

Mestrado em Ciências Forenses

Ciências Laboratoriais Forenses

# Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e expressão do gene RyR2

Ana Beatriz Carneiro Abreu

**M**

2017



Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Forenses, realizada sob a orientação da Professora Doutora Laura Cainé (INMLCF, I.P. e FMUP); do Professor Doutor Agostinho Santos (INMLCF, I.P. e FMUP); e da Mestre Benedita Silva (INMLCF, I.P.).

Trabalho realizado no laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forenses (SGBF) da Delegação Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF), Porto.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Laura Cainé, por ter aceite a orientação da minha dissertação. Obrigado pela oportunidade, pela autonomia que me deu, pelo apoio e pela confiança que em mim depositou.

Ao Professor Doutor Agostinho Santos, pelas sábias palavras na hora certa, pela atenção, pela motivação, pela amabilidade e pelos conhecimentos transmitidos.

À Mestre Benedita Silva, pelo apoio incondicional ao longo de todo o trabalho prático, pela paciência em ensinar a sua “*Little Beatrice*”, pela boa disposição e pelo carinho.

À Mestre Gabriela Lima, pela sua sempre prontidão em ajudar, pelos vários *workshops* privados em manutenção de equipamentos, que em muito me ensinaram, e pela sua simpatia.

À Professora Doutora Marian Pancorbo, pela oportunidade de estagiar no seu laboratório de investigação, pela forma amável como me recebeu, pela forma tão rápida como me integrou e pelos inúmeros conhecimentos transmitidos num tão curto espaço de tempo.

À Doutora Leire Palencia, pela disponibilidade, pela ajuda e pelos contínuos esclarecimentos ao longo de todo o projeto.

À Professora Doutora Margarida Fonseca, pela ajuda na análise estatística do estudo.

Aos meus Pais, aos meus Irmãos e aos meus queridos Sobrinhos, pelo apoio incondicional e pela confiança que sempre depositaram em mim.

Ao Vitor, pelo carinho, pela companhia e pela motivação nos momentos de fraqueza.

A todo o Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação Norte do INMLCF, I.P., pela forma como me receberam e prontificaram a ajudar.

Ao INMLCF I.P., por ter autorizado a realização do meu projeto de dissertação no laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação Norte e por me disponibilizar todos os meios necessários.

Ao grupo de investigação BIOMICs da Universidade do País Basco, pela integração, pelas amizades que ficaram e por todo o conhecimento transmitido.

## RESUMO

A Morte Súbita Cardíaca (MSC) em jovens, entre os 18 e os 40 anos, assintomáticos é um evento que devia, em todos os casos, conduzir a uma autópsia médico-legal para investigar a causa da morte. Contudo, a autópsia médico-legal nos casos de MSC em jovens revela um coração estrutural e histologicamente normal, em cerca de um terço dos casos. Nesses casos, em que o exame toxicológico é negativo e na ausência de ação traumática, a causa de morte permanece inexplicável. Deste modo, a análise genética é recomendada.

Em Portugal, atualmente, a análise genética só excecionalmente é parte integrante de uma investigação médico-legal de MSC em jovens.

Estudos genéticos revelaram que síndromes arrítmicas, onde se inclui a Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC), podem ser responsáveis por 30-50% das mortes, em jovens até aos 40 anos de idade. A TVPC é uma canalopatia hereditária, caracterizada por síncope e morte súbita. O exercício físico ou uma emoção aguda podem desencadear um episódio de TVPC. A TVPC é causada por movimentações intracelulares anormais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) resultante de mutações no gene RyR2. A contribuição da genética nestes casos de Morte Súbita (MS) é importante não só para o diagnóstico da causa da morte, mas também porque permite prevenir outras mortes entre os familiares da vítima em primeiro grau, que tenham a mesma informação genética. Nos casos de MSC em jovens, as análises genéticas devem ser parte integrante da prática da Patologia Forense.

