada ja que el percentatge (en blau) és molt elevat.

A més, si es focalitza en l'apartat "*Multiz Alignments of 100 Vertebrates*" es veu que hi ha una Timina però a continuació la senyal s'altera i es deixen d'unir més nucleòtids, pel que no es formen més codons i es veurà alterada la síntesi de la proteïna.

Gràcies als resultats obtinguts en els darrers programes d'internet, es pot concloure que d'entre totes, la variant del cromosoma X, posició 48767275, afectant el gen *SLC35A2* és la que té més possibilitats d'originar la malaltia.

A partir de les taules del següent Excel també es pot extraure altra informació com per exemple el fet de que es produeixi el canvi en l'*splicing* farà que s'acabi amb una Timina quan en realitat tothom hauria d'acabar tenint una Citosina; que al resultar un canvi en l'*splicing* l'efecte que causa és *High*; que la qualitat és de 28,2 (baixa); que resulta un gen codificant; que el seu *coverage* és de 149; que es tracta d'un *SNP*, un canvi puntual i que es tracta d'una mutació *de-novo*, és a dir, que apareix per primera vegada en la família. Fet que es pot comprovar altra cop mirant els genotips del pacient i dels seus pares, ja que el primer és 0 / 1 i els darrers són 0 / 0.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	Effect	Effetet_Impaet_unctional_Clas	Codon_Changenino_Acid_chan	Gene_Name	Gene_BioType		
chrX	48767275	T	C	28,231E+36	ACCEPTOR	HIGH		SLC35A2	protein_coding		
M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
Coding	Transcript	Exon	DP	DP4	INDEL	HVE	PV4	VDB	FQ	GTI	CHET
CCODINGENST00000376521			149	24,115,3,6	SMP	MA	0,210,39,11	0,1285975	29	de-novo	MA
Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
EIEE	GMAF	G5A	G5	CNAGI	CNAGS	RS	dbSNPBuildID	lrt	phglop	avsift	pp2
MA											
AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV
mt	gerp**	LRT_pred	LRT_score	LRT_Omega	PhyloP_score	SIFT_score	polyphen2_scorotation	Taster_pitacion	Taster_sc	GERP_MR	GERP_RS
AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH
esp5400_all	esp5400_ea	esp5400_aa	sb0.05	mrdr15	bqb0.05	msb30	N850_GT	N850_DP	N850_GL	N850_GQ	N850_SP
							0/1	60	MA	59	9
BI	BJ	BK	BL	BM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT
N850_PL	N851_GT	N851_DP	N851_GL	N851_GQ	N851_SP	N851_PL	N852_GT	N852_DP	N852_GL	N852_GQ	N852_SP
63,0,244	0/0	64	MA	99	0	0,193,255	0/0	24	MA	76	0
											0,72,255

Fotografia 31. Excel de la variant del pacient 3.

Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoc

```

KEYS (in order of precedence):
***** target
>>>>> left primer
<<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS
  start len  tm  gc%  any_th  3'_th  hairpin  seq
1 LEFT PRIMER      82  21  62.42  57.14  0.00  0.00  0.00  ttattgggtgagggcaggcag
  RIGHT PRIMER     381  21  58.85  52.38  0.00  0.00  0.00  GTGAGACCTTTGAGCACTTCC
  PRODUCT SIZE: 300, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

2 LEFT PRIMER      19  22  58.72  50.00  0.00  0.00  0.00  catttctcccttctggctcttc
  RIGHT PRIMER     417  20  59.39  55.00  0.00  0.00  0.00  gtacCCCTCTTCTGTGCGAA
  PRODUCT SIZE: 399, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

3 LEFT PRIMER      17  20  59.37  55.00  0.00  0.00  0.00  cccatttctcccttctggct
  RIGHT PRIMER     374  20  59.83  55.00  0.00  0.00  0.00  CTTTGAGCACTTCCGCCATG
  PRODUCT SIZE: 358, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

Statistics
  con  too  in  in  not  no  tm  tm  high  high  high  high
  sid  many  tar  excl  ok  bad  GC  too  too  any_th  3'_th  hair-  poly  end
  ered  Ns  get  reg  reg  GC% clamp  low  high  compl  compl  pin  X  stab  ok
Left  635  0  0  0  0  0  0  15  123  0  5  420  0  0  72
Right 435  0  0  0  0  0  0  1  121  0  0  11  0  0  302
Pair Stats:
considered 165533, unacceptable product size 165405, tm diff too large 124, primer in pair overlaps a primer in a better pair 107098, ok 4
libprimer3 release 2.3.6

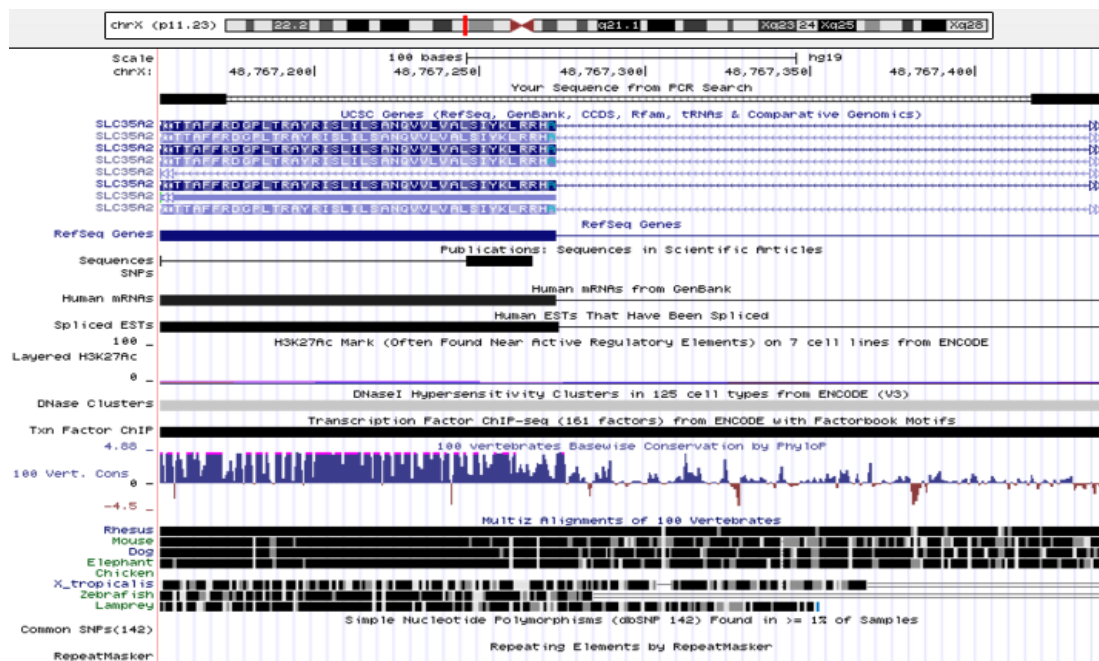
(primer3_results.cgi release 4.0.0)

```

Fotografia 32. Primers dissenyats a la pàgina *Primer 3 Input*.

D'entre aquests possibles *primers*, es valorarà com a primera opció el que ens trobem en primer lloc. Compta amb molts zeros als apartats “3'_th” i “hairpin” (tot i que no els té en l'apartat “any_th”) i les temperatures del *primer* en *forward* o *reverse* disten molt poc, 0,99 graus centígrads.

Ara ja es pot comprovar si aquest que s'ha escollit és l'ideal o no. Per això, s'haurà d'anar a la pàgina *UCSC Browser* i aplicant paràmetres s'obtindrà el següent:



Fotografia 33. Comprovació *primer* escollit a *UCSC Browser*.

En aquesta imatge es pot comprovar el fet de que en la variant no hi ha cap zona repetitiva ni cap caixa gris en l'apartat "*repeat masker*" (si l'hagués, també simbolitza una repetició).

A més, en aquí es pot veure clarament com es passa d'anar originant-se codons i posteriors aminoàcids, a tallar-se la senyal i deixar el darrer codó mal acabat.

Per poder comprovar per una altra via si els *primers* dissenyats són els correctes, s'haurà d'anar a la pàgina *BLAST*.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGGTAGGAGTCAGACCCTTATT	22	58.70	50.00	7.00	3.00
Reverse primer	CAGCAGTGGTGGCAAAGAAG	20	59.69	55.00	5.00	0.00

Products on target templates

>NC_000023.11 Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 286

Features associated with this product:

[UDP-galactose translocator isoform d](#)

[UDP-galactose translocator isoform a](#)

Forward primer	1	CGGTAGGAGTCAGACCCTTATT	22
Template	48910162	48910141
Reverse primer	1	CAGCAGTGGTGGCAAAGAAG	20
Template	48909877	48909896

Fotografia 34 . Comprovació *primer* escollit a *BLAST*.

En aquesta imatge del programa, es pot comprovar com el "*product length*" (286) és el mateix que el "*product size*" de la pàgina *Primer 3 Input*. A més, si es baixa la pàgina *Blast* en la qual s'han obtingut els resultats de la imatge, es pot veure que els nombres corresponents al *forward* i *reverse* de la resta de possibles *primers* són tots diferents entre sí.

Aquest cúmulo de circumstàncies serveixen per verificar i acceptar el *primer* que s'ha dissenyat, format per CGGTAGGAGTCAGACCCTTATT en *forward* i CAGCAGTGGTGGCAAAGAAG en *reverse*.

Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoc

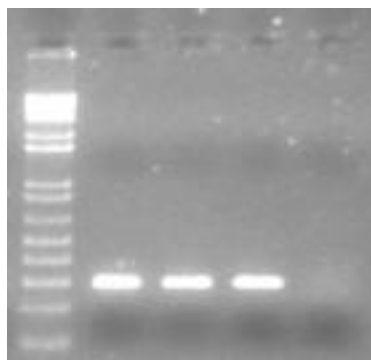
Aquests es deixaran ben especificats en el Word on es troba la seqüència (s'ha de recordar que per a al *primer* en *reverse* se l'hi haurà de fer el complementari). El resultat serà el següent:

```
ctgggacaggggtggggcccatttctccttctggctcttctgctcatggctgaggcagtaagccggtaggagtcagacccttattgggtg  
agggcaggcaggctgagggagcaagtagccatggctaggagggctctgggtgagaaa[gaaagggggtgggtgggtgggtggctatg  
ccccagcggcttctgaccccgtccttcccccttgccccttccgttccccacagCTCACAGGCGCCTGAAGTACATATCCCTA  
GCTGTGCTGGTGGTCCAGAATGCCTCCCTCATCCTCAGCATCCGCTACGC]CCGCACGTTGCCAGGGGA  
CCGCTTCTTTGCCACCACTGCTGTGGTCATGGCGGAAGTGCTCAAAGGTCTCACCTGCCTGCTGCTGCTC  
TTCGCACAGAAGAGGGgtac
```

Ara es realitzarà la PCR afegint tots els components necessaris.

	MOSTRA	GEN	Tm	MIDA (pb)
1	NP0090-1	SLC35A2_NP0090	64	286
2	NP0090-2	SLC35A2_NP0090	64	286
3	NP0090-3	SLC35A2_NP0090	64	286
4	C-		64	

Testar en agarosa 1,5% (TBE 1X):



Fotografia 35. PCR amb *primer* que s'ha dissenyat.

La PCR de les mostres on se lis va córrer un gel d'agarosa al 1,5 %, va sortir correctament, ja que es poden visualitzar les bandes del pacient, de la seva mare i del seu pare (de color blanc), però no en les que hi havia solament aigua (serveix per a comprovar que la tècnica es produeixi correctament).

Després es va realitzar la Purificació amb el procediment adequat, per poder acabar de netejar alguna possible brutícia.

Mostres per a purificar:

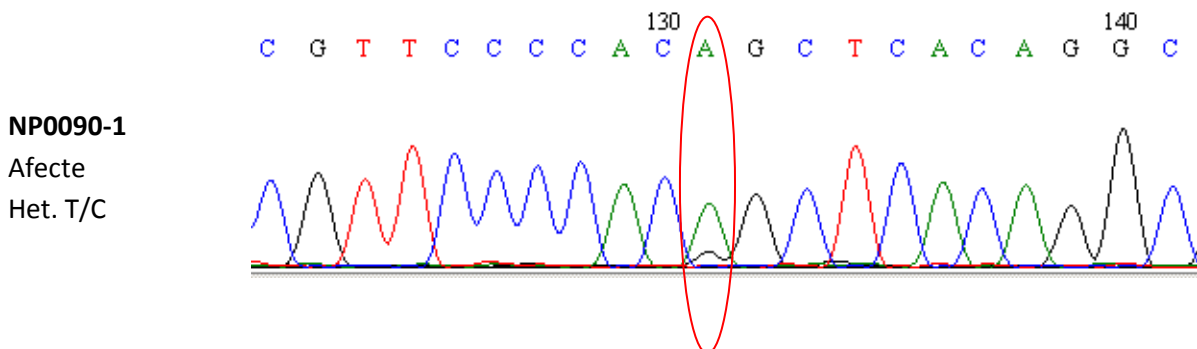
Num	PACIENT	PCR
1	SLC35A2_NP0090-1	3301/14 1
2	SLC35A2_NP0090-2	3301/14 2
3	SLC35A2_NP0090-3	3301/14 3

I finalment es va produir la seqüenciació de les mostres purificades.

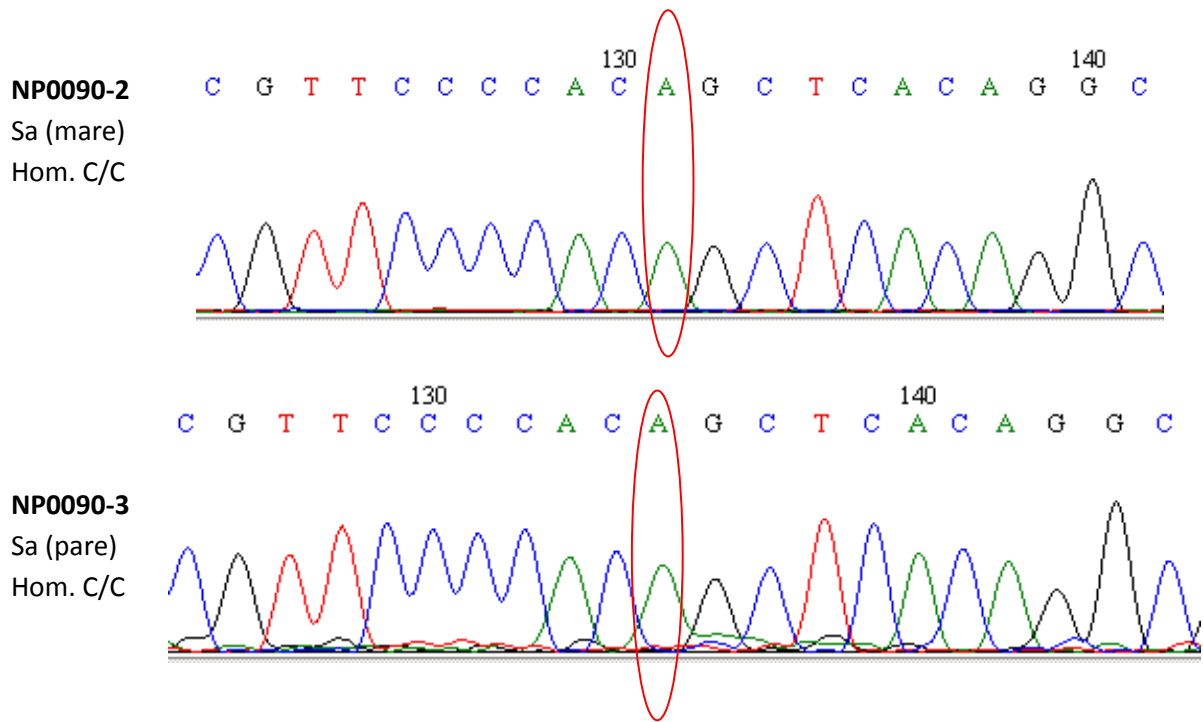
Mostres:

1	SLC35A2_Fw_NP0090-1	2µl
2	SLC35A2_Rv_NP0090-1	2µl
3	SLC35A2_Fw_NP0090-2	2µl
4	SLC35A2_Rv_NP0090-2	2µl

En el procés, la polimerasa es va aturar cada cop que es va trobar amb un dNTP de fluorescència, de manera que el resultat final va ser milions de fragments amb llargades completament diverses amb el darrer nucleòtid marcat. A aquests se'ls hi va córrer un gel d'agarosa i es van enviar a un equip especialitzat del centre on gràcies al *Bioedit* es van poder veure en forma d'electroferogrames:



Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoç



Fotografia 36 . Electroferogrames del pacient, mare i pare en el *Bioedit*.

En la imatge es pot comprovar com en la mateixa regió on al pacient se li produeix la variant, ell compta amb un doble pic mentre que els seus pares solament en tenen un.

Amb això es pot concloure que aquesta mutació estudiada és segurament la causa de l'EIEE, però per poder-ho ratificar completament i d'aquesta manera intentar eradicarla o pal·liar-la, tot i que ja ha estat descrit el gen com a causant de la malaltia, al ser una mutació d'*splicing*, es pot estudiar el RNA per tal de veure si falta o sobra una part del gen, que donaria a pensar que el lloc d'*splicing* està perdut.

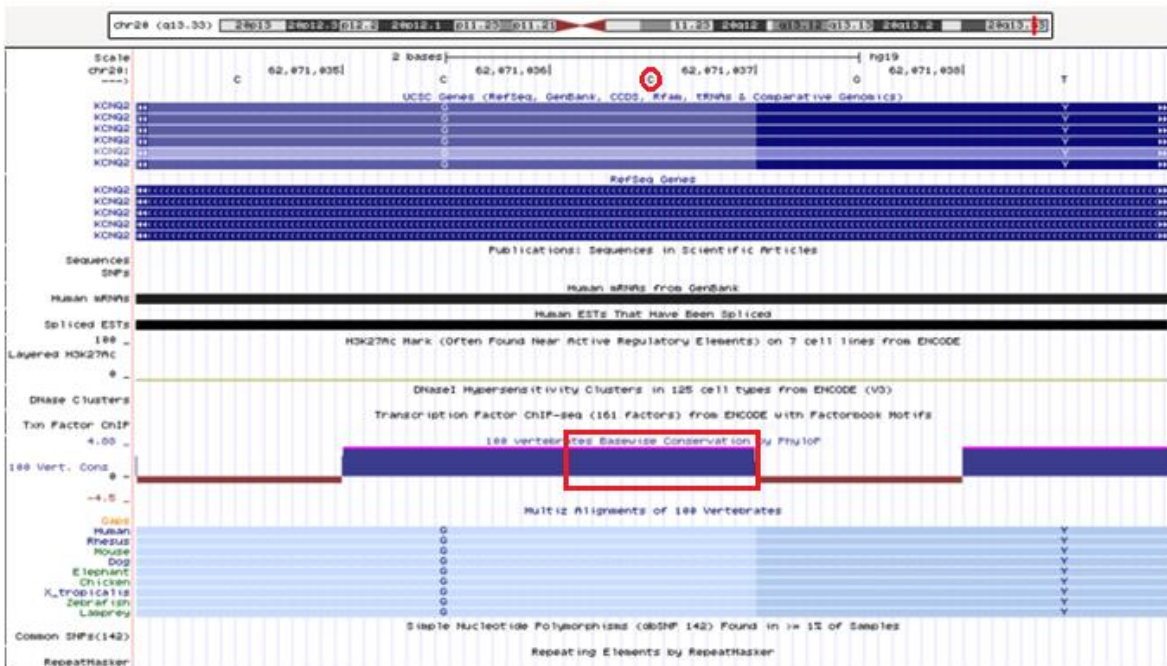
4.5 PACIENT 4

Gràcies als resultats del primer filtratge en l'Excel, en el qual s'apliquen tots els paràmetres descrits en el protocol i de la posterior comprovació en l'*Exac Browser* i l'*UCSC Browser* (el programa *IGV analysis* estava inoperatiu en els moments de cerca), es va poder arribar a la conclusió que en el pacient 4 d'entre totes les variants era la del cromosoma 20, posició 62071037, la que podia causar-li la malaltia, ja que el gen que es veia afectat era el *KCNQ2*, descrit anteriorment en altres estudis d'altres centres de recerca per l'EIEE.

Variant	Chrom	Position	Consequence	Filter	Annotation	Flags	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
20:62071017 G / C (rs11698044)	20	62071017	p.Thr257Tyr	PASS	synonymous		3	120620	0	0.00002487
20:62071017 G / A (rs11698044)	20	62071017	p.Thr257Tyr	PASS	synonymous		1	120620	0	0.000008290
20:62071023 G / C	20	62071023	p.Pro255Pro	PASS	synonymous		6	120612	0	0.00004975
20:62071038 G / A	20	62071038	p.Tyr280Tyr	PASS	synonymous		10	120552	0	0.00008295
20:62071056 C / T	20	62071056	p.Thr274Tyr	PASS	synonymous		1	120432	0	0.000008303

Fotografia 37. Conservació del cromosoma 20, posició 62071037 a l'*EXAC Browser*.

En aquesta imatge del programa *EXAC Browser* s'observa les variants que es troben en el cromosoma 20. Es veu que se'n produeixen d'altres però cap la que tindria el pacient, pel que està representant que aquesta variant no s'ha descrit abans i que per tant, s'hauria de continuar la investigació per a poder afirmar si és l'origen de l'EIEE o no.



Fotografia 38. Canvi que es produeix en el gen (apareix una C i tindria que aparèixer una G).

En aquesta imatge del programa *UCSC Browser* es pot veure el canvi (encerclat en vermell) que es produeix en el gen *KCNQ2*, ja que el pacient té una Citosina enlloc d'una Guanina. A més, si s'observa l'apartat "*100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP*" es veu que és una regió que està molt conservada, ja que el percentatge (en blau) és molt alt i a més compta amb una regió rosa, que simbolitza una conservació molt i molt elevada.

Si s'observa també l'apartat "*Multiz Alignments of 100 Vertebrates*" es veu que el codó que formarà aquesta Citosina, més les dos Citosines que la precedeixen, que en realitat formaran un codó de 3 Guanines ja que en l'apartat "*Refseq Genes*" les fletxes van cap a l'esquerra, és a dir, en *reverse*, formaran segons la taula universal de codons, l'aminoàcid Glicina (Gly), quan en realitat tothom hauria de tenir l'aminoàcid Arginina (Arg) que es forma a partir del codó de dos Citosines més una Guanina.

Així doncs, a partir d'aquests resultats, en els quals veiem un canvi de nucleòtid en una regió molt conservada i posteriorment un canvi d'aminoàcid, ja es podria començar a determinar que possiblement aquest canvi d'aa, podria fer variar la proteïna i iniciar així una cadena d'elements que no farien la funció que els pertocaria, podent acabar provocant l'EIEE.

Gràcies als resultats obtinguts en els darrers programes d'internet, es pot concloure que d'entre totes, la variant del cromosoma 20, posició 62071037, afectant el gen *KCNQ2* és la que té més possibilitats d'originar la malaltia.

A partir de les taules del següent Excel també es pot extraure altra informació com per exemple el fet de que es canviï una Citosina per una Guanina i que per tant l'efecte que causa és *Moderate*; que el paràmetre de qualitat és el màxim (999); que resulta un gen codificant; que el seu *coverage* és de 369; que es tracta d'un *SNP*, un canvi puntual i que es tracta d'una mutació *de-novo*, és a dir, que apareix per primera vegada en la família. Fet que es pot comprovar altra cop mirant els genotips del pacient i dels seus pares, ja que el primer és 0 / 1 i els darrers són 0 / 0.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	Effect	Effect_impact	unctional_Clas	Codon_Change	mino_Acid_chan	Gene_Name	Gene_BioType
chr20	6207037	C	G	999	MYOUS_CODING	MODERATE	SENSE	MISSENSE	GggGcgGggCgg	281R;G281R;G281R;32;KCNQ2;KCNQ2	lingprotein_coding
M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
Coding	Transcript	Exon	DP	DP4	INDEL	HVE	PV4	YDB	FQ	GTI	CHET
;CODING;CODING;ENST00000430658	32070951	62071061	369	101,207,20,36	SNP	NA	0,76;0,012,11	0,3894608	999	de-novo	NA
Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
EIEE	GMAF	G5A	G5	CNAGI	CNAGS	RS	dbSNPBuildID	lrt	phglop	avsift	pp2
KCNQ2								0,999917	0,995429	0	0,998
AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV
mt	gerp**	LRT_pred	LRT_score	LRT_Omega	PhyloP_score	SIFT_score	polyphen2_scor	ntationTaster_pi	ationTaster_sc	GERP_NR	GERP_RS
1	3,96	D	0,999917	0,13528	0,995429	1	D	1	1	3,96	3,96
AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH
esp5400_all	esp5400_ea	esp5400_aa	sb0.05	mrd15	bq0.05	msb30	N850_GT	N850_DP	N850_GL	N850_GQ	N850_SP
					bq0.05		0/1	122	NA	99	4
BI	BJ	BK	BL	BM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT
N850_PL	N851_GT	N851_DP	N851_GL	N851_GQ	N851_SP	N851_PL	N852_GT	N852_DP	N852_GL	N852_GQ	N852_SP
255,0,255	0/0	113	NA	99	0	0,255,255	0/0	129	NA	99	0
											0,255,255

Fotografia 39. Excel de la variant del pacient 4.

Ara s’iniciarà la tècnica Sanger amb el disseny dels primers, però abans de que això succeeixi, s’haurà d’anar al Word on hi ha tota la seqüència, i s’hauran de seleccionar uns 70-80 nucleòtids per davant i per darrera i es deixaran entre tancaments, és a dir, entre []. El resultat serà el següent:

aggagagaggctcaggggatgagggggcggccgacaccgacctggcctcactgggctccgtgtggatggtgacacgggggtggcc
 ccgcatctgtcccatccaagccccgagtcgcccagcggggcgtccagc[ctgcctcaggggtgtgagcaggcccttcgtgtgactagagc
 ctgcggtcccacagATCACGCTGACCACCATTGGCTACGGGACAAGTACCCCCAGACCTGGAACGGCAG
 GCTCCTTGCGCAACCTTACCCTCATCGGTGTCTCTTTCGCGCTG]CCTGCAgtaagtccagctgccctg
 cctgccttgagggggacgaggtctgtaggctcccaggtgaccacagggccccgggcacagttccctaggtgggacctggggcagg
 agcagctctcagcaggtccacagccccaggagctggaggtggcagctcagggtcagaggccttgttcccaaggactg

Un cop realitzat això, s’haurà d’anar a la pàgina d’internet Primer 3 Input, i copiant tot aquest fragment i aplicant els procediments adequats descrits al protocol, s’obtindrà el següent:

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO          start  len   tm    gc%   any_th  3'_th hairpin seq
LEFT PRIMER    91     20   60.47 60.00  0.00   0.00   0.00  catctgtcccatccaagccc
RIGHT PRIMER    319    20   61.56 60.00  0.00   0.00   0.00  aggggcagctggacttacTG
SEQUENCE SIZE: 487
INCLUDED REGION SIZE: 487
```

```
PRODUCT SIZE: 229, PAIR ANY_TH COMPL: 6.98, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
TARGETS (start len
```