**Palavras-chave:** Morte Súbita Cardíaca; Canalopatias; Distúrbios genéticos cardíacos; *Post-mortem*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><math>\mu M</math></b>	Micromolar
<b>6-FAM</b>	6-carboxi-fluoresceína
<b><math>Ca^{2+}</math></b>	Cálcio
<b>Cq</b>	Curva de amplificação
<b>CVP</b>	Contrações Ventriculares Prematuras
<b>dATP</b>	Deoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina trifosfato
<b>ddATP</b>	Didesoxiadenosina trifosfato
<b>ddCTP</b>	Didesoxicitidina trifosfato
<b>ddGTP</b>	Didesoxiguanosina trifosfato
<b>ddNTPs</b>	Didesoxinucleotídeos
<b>ddTTP</b>	Didesoxitimidina trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleotídeos
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>HRM</b>	<i>High Resolution Melting</i>
<b>INMLCF</b>	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
<b><math>K^+</math></b>	Potássio
<b><math>Mg^{2+}</math></b>	Magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MS</b>	Morte Súbita
<b>MSC</b>	Morte Súbita Cardíaca
<b>MSI</b>	Morte Súbita Inexplicável
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b><math>Na^+</math></b>	Sódio
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>q-PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> em tempo real

<b><i>RS</i></b>	Retículo Sarcoplasmático
<b><i>RyR2</i></b>	Recetor de Rianodina tipo 2
<b><i>SBr</i></b>	Síndrome de Brugada
<b><i>SERCA2a</i></b>	(SR)-Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b><i>SQTC</i></b>	Síndrome de QT Curto
<b><i>SQTL</i></b>	Síndrome de QT Longo
<b><i>Tm</i></b>	Temperaturas de <i>melting</i>
<b><i>TVPC</i></b>	Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica
<b><i>TVPC1</i></b>	Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica do tipo 1
<b><i>TVPC2</i></b>	Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica do tipo 2
<b><i>WES</i></b>	<i>Whole Exome Sequencing</i>

# ÍNDICE

## 1. INTRODUÇÃO

1.1. Morte súbita cardíaca.....	15
1.1.1. Incidência da morte súbita cardíaca.....	16
1.2. Canalopatias cardíacas.....	16
1.3. Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica.....	17
1.3.1. Prevalência da TVPC.....	19
1.3.2. Recetor de rianodina tipo 2.....	19
1.3.3. Diagnóstico <i>post-mortem</i> e gestão do estudo dos familiares de um jovem com MSC.....	21
1.3.4. Prevenção e tratamento em casos de TVPC.....	23

2. OBJETIVOS.....	27
-------------------	----

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Colheita de Amostras Biológicas.....	29
3.2. Desenho dos <i>Primers</i> .....	29
3.3. Extração de DNA.....	32
3.4. Amplificação do DNA.....	33
3.5. Eletroforese capilar automatizada.....	37
3.6. Purificação do produto amplificado.....	38
3.7. Sequenciação do DNA.....	38
3.8. Purificação do produto sequenciado.....	41
3.9. Sequenciação automática de DNA.....	42
3.10. Análise dos resultados.....	43
3.11. Análise estatística.....	43

## 4. RESULTADOS

4.1. Padronização da concentração dos <i>primers</i> forward e reverse para a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 utilizando <i>HotStarTaq</i> <sup>®</sup> <i>Plus Master Mix (Qiagen)</i> .....	45
4.2. Padronização da temperatura de <i>annealing</i> para a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 a partir de DNA de referência.....	47