```
1  aggagagaggctcaggggatgagggggcggccgacaccgacctggcctcactgggctc
61  cgtgtggatggtgacacgggggtggccccgcacatctgtcccatccaagccccgagtcgcc
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 agcggggcgtccagcctgcccctcaggggtgtgagcaggcccttcgtgtgactagagcctgc
    *****
181 ggtccccacagATCACGCTGACCACCATTGGCTACGGGACAAGTACCCCCAGACCTGGAA
    *****
241 CGGCAGGCTCCTTGCGGCAACCTTACCCTCATCGGTGTCTCTTTCGCGCTGCTCCTGC
    ***** <
301 Agtaagtccagctgccctgccttgagggggacgaggtctgtaggctcccaggag
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
361 tgaccacagggccccgggcacagttccctaggtgggacctggggcaggagcagctctcag
421 caggtcccacagccccaggagctggaggtggcagctcagggtcagaggccttgttccca
```

481 aggactg

KEYS (in order of precedence):
 ***** target
 >>>>> left primer
 <<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
1 LEFT PRIMER	88	20	62.27	60.00	0.00	0.00	0.00	ccgcatctgtcccatcccaa
RIGHT PRIMER	355	20	59.54	60.00	0.00	0.00	0.00	ggagcctacaagacctctgc
PRODUCT SIZE: 268, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
2 LEFT PRIMER	92	22	66.40	63.64	0.00	0.00	0.00	atctgtcccatcccaagccccg
RIGHT PRIMER	359	21	61.63	61.90	0.00	0.00	0.00	ctcgggagcctacaagacctc
PRODUCT SIZE: 268, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 1.23								
3 LEFT PRIMER	98	20	64.77	70.00	0.00	0.00	0.00	cccatcccaagccccgagtc
RIGHT PRIMER	362	20	60.97	60.00	0.00	0.00	0.00	cacctcgggagcctacaaga
PRODUCT SIZE: 265, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 10.60								
4 LEFT PRIMER	85	20	65.44	70.00	0.00	0.00	0.00	gccccgcatctgtcccatcc
RIGHT PRIMER	365	20	63.14	65.00	0.00	0.00	0.00	ggtcacctcgggagcctaca
PRODUCT SIZE: 281, PAIR ANY_TH COMPL: 0.98, PAIR 3'_TH COMPL: 6.46								

Statistics

	con	too	in	in	not	no	tm	tm	high	high	high	high	high	high
	sid	many	tar	excl	ok	bad	GC	too	too	any_th	3'_th	hair-	poly	end
	ered	Ns	get	reg	reg	GC%	clamp	low	high	compl	compl	pin	X	stab
Left	495	0	0	0	0	32	0	0	324	0	0	21	20	0
Right	715	0	0	0	0	0	0	0	335	0	0	32	40	308

Pair Stats:

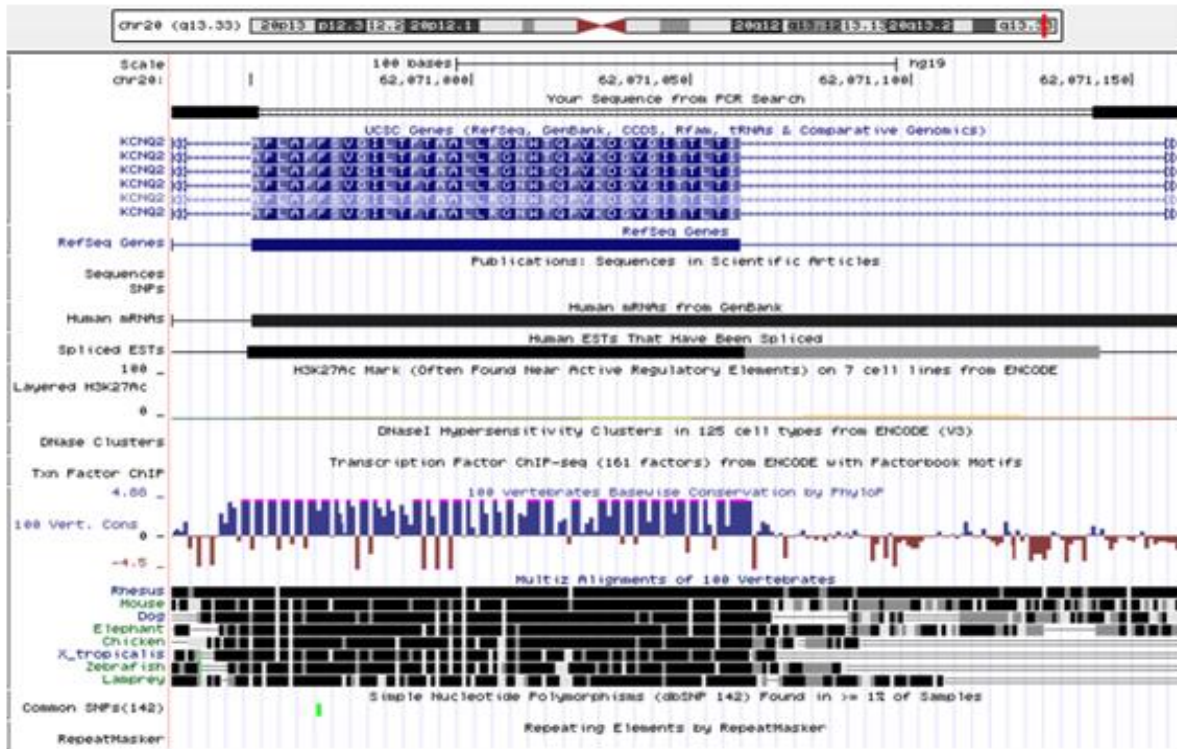
considered 43108, unacceptable product size 43087, tm diff too large 9, primer in pair overlaps a primer in a better pair 10284, ok 12
 libprimer3 release 2.3.6

(primer3_results.cgi release 4.0.0)

Fotografia 40. Primers dissenyats a la pàgina Primer 3 Input.

D'entre aquests possibles *primers*, es valorarà com a primera opció el que ens trobem en primer lloc. Compta amb molts zeros als apartats “any_th”, “3'_th” o “hairpin” i les temperatures del *primer* en *forward* o *reverse* disten poc, 1,09 graus centígrads.

Ara ja es pot comprovar si aquest que s'ha escollit és l'ideal o no. Per això, s'haurà d'anar a la pàgina *UCSC Browser* i aplicant paràmetres s'obtindrà el següent:



Fotografia 41. Comprovació *primer* escollit a UCSC Browser.

En aquesta imatge es pot comprovar el fet de que en la variant no hi ha cap zona repetitiva ni cap caixa gris en l'apartat "repeat masker" (si l'hagués, també simbolitza una repetició). També trobem una ralla verda, però representa un polimorfisme, una mutació nociva.

Per poder comprovar per una altra via si els *primers* dissenyats són els correctes, s'haurà d'anar a la pàgina *BLAST*.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CATCTGTCCCATCCCAAGCC	20	60.47	60.00	2.00	1.00
Reverse primer	AGGGGCAGCTGGACTTACTG	20	61.56	60.00	6.00	1.00

Products on target templates
 >[NC_000020.11](#) Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p2 Primary Assembly
 product length = 229
 Features associated with this product:
[potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 2 is...](#)
[potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 2 is...](#)

Forward primer	1	CATCTGTCCCATCCCAAGCC	20
Template	63439808	63439789
Reverse primer	1	AGGGGCAGCTGGACTTACTG	20
Template	63439580	63439599

Fotografia 42. Comprovació *primer* escollit a BLAST.

En aquesta imatge del programa, es pot comprovar com el “*product length*” (229) és el mateix que el “*product size*” de la pàgina *Primer 3 Input*. A més, si es baixa la pàgina *Blast* en la qual s’han obtingut els resultats de la imatge, es pot veure que els nombres corresponents al *forward* i *reverse* de la resta de possibles *primers* són tots diferents entre sí.

Aquest cúmul de circumstàncies serveixen per verificar i acceptar el *primer* que s’ha dissenyat, format per CATCTGTCCCATCCCAAGCC en *forward* i AGGGGCAGCTGGACTTACTG en *reverse*. Aquests es deixaran ben especificats en el Word on es troba la seqüència (s’ha de recordar que per a al *primer* en *reverse* se l’hi haurà de fer el complementari). El resultat serà el següent:

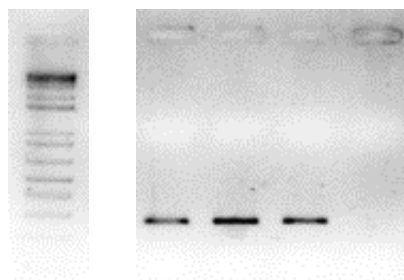
aggagagagggctcaggggatgaggggcgccgacaccgacctggcctcactgggcctccgtgtggatggtgacacgggggtggcc
 ccgcatctgtcccatccaagcccgagtcgccagcgggctccagc[ctgccctcaggggtgtgagcaggcctctgtgtgactagagc
 ctgcggtcccacagATCACGCTGACCACATTGGCTACGGGACAAGTACCCCCAGACCTGGAACGGCAG
 GCTCCTTGCGGCAACCTCACCTCATCGGTGTCTCCTTCTTCGCGCTG]CCTGCAgtaagtccagctgccctg
 cctgccttgagggggacgaggtctttaggctcccgaggtgaccacaggcccctgggcacagttccctaggtgggacctggggcagg
 agcagctctcagcaggtccacagccccaggagctggaggtggcagctcagggtcagaggcctgttccccaaggactg

Ara es realitzarà la PCR afegint tots els components necessaris.

Mostres i *primers*:

Número	Primer	Pacient	Temperatura	Mida (pb)
1	KCNQ2_NP0101	NP0101_1	63°C	274
2	KCNQ2_NP0101	NP0101_2	63°C	274
3	KCNQ2_NP0101	NP0101_3	63°C	274

Testar en agarosa 1,5% (TBE 1X):



Fotografia 43. PCR amb *primer* que s’ha dissenyat.

La PCR de les mostres on se lis va córrer un gel d'agarosa al 1,5 %, va sortir correctament, ja que es poden visualitzar les bandes del pacient, de la seva mare i del seu pare, però no en les que hi havia solament aigua (serveix per a comprovar que la tècnica es produeixi correctament).

Després es va realitzar la Purificació amb el procediment adequat, per poder acabar de netejar alguna possible brutícia.

Mostres per a purificar:

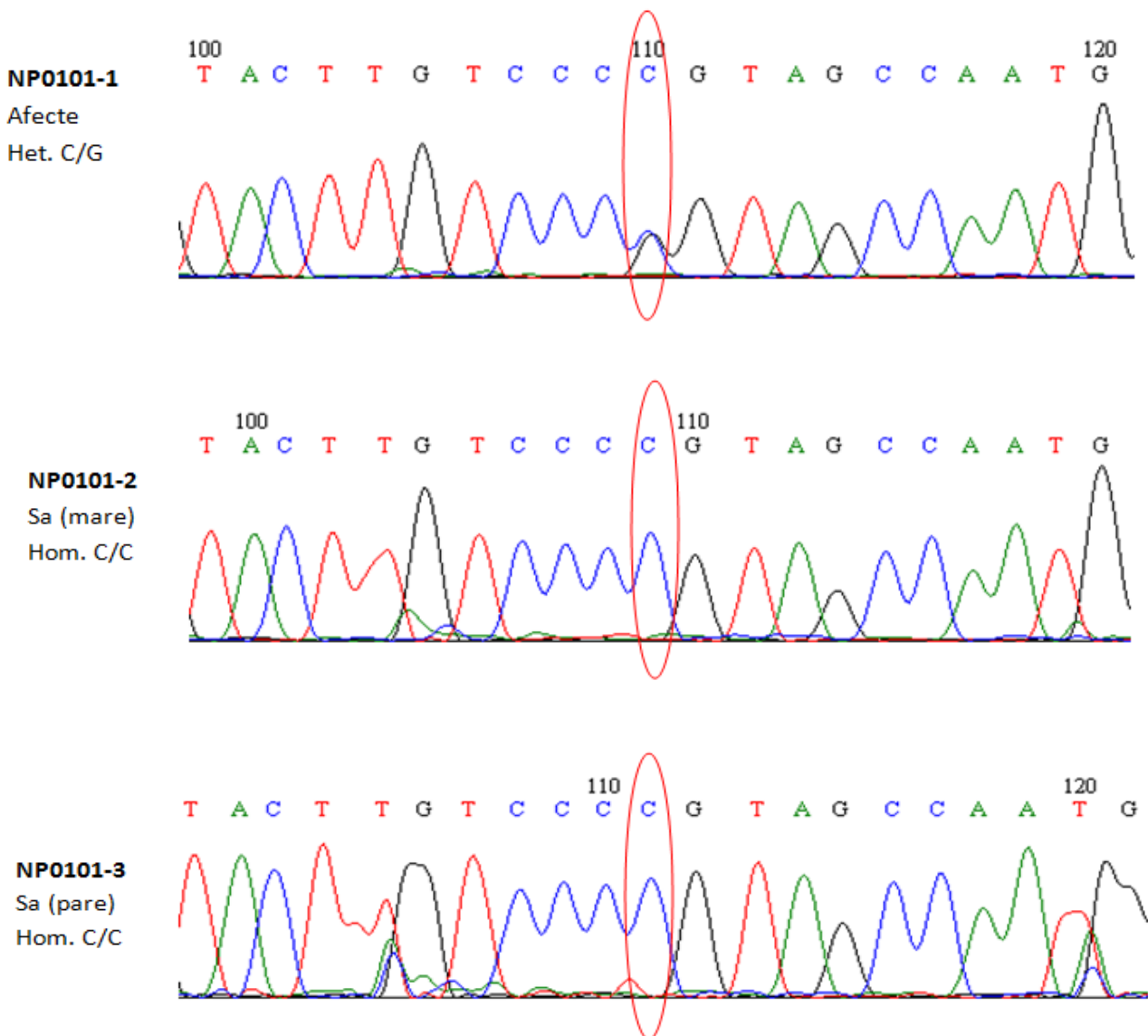
Número	Pacient	PCR
1	NP0101_1	PCR 3376-14
2	NP0101_2	PCR 3376-14
3	NP0101_3	PCR 3376-14

I finalment es va produir la seqüenciació de les mostres purificades.

Mostres:

Número	Mostres i primers	Purificació	Quantitat
1	NP0101_1_KCNQ2_Fw	705/14	2uL
2	NP0101_1_KCNQ2_Rv	705/14	2uL
3	NP0101_2_KCNQ2_Fw	705/14	2uL
4	NP0101_2_KCNQ2_Rv	705/14	2uL
5	NP0101_3_KCNQ2_Fw	705/14	2uL
6	NP0101_3_KCNQ2_Rv	705/14	2uL

En el procés, la polimerasa es va aturar cada cop que es va trobar amb un dNTP de fluorescència, de manera que el resultat final va ser milions de fragments amb llargades completament diverses amb el darrer nucleòtid marcat. A aquests se'ls hi va córrer un gel d'agarosa i es van enviar a un equip especialitzat del centre on gràcies al *Bioedit* es van poder veure en forma d'electroferogrames:



Fotografia 44. Electroferogrames del pacient, mare i pare en el *Bioedit*.

En la imatge es pot comprovar com en la mateixa regió on al pacient se li produeix la variant, ell compta amb un doble pic mentre que els seus pares solament en tenen un.

Amb això es pot concloure que aquesta mutació estudiada és la causa de l'EIEE, ja que aquest gen està altament associat a aquesta patologia.

4. 6 PACIENT 5

Gràcies als resultats del primer filtratge en l'Excel, en el qual s'apliquen tots els paràmetres descrits en el protocol i de la posterior comprovació en l'*Exac Browser* i l'*UCSC Browser* (el programa *IGV analysis* estava inoperatiu en els moments de cerca), es va poder arribar a la conclusió que en el pacient 5 d'entre totes les variants era la del cromosoma 17, posició 48685266, la que podia causar-li la malaltia.

Aquesta vegada, la selecció va ésser més complicada ja que en el filtratge en l'Excel es van quedar dos variants com a possibles, i en cap d'elles s'afectava a un gen descrit anteriorment per un estudi d'algun centre de recerca.

Les opcions eren o bé la variant del cromosoma 17, posició 48685266 o bé la del cromosoma 4, posició 106157167. Per a poder descartar-ne un, es va observar la columna L, que fa referència a si el gen ha estat codificat o no. En aquestes s'informava que la primera variant havia estat codificada pel CACNA1G i la segona pel TET2.

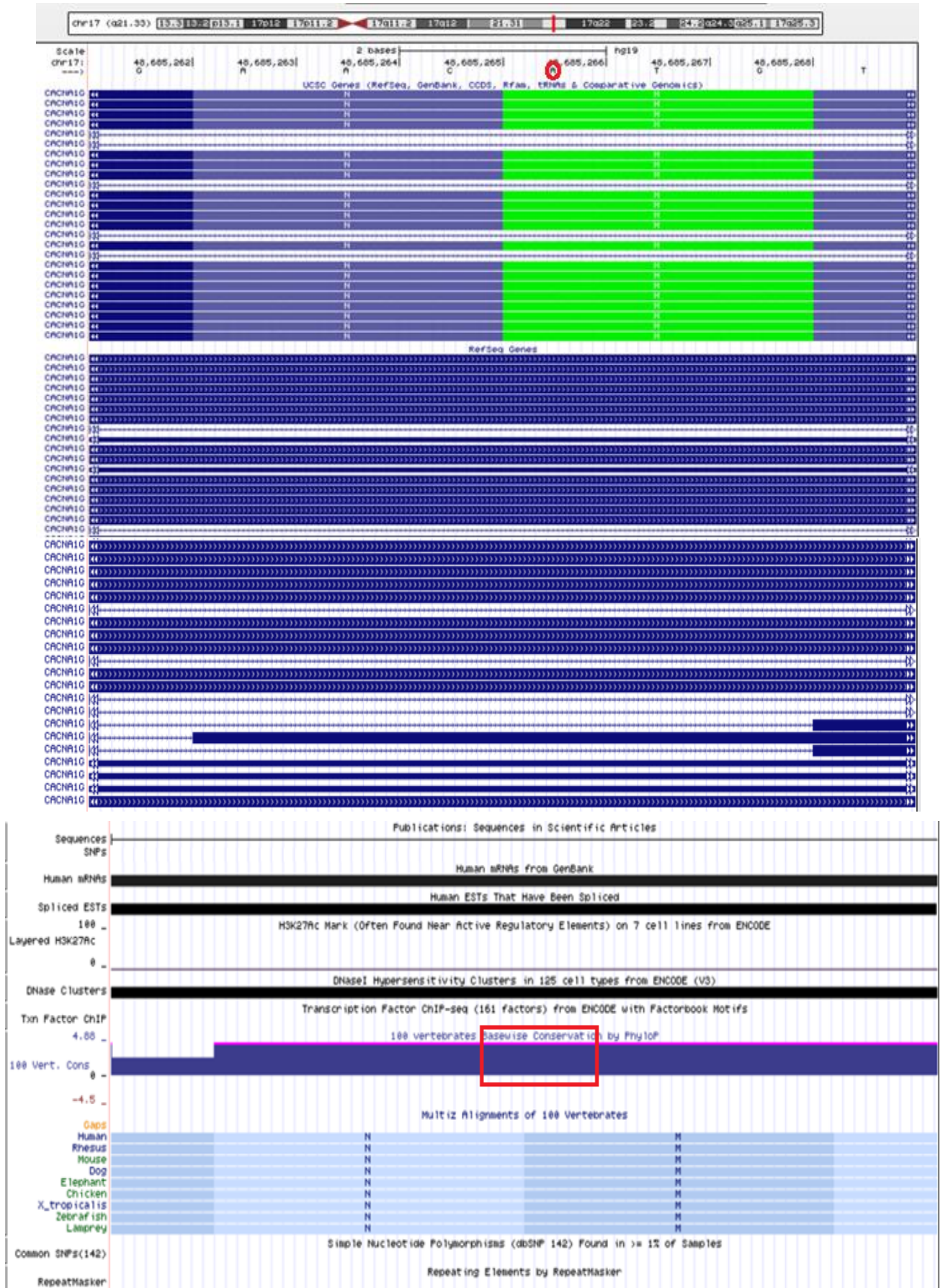
Després d'una cerca a internet per conèixer-los, es va arribar a la conclusió que el CACNA1G es troba en els canals de calci, mentre que el TET2 canviaria el codó Citosina més dos Adenines, que forma la Glutamina (Gln), per un Uracil més dos Adenines, que forma un *Stop Codon* i per tant, es deixaria de sintetitzar proteïnes.

Malgrat que aquesta darrer canvi és força important, la conclusió que se'n extreu és que el defecte en el canal de calci és molt més rellevant, ja que provocaria un traspàs de quantitats inadequades de ions de calci i en conseqüència, amb el voltatge corresponen que això implica, causaria crisis epilèptiques.

Variant	Chrom	Position	Consequence	Filter	Annotation	Flags	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
17:48685283 G / C	17	48685283	c.4513-7G>C	PASS	splice region		1	120296	0	0.000008313

Fotografia 45. Conservació del cromosoma 17, posició 48685266 a l'*EXAC Browser*.

En aquesta imatge del programa *EXAC Browser* s'observa les variants que es troben en el cromosoma 17, es veu que se'n produeix una altra però no la que tindria el pacient, pel que està representant que aquesta variant no s'ha descrit abans i que per tant, s'hauria de continuar la investigació per a poder afirmar si és l'origen de l'EIEE o no.



Fotografia 46. UCSC Browser. Canvi que es produeix en el gen (apareix una A i tindria que aparèixer una T).

En aquesta imatge del programa *UCSC Browser* es pot veure el canvi (encerclat en vermell) que es produeix en la secció verda, és a dir, en la que es troba en el canal de calci, ja que el pacient té una Adenina enlloc d'una Timina (que serà l'Uracil).

A més, si s'observa l'apartat "*100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP*" es veu que és una regió que està molt conservada, ja que el percentatge (en blau) és molt alt i a més compta amb una regió rosa, que simbolitza una conservació molt i molt elevada.

Si s'observa també l'apartat "*Multiz Alignments of 100 Vertebrates*" s'observa que el codó que formarà aquesta Adenina, més la Timina (que serà l'Uracil) i la Guanina que la segueixen, formaran segons la taula universal de codons, l'aminoàcid Metionina (Met), quan en realitat tothom hauria de tenir l'aminoàcid Leucina (Leu) que es forma a partir del codó dos Timines (que seran dos Uracils) més una Guanina.

Així doncs, a partir d'aquests resultats, en els quals veiem un canvi de nucleòtid en una regió molt conservada, ja es podria començar a determinar que possiblement aquest canvi podria alterar el canal de calci i iniciar així un traspàs de ions de calci en quantitats inadequades i causar una crisi epilèptica.

Gràcies als resultats obtinguts en els darrers programes d'internet, es pot concloure que d'entre totes, la variant del cromosoma 17, posició 48685266, codificada pel gen CACNA1G és la que té més possibilitats d'originar la malaltia.

A partir de les taules del següent Excel també es pot extraure altra informació com per exemple el fet de que es canviï una Adenina per una Timina i que per tant l'efecte que causa és *Moderate*; que el paràmetre de qualitat és de 220; que resulta un gen que codifica proteïnes; que el seu *coverage* és de 25 i que encara no se sap si es tracta d'una mutació *de-novo*.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	Effect	Effect_Impact	unctional_Clas	Codon_Change	nino_Acid_chan	Gene_Name	Gene_BioType
chr17	48885266	A	T	220	YMDDUS_CODING	MODERATE	SENSE	MTGAGTGG	31L	MTG31L	CACNA1G
M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
Coding	Transcript	Exon	DP	DP4	INDEL	HWE	PV4	YDB	FQ	GTI	CHET
lingprotein_coding;CODING;CODING;ENST00000359106	5:25:25:25:25:25	111111111111111111	221	SNP	NA	NA	NA	NA	0.87:0.45:11	0.3346057	3
Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
EIEE	GMAF	G5A	G5	CNAGI	CNAGS	RS	dbSNPBuildID	lrt	phylop	avsift	pp2
3	3	3	NA	NA	de-novo						
AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV
mt	gerp**	LRT_pred	LRT_score	LRT_Omega	PhyloP_score	SIFT_score	polyphen2_scorantation	Taster_pi	Taster_sc	GERP_MR	GERP_RS
AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH
esp5400_all	esp5400_ea	esp5400_aa	sb0.05	mrd15	bqb0.05	msb30	N850_GT	N850_DP	N850_GL	N850_GQ	N850_SP
BI	BJ	BK	BL	BM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT
N850_PL	N851_GT	N851_DP	N851_GL	N851_GQ	N851_SP	N851_PL	N852_GT	N852_DP	N852_GL	N852_GQ	N852_PL

Fotografia 47. Excel de la variant del pacient 5.

Ara s'iniciarà la tècnica Sanger amb el disseny dels *primers*, però abans de que això succeeixi, s'haurà d'anar al Word on hi ha tota la seqüència, i s'hauran de seleccionar uns 70-80 nucleòtids per davant i per darrera i es deixaran entre tancaments, és a dir, entre []. El resultat serà el següent:

```
gttcgaggaaccaggctgtgggcagctcctaagacagcttgccctcgggctgatgcctccgctgtccttcgctccccgcc[agCC
CATCATGAACCACAACCCCTGGATGCTGCTGTAATCATCTCGTTCCTGCTCATTGTGGCCTTCTTTGTCC
TGAACATGTTTTGTGGGTGTGGTGGTGGAGAACTCCACAAGTGTCGGCAGCACCAGGAGGAAGAGG
AGCCCCGGCGGGGAGGAG]AAGCGCCTACGAAGACTGGAGAAAAGAGAAGGAgtaaggagaagcag
atggctggcggtagtctttccacctctctctgggtcgtgcttgaccttggccttgcgactgcagggggctgggctgggcccggggca
gggagaagaggctccacccccctctcact
```

Un cop realitzat això, s'haurà d'anar a la pàgina d'internet Primer 3 Input, i copiant tot aquest fragment i aplicant els procediments adequats descrits al protocol, s'obtindrà el següent:

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len   tm   gc%   any_th  3'_th  hairpin  seq
LEFT PRIMER   54   20  62.93  65.00  0.00  0.00  0.00  gatgcctccgctgtccttc
RIGHT PRIMER  298   22  58.96  50.00  0.00  0.00  0.00  ccatctgcttctccttacTCCT
SEQUENCE SIZE: 417
INCLUDED REGION SIZE: 417

PRODUCT SIZE: 245, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
TARGETS (start len

1  gttcgaggaaccaggctgtgggcagctcctaagacagcttgccctcgggctgatgcct
    >>>>>>>

61  ccgctgtccttctctgtccccgcagCCCATCATGAACCACAACCCCTGGATGCTGCTG
    >>>>>>>>>> *****

121 TACTTCATCTCGTTCCTGCTCATTGTGGCCTTCTTTGTCCTGAACATGTTTGTGGGTGTG
    *****

181 GTGGTGGAGAACTTCACAAAGTGTCGGCAGCACCAGGAGGAAGAGAGGCCCGGGCGGC
    *****

241 GAGGAGAAGCGCCTACGAAGACTGGAGAAAAGAGAAGGAgtaaggagaagcagatggct
    ***** <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

301 ggtcggtagtctttccacctctctctgggtcgtgcttgaccttggccttgcgactgcagg

361 gggctgggctgctggggcggggcgaggagaaggctccacccccctctcact
```

```

KEYS (in order of precedence):
***** target
>>>>> left primer
<<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS
      start len   tm   gc% any_th 3'_th hairpin seq
1 LEFT PRIMER      60  20  64.04  65.00  0.00  0.00  0.00 tccgcctgtccttcctgctc
  RIGHT PRIMER    293  24  59.16  41.67  0.00  0.00  0.00 tgcttctccttacTCTTCTCTT
  PRODUCT SIZE: 234, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
2 LEFT PRIMER      64  20  64.40  70.00  0.00  0.00  0.00 cctgtccttcctgtccccg
  RIGHT PRIMER    297  24  59.59  45.83  0.00  0.00  0.00 catctgtcttccttacTCTTCT
  PRODUCT SIZE: 234, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
3 LEFT PRIMER      57  20  65.00  70.00  0.00  0.00  0.00 gcctccgcctgtccttcctg
  RIGHT PRIMER    315  22  60.74  54.55  0.00  0.00  0.00 gaaagactaccgaccagccatc
  PRODUCT SIZE: 259, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 2.42
4 LEFT PRIMER      51  20  65.65  70.00  0.00  0.00  0.00 gctgatgcctccgcctgtcc
  RIGHT PRIMER    318  21  60.67  57.14  0.00  0.00  0.00 gtggaaagactaccgaccagc
  PRODUCT SIZE: 268, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.94

Statistics
      con too in in not no tm tm high high high high
      sid many tar excl ok bad GC too too any_th 3'_th hair- poly end
      ered Ns get reg reg GC% clamp low high compl compl pin X stab ok
Left  320  0  0  0  0  0  0  0  176  0  0  0  79  0  0  65
Right 551  0  0  0  0  74  0  35  53  0  0  46  62  0  281
Pair Stats:
considered 20585, unacceptable product size 19637, tm diff too large 943, primer in pair overlaps a primer in a better pair 8913, ok 5
libprimer3 release 2.3.6

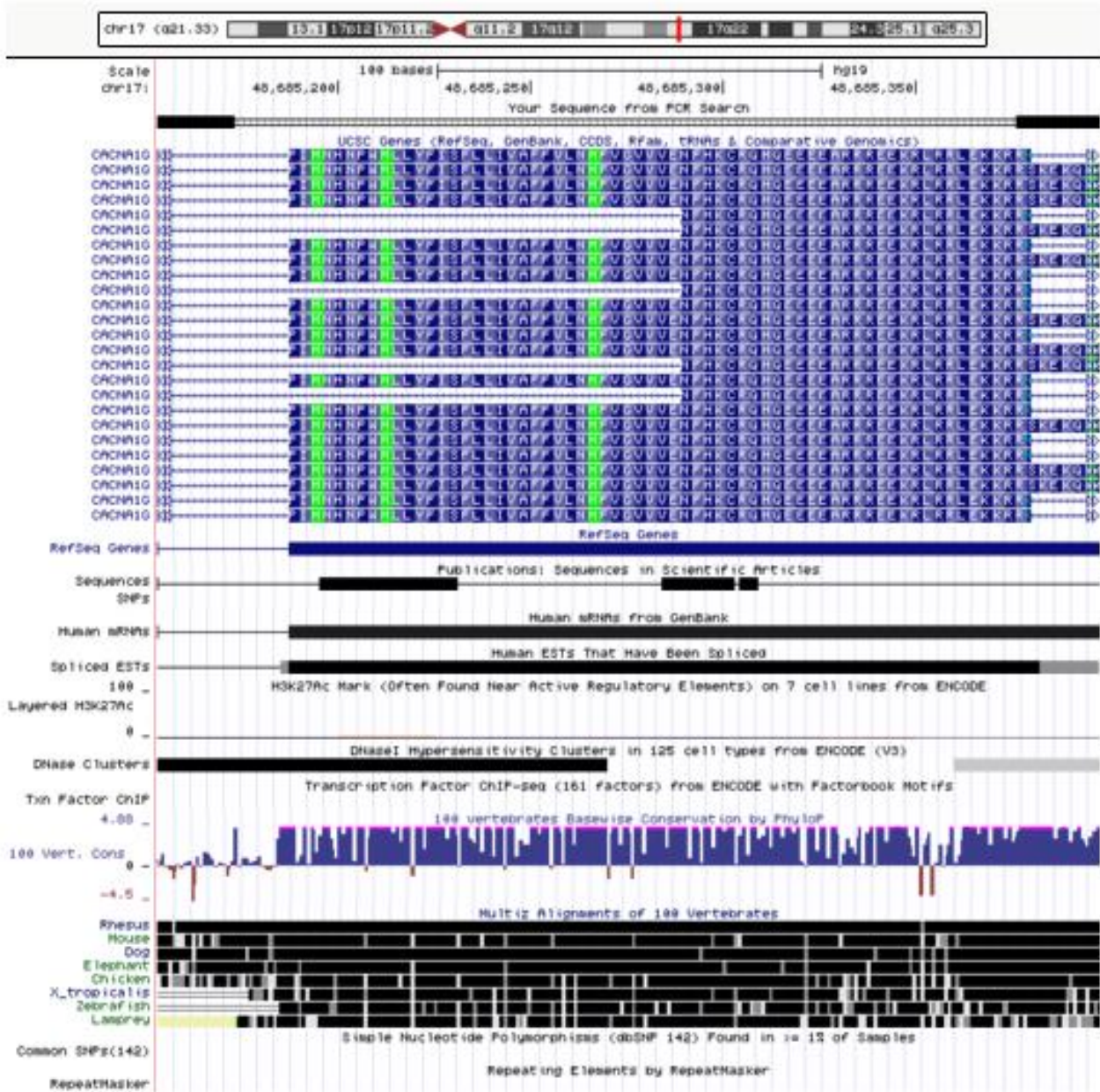
(primer3_results.cgi release 4.0.0)