4.3. Eletroforese capilar automatizada das amostras para comprovar a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2.....	48
4.4. Eletroferogramas das sequências obtidas através da sequenciação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2.....	49
4.5. Análise das sequências obtidas das amostras de DNA através da comparação com a sequências referência dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2.....	51
<b>5.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação das mutações agrupadas no recetor de rianodina do tipo 2 (RyR2) distribuídas em 3 regiões " <i>Hot-Spot</i> " denominadas domínios I (N-terminal), II (central) e III (região de canal).....	20
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática dos 105 exões de codificação do gene RyR2 divididos em três níveis com base no número de mutações contidas em cada exão...	21
<b>Figura 3:</b> Recomendações da Sociedade Europeia de Cardiologia para o diagnóstico da TVPC.....	23
<b>Figura 4:</b> Recomendações da Sociedade Europeia de Cardiologia para a estratificação de risco e tratamento da TVPC.....	25
<b>Figura 5:</b> Programação do termociclador onde se demonstra o tempo, temperatura e número de ciclos de cada uma das fases da q-PCR.....	36
<b>Figura 6:</b> Demonstração esquemática da programação no termociclador com tempo, temperatura e número de ciclos de cada uma das fases da PCR.....	37
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática de um desoxinucleotídeo (dNTP), (à esquerda) e de um didesoxinucleotídeo (ddNTP) (à direita), no qual foi removido o grupo hidroxila na posição 3' terminal.....	39
<b>Figura 8:</b> Demonstração esquemática da programação no termociclador para a sequenciação das amostras.....	41
<b>Figura 9 e 10:</b> Imagem obtida a partir do <i>software QIAxcel ScreenGel</i> com os eletroferogramas, e os marcadores de tamanho (representado a verde), após corrida eletroforética das amostras amplificadas com concentrações de 0,25 e 0,5µM dos <i>primers</i> dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2.....	46
<b>Figura 11:</b> Gráfico obtido durante a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 das amostras do DNA de referência.....	47
<b>Figura 12 e 13:</b> Visualização dos resultados obtidos durante a q-PCR dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 das amostras do DNA de referência.....	47
<b>Figura 14:</b> Imagem obtida após eletroforese no <i>QIAxcel ScreenGel</i> evidenciando os fragmentos amplificados dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 das amostras 18, 19 e 20, e os marcadores de tamanho.....	48

<b>Figura 15:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software Sequencing Analysis</i> <sup>®</sup> v.5.4 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o <i>primer foward</i> do exão 3 do gene RyR2.....	49
<b>Figura 16:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software Sequencing Analysis</i> <sup>®</sup> v.5.4 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o <i>primer foward</i> do exão 93 do gene RyR2.....	49
<b>Figura 17:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software Sequencing Analysis</i> <sup>®</sup> v.5.4 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o <i>primer foward</i> do exão 103 do gene RyR2.....	50
<b>Figura 18:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software Sequencing Analysis</i> <sup>®</sup> v.5.4 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B5, sequenciado com o <i>primer foward</i> do exão 93 do gene RyR2.....	50
<b>Figura 19:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software Sequencing Analysis</i> <sup>®</sup> v.5.4 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B5, sequenciado com o <i>primer reverse</i> do exão 93 do gene RyR2.....	51
<b>Figura 20:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software SeqScape</i> <sup>®</sup> v.3 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o <i>primer foward</i> do exão 3 do gene RyR2.....	52
<b>Figura 21:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software SeqScape</i> <sup>®</sup> v.3 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o <i>primer foward</i> do exão 93 do gene RyR2.....	52
<b>Figura 22:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software SeqScape</i> <sup>®</sup> v.3 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o <i>primer foward</i> do exão 103 do gene RyR2.....	53
<b>Figura 23:</b> Exemplo de um eletroferograma, visualizado no <i>software SeqScape</i> <sup>®</sup> v.3 ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>®</sup> ), dos fragmentos de DNA extraídos da zaragatoa bucal da amostra B5, sequenciados com os <i>primer foward</i> e <i>reverse</i> do exão 93 do gene RyR2.....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Tamanho (em par de bases) dos 16 exões nos quais podem ser detetadas 65% das mutações do gene RyR2.....	30
<b>Tabela 2:</b> <i>Primers foward</i> e <i>reverse</i> selecionados para os fragmentos correspondentes aos exões 3, 93 e 103 do gene <i>RyR2</i> .....	30
<b>Tabela 3:</b> Características dos pares de <i>primers</i> selecionados para as sequências dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com 250 nucleótidos nas zonas flanqueantes 5´ e 3´.....	32
<b>Tabela 4:</b> Configuração da reação de amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 usando a <i>HotStarTaq® Plus Master Mix (Qiagen)</i> .....	33
<b>Tabela 5:</b> Condições da reação de amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com utilização dos <i>primers foward</i> e <i>reverse</i> a uma concentração de 0.25µM em cada reação.....	34
<b>Tabela 6:</b> Condições da reação de amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com utilização dos <i>primers foward</i> e <i>reverse</i> a uma concentração de 0.5µM em cada reação.....	34
<b>Tabela 7:</b> Configuração da reação usando o <i>HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen)</i> .....	35
<b>Tabela 8:</b> Condições da reação de q-PCR dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 usando a <i>EvaGreen® Master Mix (Biotium)</i> .....	36
<b>Tabela 9:</b> Condições da reação de sequenciação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com utilização do <i>BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)</i> num volume final de 10µL.....	40