```

Fotografia 48 . Primers dissenyats a la pàgina Primer 3 Input.

D'entre aquests possibles *primers*, es valorarà com a primera opció el que ens trobem en primer lloc. Compta amb molts zeros als apartats “*any_th*”, “*3'_th*” o “*hairpin*” tot i que les temperatures del *primer* en *forward* o *reverse* disten una mica, 3,97 graus centígrads.

Ara ja es pot comprovar si aquest que s’ha escollit és l’ideal o no. Per això, s’haurà d’anar a la pàgina *UCSC Browser* i aplicant paràmetres s’obindrà el següent:



Fotografia 49. Comprovació primer escollit a UCSC Browser.

En aquesta imatge es pot comprovar el fet de que en la variant no hi ha cap zona repetitiva ni cap caixa gris en l'apartat "repeat masker" (si l'hagués, també simbolitza una repeticio). Amb aquesta negativa, s'assegura que es tracti d'una mutació no descrita anteriorment.

Per poder comprovar per una altra via si els primers dissenyats són els correctes, s'haurà d'anar a la pàgina BLAST.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GATGCCTCCGCCTGTCCTTC	20	62.93	65.00	4.00	0.00
Reverse primer	CCATCTGCTTCTCCTTACTCCT	22	58.96	50.00	2.00	0.00

Products on target templates

>NC_000017.11 Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 245

Features associated with this product:

[voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G...](#)

[voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G...](#)

Forward primer	1	GATGCCTCCGCCTGTCCTTC	20
Template	50607793	50607812
Reverse primer	1	CCATCTGCTTCTCCTTACTCCT	22
Template	50608037	50608016

Fotografia 50. Comprovació primer escollit a BLAST.

En aquesta imatge del programa, es pot comprovar com el “product length” (245) és el mateix que el “product size” de la pàgina *Primer 3 Input*. A més, si es baixa la pàgina *Blast* en la qual s’han obtingut els resultats de la imatge, es pot veure que els nombres corresponents al *forward* i *reverse* de la resta de possibles primers són tots diferents entre sí.

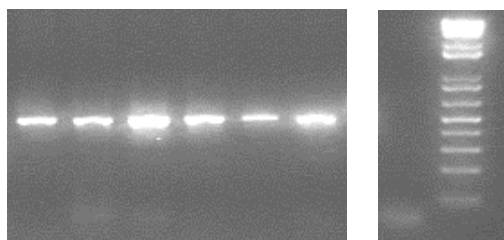
Aquest cúmulo de circumstàncies serveixen per verificar i acceptar el primer que s’ha dissenyat, format per GATGCCTCCGCCTGTCCTTC en *forward* i CCATCTGCTTCTCCTTACTCCT en *reverse*. Aquests es deixaran ben especificats en el Word on es troba la seqüència (s’ha de recordar que per a al primer en *reverse* se l’hi haurà de fer el complementari). El resultat serà el següent:

```
gttcgcaggaaccaggctgtgggcagctcctaagacagcttgcctcgggctgatgcctccgctgtccttcctgctccccgcc[agCC
CATCATGAACCACAACCCCTGGATGCTGCTGTACTTCATCTCGTTCCTGCTCATTGTGGCCTTCTTTGTCC
TGAACATGTTTGTGGGTGTGGTGGTGGAGAAGTCCACAAGTGTGGCAGCACCAGGAGGAAGAGG
AGGCCCGGCGGGGAGGAG]AAGCGCCTACGAAGACTGGAGAAAAGAGAAGGAgtaaggagaagcag
atggctggtcggtagtctttccacctctctgggtcgtgcttgacctggccttgcgactgcaggggctgggcgctggggccgggggca
gggagaagaggctcccacccccctctcacct
```

Ara es realitzarà la PCR afegint tots els components necessaris.

Primers	Trio	59	61	63	65	DMSO	DNA	H2O
CANCA1G_E25	NP0209- 1,2,3			10,11,12	13,14,15		2	2
CT-		18					0	4

Testar en agarosa 1,5% (TBE 1X):



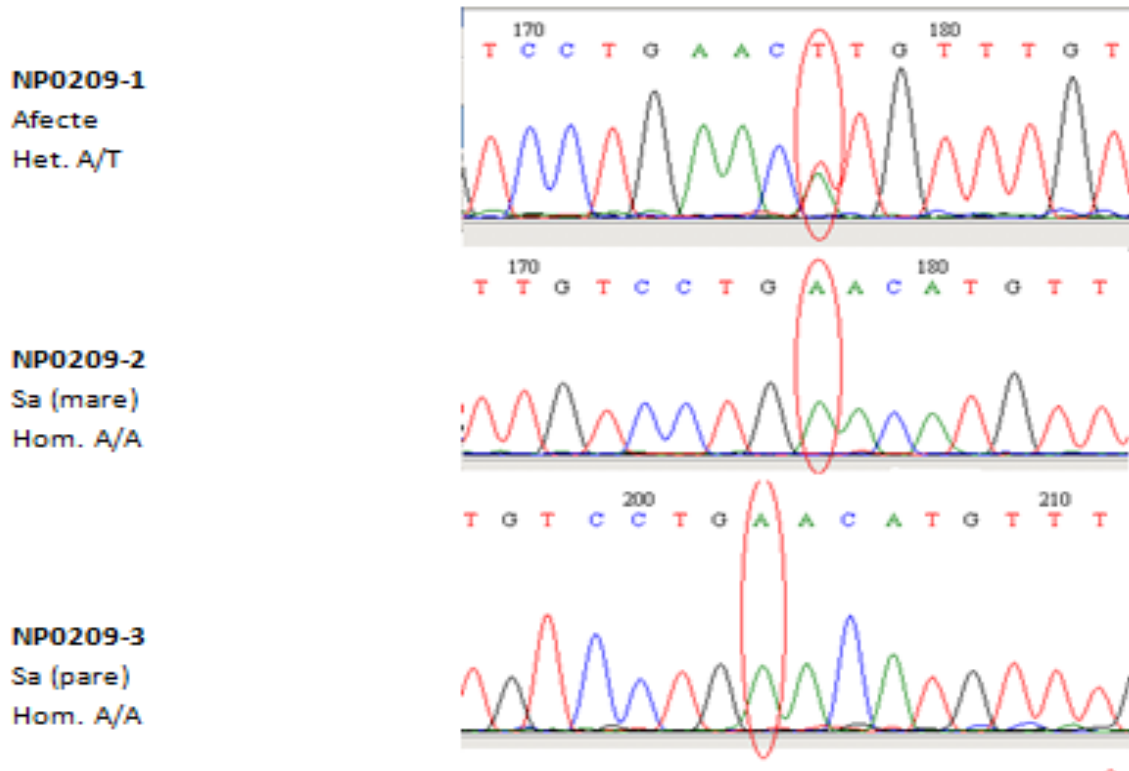
Fotgrafia 51 . PCR amb *primer* que s'ha dissenyat.

Amb aquesta ja es van obtenir els resultats desitjats en el gel d'agarosa 1,5% i per tant la tècnica va sortir correctament.

A les mostres de la PCR se li van realitzar la Purificació amb el procediment adequat, per poder acabar de netejar alguna possible brutícia.

En aquest cas, les taules en les quals es recollien les mostres per a la purificació i per a la seqüenciació no van quedar enregistrades, però els dos processos es van poder realitzar igualment al laboratori.

En la seqüenciació, la polimerasa es va aturar cada cop que es va trobar amb un dNTP de fluorescència, de manera que el resultat final va ser milions de fragments amb llargades completament diverses amb el darrer nucleòtid marcat. A aquests se'ls hi va córrer un gel d'agarosa i es van enviar a un equip especialitzat del centre on gràcies al *Bioedit* es van poder veure en forma d'electroferogrames:



Fotografia 52. Electroferogrames del pacient, mare i pare en el *Bioedit*.

En la imatge es pot comprovar com en la mateixa regió on al pacient se li produeix la variant, ell compta amb un doble pic mentre que els seus pares solament en tenen un.

Amb això es pot concloure que aquesta mutació estudiada és segurament la causa de l'EIEE, però per poder-ho ratificar completament i d'aquesta manera intentar eradicarla o pal·liar-la, s'hauria d'eleva al següent nivell i transportar-ho a l'estudi, encara per a desenvolupar, en animals.

5. CONCLUSIONS

Arribats a aquest punt, només em queda concloure el treball. Ha estat dur amb certs moments de veritable crisi, s'ha de reconèixer, però un cop mires cap endarrere i te n'adones d'on parties i veus on has arribat, no pots deixar de somriure.

Amb aquest treball he après i molt. No solament a nivells de coneixements, que els exposaré a continuació, sinó a aprendre a buscar-me la vida, a lluitar per allò que vull, a tenir les coses clares.

Vaig patir moments d'inseguretat, ja que durant un temps, a causa de la seva rellevant i constant feina, les especialistes de la Vall d'Hebron no trobaven el moment per a fer una ullada al treball o trobar un forat per a que hi anés i pogués observar de primera mà com funcionen les coses en realitat. Finalment, tot es va solucionar, i gràcies a la lucrativa i desinteressada col·laboració de l'Anna Marcé, vaig poder indagar en el món de la genètica des dels ulls d'un científic. Vaig deixar enrere els llibres i paper i vaig intentar comprendre imatges i gràfiques que desconeixia fins al moment. Va ser realment fascinant.

Respecte al nivell de coneixements adquirits, m'atreviria a dir que han estat molt alts.

A hores d'ara sóc capaç d'explicar com l'EIEE es tracta d'una patologia rara i desconeguda, que afecta a un tant per cent molt baix de la població mundial, que causa crisis epilèptiques i afectació neurològica a nadons d'edat molt temprana i que pateix una malaurada evolució en la que la meitat dels casos mor abans dels sis mesos i l'altra evoluciona cap a altres subfenotips com la síndrome de West/Ohtahara o la de Lennoux-Gastaut.

Com les causes que produeixen les crisis epilèptiques es tracten d'un error en el canal iònic, a causa del voltatge produït pel traspàs de ions de calci quan es produeix la sinapsi, i les que originarien l'EIEE pròpiament, són força heterogènies.

Per una banda trobem la recessivitat autosòmica homozigòtica o bé la de l'heterozigot compost (*chet*) i per l'altra, més rellevant, el fet de que es tracti d'una mutació

genètica *de novo* dominant, és a dir, que aparegui una variant per primer cop en una família.

Com bàsicament els símptomes que fan referència a la malaltia es tracten d'un retard mental, amb problemes de desenvolupament del cervell i de la mida del crani, greus problemes psicomotors i sobretot, les convulsions i espasmes propis de les crisis epilèptiques.

I com els tractaments que s'usen per a pal·liar-la consisteixen en un seguit de fàrmacs antiepilèptics i una complementària i prescindible, dieta cetogènica, en la qual es redueix dràsticament el consum de glúcids, per a que el cervell recorri a l'oxidació dels lípids, originant els cossos cetònics.

També sóc capaç d'explicar tot el procés que es realitza per a l'estudi genètic d'aquelles variants que poden causar l'EIEE.

Aquest parteix des de l'extracció d'una mostra de sang del pacient i dels pares, sempre amb el seu consentiment, i la posterior diferenciació del DNA d'aquests.

A partir d'aquí, s'inicia un seguit de passos en els quals es filtren totes aquelles variants que, gràcies a la comparació amb el genoma universal, estàndard, han sortit com a possibles. Des de l'Excel, l'*IGV analysis*, l'*Exac Browser* fins l'*UCSC Browser*, es podrà veure si les variants s'han descrit abans o no per l'EIEE i sobretot, veure si aquestes s'ajusten als paràmetres necessaris per a que la variant origini la patologia d'estudi.

A més, tot aquests filtratges es complementaran amb la tècnica Sanger, la tecnologia de seqüenciació tradicional.

Aquesta comença amb el disseny dels *Primers* gràcies el programa *Primer 3*, que es comprovaran amb l'*UCSC Browser* i el *BLAST*.

A continuació, gràcies als *Primers* que s'han dissenyat, es realitzarà la PCR i la posterior Purificació fins arribar a la Reacció de Seqüència, on a partir dels resultats de la PCR purificada més la unió d'altres components, en els que s'inclouen un sol *primer*, un *buffer*, el magnesi, els dNTPs i els essencials dNTPs marcats amb fluorescència, es

podran comprovar els resultats en forma d'electroferograma i veure realment si aquella mutació que es prediu pot ser la causa o no de l'EIEE en el pacient.

Així doncs, concloc el treball donant compliment als objectius que em vaig proposar al començament. Ara sé exactament de què tracta la malaltia. He estudiat, amb tota la documentació actualitzada que m'han proporcionat, les seves causes, he pogut classificar els diferents tipus d'origen genètic que la indueixen i he estudiat la seva simptomatologia. En la part experimental he aplicat el protocol establert en l'actualitat per al seu estudi, i això m'ha fet poder validar la hipòtesi, premissa fonamental de la meva recerca, ja que l'estudi de casos anònims proporcionats m'ha permès demostrar, igual que ho estan fent els estudis que es porten als centres de recerca, que els diferents síndromes epilèptics que pateixen els pacients tenen el seu origen en les mutacions de diferents gens.

6. REFERÈNCIES

¹FELD, Víctor; VITA, Cristina <<Encefalopatía Epiléptica Infantil Temprana (EIT)-Manifestación clínica, etiología y tratamiento neonatal, a propósito de un caso>>. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá* [Buenos Aires, Argentina] vol. 30, núm. 2 (2011), pp. 54-57.

²Dades extretes del llibre digital datat l'any 2012, *Neurolinks en Epilepsia*, redactat pels neuròlegs Juan Carlos Martínez Castrillo i M^a Mercedes Falip Centellas.

³BEAL, Jules C., CERIAN Koshi, MOSHE, Solomon L. <<Early-Onset Epileptic Encephalopathies: Ohtahara Syndrome and Early Myoclonic Encephalopathy>> *Elsevier Journal* [New York, EEUU] vol. 47 (2012) pp. 317-323

⁴HELBIG, Ingo. *The OMIM epileptic encephalopathy genes- Review* [en línia] Lloc d'edició: Blog Channelopathist @ EuroEPINOMICS, 4 maig del 2014.
<https://euroepinomics.wordpress.com/2014/05/04/the-omim-epileptic-encephalopathy-genes-a-2014-review/> (11-10-2015).

⁵ *Los arrays-CGH, el nuevo referente de tecnología diagnóstica y análisis genético en el campo del retraso mental y las malformaciones congénitas*. [en línia] Sala de Prensa 2012, Instituto Roche.
[insitutoroche.es/Prensa/56/Los arrays CGH el nuevo referente de tecnologia diagnostica y analisis genetico en el campo del retraso mental y las malformaciones congenitas/?any=2012](http://insitutoroche.es/Prensa/56/Los_arrays_CGH_el_nuevo_referente_de_tecnologia_diagnostica_y_analisis_genetico_en_el_campo_del_retraso_mental_y_las_malformaciones_congenitas/?any=2012) (2012).

⁶EDVARSON, S.; OZ, S.; ABULHIJAA, Fa.; TAHER, Fb.; SHAAQ, A.; ZENVIRT, S.; DASCAL, N.; ELPELEQ, O. <<Early infantile epileptic encephalopathy associated with a high voltage gated calcium channelopathy>> *Pubmed.gov* [Jerusalem, Israel] vol. 50, núm. 2 (Febrer 2013) pp. 118-123

⁷ CARRIZOSA MOOG, Jaime; CORNEJO OCHOA, William <<Canalopatías epilépticas>> *latreia* [Medellín, Colombia] vol. 16, núm. 3 (Setembre 2003)

⁸CATTERALL, Wa; SWANSON, Tm. <<Structural basis for pharmacology of Voltage-gated sodium and calcium channels>> *Pubmed.gov* [Seattle, Washington] vol. 88, núm. 1 (Juliol 2015) pp.141-50

⁹ EuroEPINOMICS-RES Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project; EPI4K Consortium <<De novo mutations in synaptic transmission genes including DNM1 cause epileptic encephalopathies>> *Pubmed.gov*. vol.95, núm. 4. (2 d'Octubre de 2014) pp.360-370

¹⁰ EPI4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project <<De novo mutations in epileptic encephalopathies>> *Nature*. vol. 501 (12 de Setembre de 2013) pp.217-221

¹¹ GÜRSOY, S.; ERÇAL, D. <<Diagnostic approach to genetic causes of Early-Onset Epileptic Encephalopathy>> *Pubmed.org* [Izmir, Turkey] (13 d'Agost de 2013)

¹² SAITSU, H. and Collaborators <<STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern>> *Pubmed.org* [Yokohama, Japan] vol. 51. núm. 12 (Desembre 2010) pp. 2397-405

¹³ *Zonizamida* [en línia]. SEN, Grupo de Epilepsia. www.epilepsiasen.net/85

¹⁴ *Un pez de acuario y de... ¡laboratorio!* [en línia] CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. www.seresmodelicos.csic.es/peix.html

¹⁵ *El genoma del pez cebra lo impulsa como modelo para estudiar enfermedades* [en línia] SINC. <http://www.agenciasinc.es/Noticias/El-genoma-del-pezebra-lo-impulsa-como-modelo-para-estudiar-enfermedades>

7. IMATGES

Fotografia 1: extreta del projecte de recerca de quart d'ESO de l'escola el Cim. La fotografia pertany al llibre digital Santillana de Biologia i Geologia 4rt ESO.

(25 / 08 / 2015)

Fotografia 2 : circgenetics.ahajournals.org/content/2/2/182/F2.expansion.html

(25 / 08 / 2015)

Fotografia 3: es.slideshare.net/aleeechaan/herencia-autonmica-dominante [pàgina 4 de 35] (12 / 10 / 2015)

Fotografia 4:

www.elmundo.es/elmundosalud/2012/06/15/neurociencia/1339780209.html

i www.nature.com/ng/journal/v40/n6/fig_tab/ng.150_F3.html (4 / 09 / 2015)

Fotografia 5: es.dreamstime.com/foto-de-archivo-colocaci3n-del-electrodo-de-egg-image29444803 (12 / 09 / 2015)

Fotografia 6: www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92272003000400004 (12 / 09 / 2015)

Fotografia 7: es.slideshare.net/scottyandjim/dr-john-millichap-kcnq2-summit-parent-track?qid=d3c49029-79f5-4105-a1f0-541ab2e5b9f08&v=qf1&b=&from-search=1
[pàgina 15 de 38] (12 / 09 / 2015)

Fotografia 8: http://www.revistahospitalarias.org/info_2003/02_172_07.htm

(24 / 12 / 2015)

Fotografia 9: www.medigraphic.com/pdfs/pediat/sp-2007/sp073d.pdf

(12 / 09 / 2015)

Fotografia 10: elaboració pròpia amb el Paint. (23 / 12 / 2015)

Fotografia 11: <http://elpebrasset.blogspot.com.es/2012/05/materials-de-camuflatge-inspirats-en.html> (24 / 12 / 2015)

Fotografia 12: <http://exac.broadinstitute.org/region/9-138671275-138671275>

(4 / 12 / 2015)

Fotografia 13: https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr9%3A138671271-138671279&hgsid=211928458_94e5EeAGMfnWVR7ATTvFDhiFQA0w (4 / 12 / 2015)

Fotografia 14: elaboració pròpia amb el Paint a partir d'un Excel pertanyent a l'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (4 / 12 / 2015)

Fotografia 15: <http://primer3.ut.ee/> (28 / 12 / 2015)

Fotografia 16: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr9%3A138671150-138671391&hgsid=464912149_y8TiigaihcC1pzKYL5TH4tupriQM (28 / 12 / 2015)

Fotografia 17: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451296381&job_key=JzzYSolAIGQbWh9UfnotKmVXHzt2SAI-&CheckStatus=Check (28 / 12 / 2015)

Fotografia 18: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (28 / 12 / 2015)

Fotografia 19: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (28 / 12 / 2015)

Fotografia 20: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (28 / 12 / 2015)

Fotografia 21: <http://exac.broadinstitute.org/region/5-161317999-161317999>

(28 / 12 / 2015)

Fotografia 22: https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A161317997-161318001&hgsid=211932735_FtAKfifnoAZPdi5WtTYJ7kaOSRRC (28 / 12 / 2015)

Fotografia 23: elaboració pròpia amb el Paint a partir d'un Excel pertanyent a l'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (28 / 12 / 2015)

Fotografia 24: <http://primer3.ut.ee/> (28 / 12 / 2015)

Fotografia 25: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A161317872-161318105&hgid=465266621_aoxP6LW94AmA7kK3my8dVeSixofE (28 / 12 / 2015)

Fotografia 26: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451324769&job_key=OCPHUo5YJ3wcQhhMeWlqMmJPGCNxUAUm&CheckStatus=Check (28 / 12 / 2015)

Fotografia 27: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (28 / 12 / 2015)

Fotografia 28: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (28 / 12 / 2015)

Fotografia 29: <http://exac.broadinstitute.org/region/X-48767275-48767275>

(29 / 12 / 2015)

Fotografia 30: https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chrX%3A48767275-48767275&hgid=211937419_PL8LeLuzCoG7xjBuYYTghz0yELe (29 / 12 / 2015)

Fotografia 31: elaboració pròpia amb el Paint a partir d'un Excel pertanyent a l'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (29 / 12 / 2015)

Fotografia 32: http://primer3.ut.ee/cgi-bin/primer3/primer3web_results.cgi

(29 / 12 / 2015)

Fotografia 33: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chrX%3A48767154-48767439&hgid=465484467_ycbwtNGRXzW49aixNwvkh5xV6Aea (29 / 12 / 2015)

Fotografia 34: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451390213&job_key=AArFDzD3PV8aYThkNQQcVk8fDWRiDBZ5Yw (29 / 12 / 2015)

Fotografia 35: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (29 / 12 / 2015)

Fotografia 36: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (29 / 12 / 2015)

Fotografia 37: <http://exac.broadinstitute.org/region/20-62071037-62071037>

(29 / 12 / 2015)

Fotografia 38: [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62071037-62071037&hgid=211939850_LKkciUbAFLUifv2igoOBADw7Kpp1)

[bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62071037-](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62071037-62071037&hgid=211939850_LKkciUbAFLUifv2igoOBADw7Kpp1)

[62071037&hgid=211939850_LKkciUbAFLUifv2igoOBADw7Kpp1](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62071037-62071037&hgid=211939850_LKkciUbAFLUifv2igoOBADw7Kpp1) (29 / 12 / 2015)

Fotografia 39: elaboració pròpia amb el Paint a partir d'un Excel pertanyent a l'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (29 / 12 / 2015)

Fotografia 40: http://primer3.ut.ee/cgi-bin/primer3/primer3web_results.cgi

(30 / 12 / 2015)

Fotografia 41: [https://genome.ucsc.edu/cgi-](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62070933-62071161&hgid=465753241_ShRr7nic5K6F9kk510i9TzHyPg1q)

[bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62070933-](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62070933-62071161&hgid=465753241_ShRr7nic5K6F9kk510i9TzHyPg1q)

[62071161&hgid=465753241_ShRr7nic5K6F9kk510i9TzHyPg1q](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr20%3A62070933-62071161&hgid=465753241_ShRr7nic5K6F9kk510i9TzHyPg1q) (30 / 12 / 2015)

Fotografia 42: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451470448&job_key=m5FEIZ5Tk_u0wQPEDgQn9nS_NsRZrC3ZWA&CheckStatus=Check)

[blast/primertool.cgi?ctg_time=1451470448&job_key=m5FEIZ5Tk_u0wQPEDgQn9nS_N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451470448&job_key=m5FEIZ5Tk_u0wQPEDgQn9nS_NsRZrC3ZWA&CheckStatus=Check)

[sRZrC3ZWA&CheckStatus=Check](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451470448&job_key=m5FEIZ5Tk_u0wQPEDgQn9nS_NsRZrC3ZWA&CheckStatus=Check) (30 / 12 / 2015)

Fotografia 43: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (30 / 12 / 2015)

Fotografia 44: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (30 / 12 / 2015)

Fotografia 45: <http://exac.broadinstitute.org/region/17-48685266-48685266>

(30 / 12 / 2015)

Fotografia 46: [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685262-48685269&hgid=211940733_eTjfu2fmEfpTAM45Oua2KWok2dom)

[bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685262-](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685262-48685269&hgid=211940733_eTjfu2fmEfpTAM45Oua2KWok2dom)

[48685269&hgid=211940733_eTjfu2fmEfpTAM45Oua2KWok2dom](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685262-48685269&hgid=211940733_eTjfu2fmEfpTAM45Oua2KWok2dom) (30 / 12 / 2015)

Fotografia 47: elaboració pròpia amb el Paint a partir d'un Excel pertanyent a l'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (3 / 01 / 2016)

Fotografia 48: http://primer3.ut.ee/cgi-bin/primer3/primer3web_results.cgi

(3 / 01 / 2016)

Fotografia 49: [https://genome.ucsc.edu/cgi-](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685154-48685398&hgsid=466686451_ohilzCvFqH5gRyDaHQ353EpKLdEP)

[bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685154-](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685154-48685398&hgsid=466686451_ohilzCvFqH5gRyDaHQ353EpKLdEP)

[48685398&hgsid=466686451_ohilzCvFqH5gRyDaHQ353EpKLdEP](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685154-48685398&hgsid=466686451_ohilzCvFqH5gRyDaHQ353EpKLdEP) (3 / 01 / 2016)

Fotografia 50: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451814615&job_key=wsgdzSg-JxYALLcpukmTG8BSgintQZk07A&CheckStatus=Check)

[blast/primertool.cgi?ctg_time=1451814615&job_key=wsgdzSg-](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451814615&job_key=wsgdzSg-JxYALLcpukmTG8BSgintQZk07A&CheckStatus=Check)

[JxYALLcpukmTG8BSgintQZk07A&CheckStatus=Check](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451814615&job_key=wsgdzSg-JxYALLcpukmTG8BSgintQZk07A&CheckStatus=Check) (3 / 01 / 2016)

Fotografia 51: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (3 / 01 / 2016)

Fotografia 52: Imatge d'arxiu de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. (3 / 01 / 2016)

8. GLOSSARI

AL·LEL: cadascuna de les formes alternatives que pot presentar un gen que ocupa el mateix lloc en un cromosoma determinat o en dos cromosomes homòlegs, i que expressa diferentment un mateix caràcter.