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Representação gráfica onde se demonstram as percentagens de: MSC com origem em síndromes arrítmicas; relevância da TVPC entre as síndromes arrítmicas; relação da TVPC com o gene RyR2; distribuição das mutações nos exões do gene RyR2. ....	57
--	----

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Morte súbita cardíaca

A Morte Súbita Cardíaca (MSC) pode ser definida como uma morte inesperada, devido a patologia cardíaca, que ocorre dentro de um curto período de tempo a partir do início de quaisquer sintomas relacionados com o coração (Kaufenstein et al., 2013) numa pessoa com ou sem doença cardíaca pré-existente conhecida (Sen-Chowdhry and McKenna, 2006).

Considera-se uma morte natural de causa cardíaca, a que se manifesta pela cessação repentina da atividade cardíaca e consequente deterioração rápida do estado de consciência levando à ausência de atividade respiratória e da circulação sanguínea (Siscovick DS, 2010). Nessas circunstâncias, a investigação forense assume uma importância considerável, com a necessidade de determinar a causa e o diagnóstico diferencial ou etiologia médico-legal da morte (Ackerman, 2009).

As causas de MSC diferem com a idade do paciente (Rodriguez-Calvo et al., 2008) e embora a maioria das vítimas de MSC sejam idosas, muitas crianças e jovens adultos, com idade inferior a 35 anos, morrem todos os anos devido a diversas patologias cardíacas (Farrugia et al., 2015). A doença arterial coronária é a condição patológica, subjacente à MSC, mais comum (~40-60%), mais particularmente em doentes com idade igual ou superior a 50 anos (Chanavat et al., 2016), seguindo-se a doença cardíaca isquémica e as doenças miocárdicas primárias: cardiomiopatia hipertrófica, cardiomiopatia dilatada e displasia arritmogénica do ventrículo direito. Já nos jovens, entre 1 e 39 anos de idade, vários estudos têm relatado que um exame *post-mortem* completo pode não revelar uma causa de morte em cerca de 30% dos casos (Tester and Ackerman, 2012). Esses casos são geralmente designados como casos de Morte Súbita Inexplicável (MSI).

A MSI corresponde a uma causa de morte que permanece desconhecida depois de uma autópsia médico-legal completa incluindo a realização de exames complementares de diagnóstico (toxicológicos e histológicos), a avaliação da história clínica e a investigação das circunstâncias da morte. Para esses casos inexplicados, uma contribuição diagnóstica importante pode ser fornecida pela análise genética, que deve ser aplicada durante a investigação sobre a origem da morte (Campuzano et al., 2014),(Oliva et al., 2017).

Durante a última década, foram feitos avanços significativos na compreensão da base clínica e genética da MSC e presume-se, que muitas das causas de MS, especialmente em jovens, são devidas a distúrbios genéticos com repercussão a nível cardíaco (Rodriguez-

Calvo et al., 2008). Estima-se que 10-35% das MSI possam ser explicadas por canalopatias cardíacas (Wang et al., 2014), patologias que correspondem a alterações genéticas, as quais predispõem ao aparecimento de arritmias ventriculares em corações estruturalmente normais.