Hi ha l'al·lel de referència, que segons el genoma universal és el que tothom hauria de tenir i l'al·lel alternatiu, que és el que es veu mutat.

AMNIOCENTESI: prova prenatal comunament utilitzada per diagnosticar alguns defectes congènits i trastorns genètics.

Consisteix en realitzar punció en l'úter a través de la paret abdominal de la mare, en la sisena setmana de gestació, per obtenir líquid amniòtic. Un cop s'agafa la mostra, es portarà al laboratori on es farà un centrifugat per delimitar el que és líquid del que són les cèl·lules del fetus. Després se'n farà un cultiu cel·lular i a partir d'aquest, es determinarà el sexe i les possibles anomalies del fetus.

Aquesta prova s'acostuma a recomanar a dones que són majors de 35 anys (l'edat suposa un factor de risc), a dones que han tingut un fill o un embaràs amb un defecte congènit, a dones amb resultats anormals en la prova de detecció (anàlisis usat per a determinar anomalies genètiques) o a dones amb un historial mèdic familiar amb alguna malaltia genètica.

En l'amniocentesi trobem certs riscos com l'avortament (menys d'un 0,5% dels casos), la pèrdua de líquid amniòtic, la possibilitat de sagnar i patir dolors menstruals o de tenir infeccions.

ATÀXIA: incapacitat de coordinar els moviments musculars voluntaris.

ATRÒFIA CEREBRAL: disminució de la mida del cervell que afecta a una part o a la totalitat del cervell. Genera una pèrdua de massa cerebral i comporta trastorns neurològics.

BASE NITROGENADA: denominació dels derivats de la purina (Adenina i Guanina) i dels de la pirimidina (Citosina, Uracil i Timina) que formen part dels àcids nucleics.

BUFFER: solució reguladora formada a partir de la mescla de concentracions relativament elevades d'un àcid dèbil i la seva base conjugada. Conté tots els elements necessaris per a que la polimerasa funcioni.

CANALOPATÍA: trastorn neurològic que afecta a l'excitabilitat de la membrana muscular, associat a mutacions en els canals de calci, sodi, potassi i els receptors d'acetilcolina.

CARIOTIP: descripció de la dotació cromosòmica d'un organisme atenent al nombre, mida i forma dels cromosomes de les seves cèl·lules.

CIRCARDIÀ DIÛRN: cicle de vint-i-quatre hores amb els inherents processos bioquímics, fisiològics o de comportament. Es troben en els patrons de son o d'alimentació, e influeixen en la temperatura del cos, l'activitat del cervell, la producció d'hormones i la regeneració cel·lular, d'entre d'altres.

COS CALLÓS: làmina de fibres comissurals que uneix els dos hemisferis del cervell.

CROMOSOMA: estructura cel·lular formada per DNA i proteïnes associades, que transporta la informació genètica.

CROMOSOMES HOMÒLEGS: cromosomes que formen un parell dels 23 existents en el cariotip humà. Es recombinen durant la meiosi i tenen la mateixa estructura i els mateixos locus, però diferents al·lels, ja que cadascun procedeix d'un progenitor.

ECOGRAFIA: examen imagenecològic que utilitza les ones sonores per veure com s'està desenvolupant el fetus en l'úter de la mare. També s'utilitza per inspeccionar els òrgans interns de la mare durant l'embaràs.

Les ecografies que es produeixen durant el primer trimestre de l'embaràs són per confirmar un embaràs normal, per a determinar l'edat del fetus i la seva freqüència cardíaca, per descartar embarassos múltiples i per identificar possibles problemes a la placenta, úter, ovaris, pelvis... Que puguin afectar al bebè.

Encefalopatia Epilèptica d'Inici Precoç

Les ecografies que es produeixen durant el segon i tercer trimestre es fan per determinar l'edat del fetus, el seu creixement, la seva posició i el seu sexe.

Aquesta prova del diagnòstic prenatal no comporta riscos ni per al fetus ni per a la mare ja que usa tècniques d'ultrasò.

ELECTROFEROGRAMA: gràfic realitzat a partir dels resultats d'una anàlisi per electroforesis. Mostra la seqüència de dades produïda per una màquina automàtica de seqüenciació d'ADN.

ELECTROFORESIS: tècnica per a separar molècules segons la seva mobilitat en un camp elèctric.

ENZIMS DE REPARACIÓ: enzim encarregat de corregir els danys, els possibles errors, en el DNA.

EXÓ: porció de gen d'un organisme eucariota, és a dir, que posseeix cèl·lules amb nucli, que és transcrita i traduïda a proteïna.

FALCON: tub de 50 ml de plàstic.



FENOTIP: conjunt de caràcters visibles que un organisme presenta com a resultat de la interacció entre el seu genotip i el medi ambient (gènic, físic, hormonal...)

FORWARD: que va cap endavant.

GENOTIP: constitució, informació genètica total d'un organisme.

HETEROGENEÏTAT ETIOLÒGICA: variabilitat en les causes d'una malaltia.

HIPOCAMP: protuberància blanca, allargada i semicircular, que ocupa la part externa del diverticle esfenoïdal de cadascun dels ventricles laterals del cervell.

INTRÓ: porció de gen d'un organisme eucariota, és a dir, que posseeix cèl·lules amb nucli, que no és transcrita ni traduïda a proteïna.

LISI: trencament de la membrana cel·lular.

MALALTIA NEURODEGENERATIVA: malaltia produïda per la mort progressiva de les neurones en diferents zones del sistema nerviós. Alguns exemples ho són l'Esclerosi Múltiple, l'Alzheimer i el Parkinson.

MEDUSA d'ADN: quan en l'extracció de DNA s'introdueix l'etanol, el DNA precipita i resta una substància filamentosa blanquinosa, la qual s'anomena medusa. El protocol dicta que a continuació, aquesta s'extraurà amb l'ajut d'una pipeta.



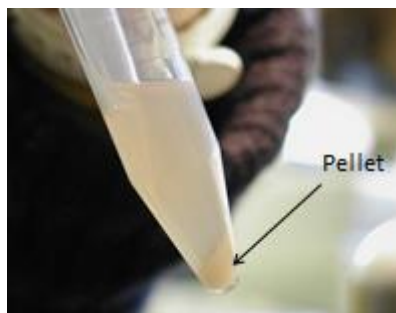
MIGRANYA: mal de cap nerviós que dona sovint mareig i afecta generalment a la meitat del cap.

NANODROP: espectrofotòmetre que mesura concentracions de mostres amb exactitud i reproductibilitat.

NUCLEÒTID: cadascun dels èsters de l'àcid fosfòric amb un nucleòsid, en els quals l'àcid fosfòric és esterificat amb un dels grups hidroxil (OH) lliures de la pentosa.

NUCLI CAUDAT: o nucli interventricular. Part superior i interna del cos estriat. Forma part de la part externa del sòl del ventricle lateral. S'hi distingeixen dos extrems, el cap i la cua, units per una porció intermediària.

PELET: substància que queda precipitada al fons del tub quan es centrifuga.



POLIMERASA: enzim que catalitza la duplicació o síntesi de l'ADN a partir dels desoxiribonucleòsids trifosfats com a precursors.

POLIMORFISME: presència de més d'una variant al·lèlica per a un determinat gen.

PUNCIÓ del CORDÓ UMBILICAL: prova de diagnòstic prenatal que consisteix en extreure sang directament del cordó umbilical per mitjà d'una punció abdominal sota control ecogràfic.

A continuació es farà un anàlisi de sang i s'estudiaran els cromosomes dels fetus per veure si hi ha alguna alteració.

Aquesta prova s'acostuma a recomanar durant la divuitena, dinovena o vintena setmana de gestació quan es sospita, amb cert retard, la possibilitat que el fetus presenti alguna mena de malformació.

Un dels riscos més grans que té aquesta tècnica és l'avortament involuntari.

REVERSE: que va cap endarrere. Sentit contrari al *forward*.

SEQÜENCIADOR HiSeq: aparell que s'encarrega de seqüenciar mostres d'ADN i permet unes anàlisis primàries i secundàries de seqüències.

SEPTUM LUCIDUM: membrana que separa els dos ventricles cerebrals.

SINAPSI: regió de comunicació, per contigüïtat, i de transmissió d'impulsos nerviosos entre l'axó d'una neurona i les dendrites o el cos d'una altra neurona.

SPLICING: procés en el qual els introns es remouen i s'uneixen exons en el RNA missatger abans de deixar el nucli.

TÀLEM: gangli cerebral, parió, situat davant i fora dels tubercles quadrigèmins, darrere i dins del cos estriat, als costats del tercer ventricle i per sota dels ventricles laterals.

TE: tampó que s'usa per a dissoldre l'ADN després d'haver pescat la medusa d'ADN en el procés d'extracció d'aquest. En aquesta solució l'ADN és més estable que no pas en aigua.

TRADUCCIÓ: procés mitjançant el qual una determinada seqüència de nucleòtids de l'ARN missatger és converteix en una determinada seqüència d'aminoàcids (codi genètic) gràcies als ribosomes.

TRANSCRIPCIÓ: procés pel qual la informació genètica codificada en una fibra d'ADN és copiada en una fibra d'ARN missatger mitjançant la seqüència de nucleòtids que el componen.

TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS: són episodis bruscs de curta duració i recuperació espontània de l'estat basal, produïts per una disfunció cerebral diferent a una descàrrega anormal.

TUB *NUNC*: recipient en forma de con que s'usen per a centrifugacions.

VÒRTEX: dispositiu senzill que s'usa comunament en els laboratoris per agitar tubs amb líquid dins.

ZIGOT: o cèl·lula ou. Cèl·lula amb doble dotació cromosòmica formada per la fusió d'un gàmeta femení (òvul) amb un gàmeta masculí (espermatozoide) abans de començar la segmentació.

9. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

Albaradie, R. (2011) "Epileptic Encephalopathy Syndromes in Infancy". *InTech*. Dammam University and King Fahd Specialist Hospital-Dammam, Saudi Arabia.

Epi4K Consortium & Epilepsy Phenome / Genome Project. (August 2013). "De novo mutations in epileptic encephalopathies". *Nature*. Número 12439.

Hernández Valdivia, C.M. (Noviembre 2005). "Corrientes de calcio a través del canal mutante *leaner* expresado en un sistema heterólogo". Doctorado en ciencias fisiológicas con especialidad en fisiología, Universidad de Colima.

Nabbout, Dr R. (July 2004). "Early infantile epileptic encephalopathy". *Orphanet Encyclopedia*. Département de maladies métaboliques et de Neurologie, Hôpital Necker Enfants Malades, 9 rue de Sèvres, Paris, France.

Otsuka, M. Yamamoto, T. I altres. (2010). "STXBP 1 mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome – Result of Japanese cohort study". *Epilepsia*. Volum 51, número 12, pàgines 2449-2452. Japan.

Panayiotopoulos, C.P. (2010). *Atlas of Epilepsies*. London. Springer.

Pavel, K. I altres. (November 2002). "Successful treatment of Ohtahara syndrome with chloral hydrate". *Pediatric Neurology*. Volum 27, publicació 5, Pàgines 388-391.

Peris Vidal, A. I Núñez Gómez, F. (2012). "Publicación de los resultados de la investigación". *Pediatría Integral*. Volum XVI, número 10, pàgines 821.e.1-821.e.7. Hospital Clínico Universitario, Valencia.