### **1.1.1. Incidência da morte súbita cardíaca**

A MSC representa um problema cada vez mais atual que gera uma preocupação crescente na população em geral.

Nos países desenvolvidos, a MSC é considerada uma das causas mais comuns de morte, representando um importante problema de saúde pública (Basso et al., 2008),(Doolan et al., 2008).

Em Portugal, a MSC corresponde a 20% de todas as mortes, com uma incidência de cerca de 1/1000 habitantes/ano (Gomes, 2014). Contudo, a incidência da MSC, especificamente nos jovens, varia dependendo da população estudada e das metodologias usadas nesses estudos (Semsarian et al., 2015). Além disso, a verdadeira incidência da MSC é suscetível de estar subestimada (Semsarian et al., 2015), uma vez que os distúrbios arritmogénicos primários podem predispor a mortes em contexto aparentemente acidental. Nessas circunstâncias, a causa da morte pode ser erradamente atribuída ao acidente, por exemplo, as mortes de jovens atribuídas a eventos como afogamento e acidentes com veículos motorizados, podem ter sido diretamente precipitadas por uma arritmia ventricular (Semsarian et al., 2015).

## **1.2. Canalopatias cardíacas**

As canalopatias cardíacas podem ser patologias hereditárias causadas por mutações em genes que codificam para os canais iónicos transmembranares e para os seus recetores, ou podem ainda ser adquiridas como resultado da exposição a fármacos, imunoglobulinas ou toxinas que modificam a função do canal iónico (Abriel and Zaklyazminkaya, 2013).

A maioria das mutações conduzem a disfunções dos canais iónicos que regem o fluxo de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) ou de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nas membranas dos cardiomiócitos. Como os iões são moléculas carregadas, esses fluxos iónicos produzem correntes elétricas e desempenham um papel importante na determinação de diferenças de potencial eléctrico transmembranar (Abriel and Zaklyazminkaya, 2013). A atividade eléctrica de uma célula

cardíaca é caracterizada pelo potencial de ação cardíaco gerado pela atividade dos canais iônicos (Abriel and Zaklyazminskaya, 2013) e depende largamente da função destes. A perturbação no fluxo de iões altera a atividade elétrica no coração e é o substrato para o desencadeamento de arritmias ventriculares que podem causar síncope e aumento do risco de MSC (Stattin et al., 2016) com um coração estruturalmente normal e sem que se observem, na microscopia, alterações morfológicas do tecido cardíaco. A síncope é o sintoma mais comum nos distúrbios de canais iônicos do coração, embora a paragem cardíaca possa ser a primeira manifestação clínica em indivíduos assintomáticos (Stattin et al., 2016).

As alterações genéticas associadas às canalopatias cardíacas são complexas. A maioria das síndromes associadas a estes distúrbios arrítmicos pode ser causada por mutações em genes diferentes, ou por várias mutações num único gene (Abriel and Zaklyazminskaya, 2013). Ambas as situações podem estar na origem de diferentes fenótipos. Os principais fenótipos observados nos pacientes portadores dessas mutações são: a Síndrome de QT Longo (SQTL), a Síndrome de QT Curto (SQTC), a Síndrome de Brugada (SBr) e a Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC) (Abriel and Zaklyazminskaya, 2013). Estudos realizados demonstraram que estas síndromes podem ser detetadas através do estudo de mutações nos genes KCNQ1 (SQTL do tipo 1), KCNH2 (SQTL do tipo 2 e SQTC), SCN5A (SBr do tipo 1 e SQTL do tipo 3) e RyR2 (TVPC do tipo 1), os quais, já se sabe que mais frequentemente estão associados a estas patologias.

Considerando que as análises clínicas e *post-mortem* sugerem que aproximadamente um terço dos casos de MSI, após o primeiro ano de vida, pode ser o resultado de uma canalopatia hereditária, a triagem genética *post-mortem* assume um papel muito importante no esclarecimento da causa de morte e deve ser sempre realizada nos casos de MSI (Ackerman, 2009),(Ingles and Semsarian, 2007).