Consultat per darrera vegada l'Agost de 2015:

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/25262651

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/23934111

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/25266964

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/19666878

www.genagen.es/area-pacientes/informacion-genetica-y-enfermedades-hereditarias/conceptos-genetica/tipos-de-herencia-genetica/mutacion-de-novo/

www.guiametabolica.org/noticia/exoma-su-papel-diagnostico-errores-congenitos-metabolismo

biocorelabs.com/our-causes/secuenciacion-de-exoma

www.termcat.cat/es/Diccionario-en-linia/140/fitxes/català/c/20/

www.rarediseasesnetwork.org/cinch/espanol/aprendemas/glosario.htm

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/22548976

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/18469812

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/11701283

<https://www.preventiongenetics.com/clinical-dna-testing/test/early-infantile-epileptic-encephalopathy-recessive-nextgen-sequencing-ngl-panel/2747>

<http://neuropedwikia.es/content/encefalopatas-epilepticas-precoces-desde-la-vision-clasica-la-genetica-en-epilepsia#.VdLnQbLtmko>

<http://www.nodiagnosticado.es/enfermedades/Sindrome-de-Ohtahara/sintomas.htm>

http://www.opha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_Simple.php?Ing=EN&dataid=889&MISSING%20CONTENT=Early-infantile-epileptic-encephalopathy&search=Disease_Search_Simple&title=Early-infantile-epileptic-encephalopathy

<http://www.encyclopediasalud.com/>

<http://www.hospitaldenens.com/guia-de-salut-i-malalties/epilepsia-infantil>

www.medmol.es/glosario/6/

<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000694.htm>

dnatesting.uchicago.edu/tests/184

Consultat per darrera vegada el Setembre de 2015:

<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003931.htm>

<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003791.htm>

<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003786.htm>

blocs.xtec.cat/biologia4mp/2009/08/19/projecte-genoma-humà/

www.hpc.org.ar/v2/v-art-rev.asp?id=795&offset=12

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/11068169

www.ncbi.nlm.gov/pubmed/24907925

www.clc.cl/CENTROS-Y-ESPECIALIDADES/Centros/Centro-Avanzado-de-Epilepsia/Noticias/Te-puede-interesar/Dieta-Cetogenica-Una-receta-para-la-epilepsia.aspx

www.neurowikia.es/content/dieta-cetogénica-para-la-epilepsia

<https://nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a603008-es.html#other-uses>

http://link.springer.com/article/10.1007%2F978-1-84882-128-6_120#page-1

[http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-84882-128-6_120#page-](http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-84882-128-6_120#page-1)

[1](#)

Consultat per darrera vegada l'Octubre del 2015:

<http://www.neurolinks.es/Epilepsia/0202.html#A03>

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91218911003>

<https://euroepinomics.wordpress.com/2014/05/04/the-omim-epileptic-encephalopathy-genes-a-2014-review/>

http://instituto-roche.es/Prensa/56/Los_arrays_CGH_el_nuevo_referente_de_tecnologia_diagnostica_y_analisis_genetico_en_el_campo_del_retraso_mental_y_las_malformaciones_congenitas/?any=2012

http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=1934

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98182/>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887899412002688>

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848093

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339110

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25262651

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887364

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26271793

www.nature.com/nature/journal/v501/n7466/full/nature12439.html

Consultat per darrera vegada el Desembre del 2015:

<http://exac.broadinstitute.org/region/9-138671275-138671275>

[https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr9%3A138671271-138671279&hgid=211928458_94e5EeAGMfnWVR7ATTvFDhiFQA0w)

[bin/hgTracks?db=hg19&position=chr9%3A138671271-](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr9%3A138671271-138671279&hgid=211928458_94e5EeAGMfnWVR7ATTvFDhiFQA0w)

[138671279&hgid=211928458_94e5EeAGMfnWVR7ATTvFDhiFQA0w](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr9%3A138671271-138671279&hgid=211928458_94e5EeAGMfnWVR7ATTvFDhiFQA0w)

<http://www.shareyouressays.com/112661/brief-notes-on-wobble-hypothesis-of-genetic-code>

www.uniprot.org/uniprot/043497

ghr.nlm.nih.gov/gene/TET2

pendientedemigracion.ucm.es/infor/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm

seresmodelicos.csic.es/peix.html

https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr9%3A138671150-138671391&hgid=464912149_y8TiigaihC1pzKYL5TH4tupriQM

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451296381&job_key=JzzYSolAIGQbWh9UfnotKmVXHzt2SAI-&CheckStatus=Check

Consultat per darrera vegada el Gener del 2016:

http://primer3.ut.ee/cgi-bin/primer3/primer3web_results.cgi

https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr17%3A48685154-48685398&hgid=466686451_ohilzCvFqH5gRyDaHQ353EpKLdEP

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1451814615&job_key=wsgdzSg-JxYALLcpukmTG8BSgintQZk07A&CheckStatus=Check



ENCEFALOPATIA EPILÈPTICA d'INICI PRECOÇ

UNA APROXIMACIÓ A L'ESTUDI GENÈTIC

ANNEXOS

ÍNDEX d'ANNEXOS

ANNEX I. PROTCOLS

- i. Extracció del DNA
- ii. PCR
- iii. Purificació
- iv. Seqüenciació

ANNEX II. IMATGES PCR

ANNEX I. PROTOCOLS

i.Extracció del DNA

Protocol adaptat de Miller et al. 1988.

Referència: Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, 1988. 16(3): p. 1215.

La sang pot ser fresca o congelada (menys rendiment).

Normalment fem fins a 20 mL de sang màxim.

1. LISIS D'ERITRÒCITS

Posar la sang en un falcon de 50 cc.

Afegir solució de **lisis d'eritròcits** fins a 45 cc.

Solució de LISIS D'ERITRÒCITS → FER AL MOMENT

TRIS 2M (pH 7,5)	5 mL
MgCl₂ 1M	2,5 mL
MilliQ autoclavada	fins 500 mL

Agitar manualment molt fort fins a homogeneïtzar.

Es pot deixar una estona (30-60 min) a la nevera perquè la lisis sigui millor. (NO obligatori)

Centrifugar **15 min** a **3500 rpm** a **4°C sense fre**.

→ **Sangs fresques**: extreure sobrenedant amb pipeta pasteur acoblada a buit vigilant de no emportar-nos els leucòcits.

→ **Sangs congelades**: invertir una vegada suaument comprovant que el pelet de leucòcits no es deixa anar del cul del falcon. **Decantar** el sobrenedant.

Afegir novament solució de **lisis d'eritròcits** fins a 45 cc.

Agitar manualment molt fort fins a homogeneïtzar.

Centrifugar **15 min** a **3500 rpm** a **4°C sense fre**.

Invertir una vegada suaument comprovant que el pelet de leucos no es deixa anar del cul del falcon. **Decantar** el sobrenedant.

En aquest punt es pot congelar el pelet de leucòcits a -20°C . No es recomana si es parteix de sangs congelades.

2. DIGESTIÓ DE PROTEÏNES

Afegir **3 mL** de solució de **lisis de leucòcits WCLB**.

Afegir **200 μL** de **SDS 10%**.

Afegir **500 μL** de **solució de proteïnasa K**.

Agitar amb **vòrtex** fins a observar un aspecte homogeni. Ha de fer espuma (fins que l'espuma no puja).

Deixar a **37°C** al **bany d'aigua** en agitació durant **tota la nit** (mínim 12h).

3. EXTRACIÓ DE DNA (salting out procedure)

Si hi ha temps, deixar refredar els falcons.

Afegir **1mL** de **NaCl saturat a 5,5M**.

Agitar amb **vòrtex** (quedarà bastant dens). Deixar refredar una estona a la nevera.

Centrifugar **15 min** a **3500 rpm** a **4°C** sense fre.

Si la sal no es veu precipitada s'haurà de deixar un mínim de 30 min a la nevera i tornar a centrifugar.

Traspassar el **sobrenedant** a un segon falcon de 50 cc.

Centrifugar **15 min** a **3500 rpm** a **4°C** sense fre.

Traspassar el **sobrenedant** a un tercer falcon de 50 cc.

Afegir **v/v** de **cloroform**.

Agitar manualment 15''.

Centrifugar **15-20 min** a **3500 rpm** a **4°C** sense fre.

Traspassar molt cuidadosament la **fase superior** a un quart falcon, amb molta cura de no emportar-se la fase intermediària o inferior.

Afegir **etanol absolut 2v/v** (mostra per mostra).

Agitar suament per inversió fins que aparegui la medusa d'ADN. (*)

Pescar la medusa, rentar-la per immersió en **etanol al 70%**.

Posar-la en un tub nunc amb tap de rosca i deixar **assecar** fins que no quedi etanol.

Afegir **TE** al DNA (volum segons la mida de la medusa) i deixar-lo unes hores a l'estufa de 37°C en agitació o overnight a RT.

(*) Si no apareix medusa però hi ha petits fragments de DNA dispersos:

- Congelador unes hores – 1 dia
- Centrifugar 3500 rpm 10 min
- Decantar etanol absolut
- Afegir etanol 70%
- Centrifugar 3500 rpm 10 min
- Decantar etanol
- Deixar assecar
- Ressuspendre

4. LECTURA DE CONCENTRACIÓ

Nanodrop.

Intentar que DNA estigui entre 200-400 ng/μL.

Solució de LISIS D'ERITRÒCITS

TRIS 2M (pH 7,5)	5 mL
MgCl ₂ 1M	2,5 mL
MilliQ autoclavada	fins 500 mL

Solució de WCLB (pH 8,2)

NaCl 5M	40 mL
EDTA 0,25M (pH 8,0)	4 mL
TRIS 2M (pH7,5)	2,5 mL
MilliQ autoclavada	fins 500 mL

Solució de Proteïnasa K

Proteïnasa K	100 mg
SDS 10%	5 mL
EDTA 0,25M (pH 8,0)	400 µL
MilliQ autoclavada	fins 50 mL

TE → Solució Tris 10mM/EDTA 0,2mM (pH7,5)

TRIS 2M (pH 7,5)	250 µL
EDTA 0,25M (pH 8,0)	20 µL
MilliQ autoclavada	fins 50 mL

ii. PCR

Gen mutat	x1	5		Programa
10X PCR buffer	2,5	12,5	1	10' a 94 °C
dNTPs (10.0mM)	0,5	2,5	2	1' a 94 °C
Polimerasa EcoTaq	0,1	0,5	3	1' a 62°C
25mM MgCl2 Solution	0,75	3,75	4	1' a 72 °C
DNA (50 ng/µl)	1		5	Go to 2, 34 times
Primer Forward (5 pmol/µl)	0,5	2,5	6	10' a 72 °C
Primer Reverse (5 pmol/µl)	0,5	2,5	7	8 °C for ever
DMSO 5% del V final	2,5	12,5		
H2O destil·lada autoclavada	16,65	83,25	8	END
Volum final	25	24		

iii. PURIFICACIÓ

Purificant productes de PCR amb Exosap :

Barrejar 5ul Producte PCR + 2ul Exosap

Termocic: 15min 37°C

15min 80°C

8°C infinit

iv. SEQÜENCIACIÓ

Programa: *SeqBD 3.1*

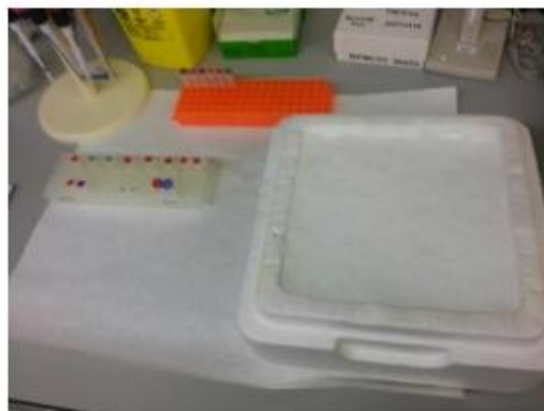
	x1	4
Producte de PCR	2	
Mix seq (big dye, congelador)	0,5	2
Buffer 5X (BD, nevera)	1,75	7
Primer (5 pmols/ μ l)	0,5	2
H ₂ O	5,25	21
Total reacció	10	

1	1' a 96°C
2	10'' a 96°C
3	5'' a 50°C
4	4' a 60°C
5	Go to 2, 24
6	8°C for ever
7	Cop de Centrifuga

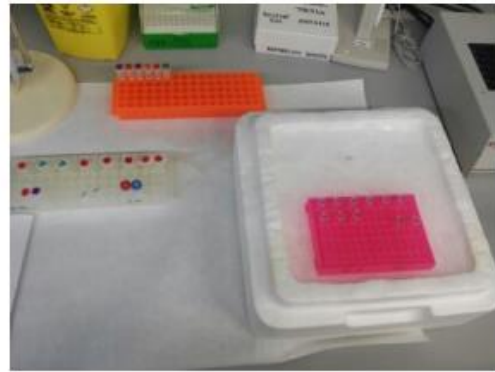
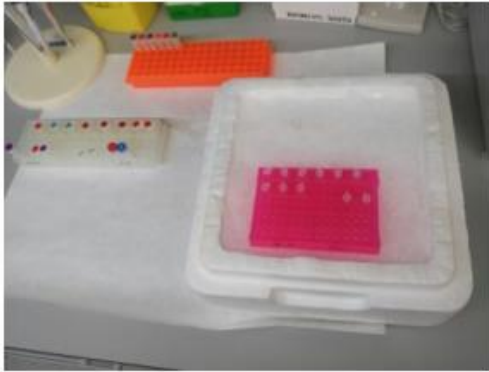
ANNEX II. IMATGES PCR

Aquestes imatges corresponen a una PCR realitzada el 14 / 12 / 2015 per l'equip de recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron focalitzat en les malalties musculars. Malgrat que no es tracta de l'EIEE, el procediment és exactament igual per a les dues, pel que l'únic que variaria seria les mostres d'ADN mutades.

1. En la imatge es pot veure com hi ha tot un recipient ple de gel en l'interior del qual hi ha una mostra de l'enzim polimerasa en un pot transparent, pel que no es pot diferenciar gaire bé en la imatge. A la seva esquerra hi ha diferents recipients amb els components de la PCR.



2. Les mostres dels components de la PCR es reparteixen entre diferents recipients que es col·locaran en el suport rosa de la imatge (que es situa també en el gel per a que no es produeixi una possible futura desnaturalització de les cadenes de l'ADN) i continuació es realitza el marcatge de cada pot per a saber que hi ha dins.



3. Amb tots els recipients ben marcats i anomenats, s'agafen les quantitats necessàries de les mostres dels components de la PCR que es tenen en un inici i amb l'ajut d'una pipeta, es col·loquen als pots que s'han deixat ben marcats.



4. S'agafen totes les mostres que es troben en els recipients marcats en el suport rosa i es deixen una estona al Termociclador.

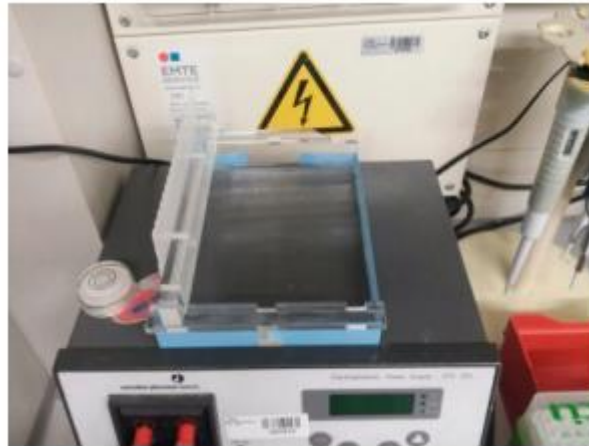


5. Després es barregen en el primer recipient on hi ha l'enzim polimerasa, que s'ha deixat en el gel.

6. Es prepara el gel d'agarosa.



7. Al tenir el gel preparat, es mescla amb la mostra que s'ha preparat i es deixa reposar en pla en un recipient en el qual hi ha unes bandes per a poder veure després la que correspon al pacient, a la mare, al pare i a la de l'aigua (serveix per a comprovar que la mostra ha sortit adequadament).



8. Quan s'hagi endurit, es realitza la posterior purificació, seqüenciació i visualització en forma d'electroferogrames.