### **1.3. Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica**

A TVPC é uma arritmia hereditária rara (Yu et al., 2016) potencialmente letal que se manifesta frequentemente como arritmias ventriculares, caracterizada por síncope e paragem cardíaca e que ocorre, habitualmente, durante o exercício ou em situações de *stress* emocional intenso. É de salientar que o próprio exercício não aumenta o risco de

MSC, mas as adaptações cardíacas induzidas pela atividade atlética podem ser inaceitáveis para corações com doença subjacente (Grani et al., 2016), (Chappex et al., 2015), (Sarquella-Brugada et al., 2013). Isso enfatiza o papel da atividade física como um gatilho para arritmia cardíaca em pessoas com doença cardíaca desconhecida (Oliva et al., 2017), (Germann and Perron, 2005).

Clinicamente, a TVPC é causada por instabilidade cardíaca elétrica exacerbada pela ativação aguda do sistema nervoso adrenérgico (D'Ovidio et al., 2017), o que pode conduzir a contrações ventriculares prematuras e taquiarritmias ventriculares bidirecionais (Kawata et al., 2016), e conseqüentemente, à MSC na ausência de alterações cardíacas estruturais.

Em termos fisiopatológicos, a TVPC resulta de alterações intracelulares ao nível do canal de libertação do cálcio ( $Ca^{2+}$ ) provocando sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , o que altera o balanço de correntes iônicas, que geram o potencial de ação cardíaca e que controlam o acoplamento excitação-contração nos cardiomiócitos, favorecendo o aparecimento de arritmias fatais (Imberti et al., 2016).

A primeira manifestação desta síndrome arritmica ocorre geralmente na infância ou no início da juventude, com idades compreendidas entre os 7 e 12 anos, embora existam casos relatados com início na idade adulta (Pflaumer and Davis, 2012). Aproximadamente 30% dos indivíduos afetados apresentam sintomas antes dos 10 anos, sendo que a maioria (60%-80%) apresenta um ou mais episódios de arritmia sintomática, antes dos 40 anos (Leenhardt et al., 1995), (Priori et al., 2002), (Sumitomo et al., 2003), (Postma et al., 2005). Cerca de 30% dos pacientes têm antecedentes familiares de tais eventos (Leren et al., 2010) (Elger et al., 2010).

Quando não tratada, a evolução clínica da TVPC é grave (Imberti et al., 2016). Estima-se que, na TVPC, a morte parece ser a primeira manifestação clínica em 30% dos casos (Stattin et al., 2016).

Várias mutações genéticas têm sido relacionadas com a TVPC, incluindo as que ocorrem nos genes RYR2, CASQ2, KCNJ2, TRDN, CALM1 e CALM2 (Ohno et al., 2015). Contudo, a forma mais frequente (cerca de 60% dos casos) (Ackerman et al., 2011) está relacionada com mutações autossômicas dominantes no gene RyR2 (localizado no braço longo do cromossoma 1 na posição 43) que codifica para o recetor de rianodina do tipo 2 (Priori et al., 2002) e que é classificada como TVPC de tipo 1 (TVPC1). As mutações na calsequestrina codificada por CASQ2 são responsáveis por uma forma muito

rara, autossômica recessiva, conhecida como TVPC de tipo 2 (TVPC2) (Swan et al., 1999),(Postma et al., 2002).

### 1.3.1. Prevalência da TVPC

A TVPC é uma das canalopatias cardíacas mais malignas expressas predominantemente nos jovens e foi reconhecida como uma causa significativa de MSC em crianças e adultos jovens (Kawata et al., 2016).

A taxa de eventos arrítmicos em pacientes não tratados foi estimada em 58% (van der Werf et al., 2012b), sendo que, as taxas de mortalidade de TVPC não tratadas são de 30-50% aos 40 anos (Priori et al., 2002).

A TVPC é considerada uma patologia rara, com uma estimativa de prevalência de 1: 10 000 (Haugaa et al., 2010) (Pflaumer and Davis, 2012). Contudo, devemos estar conscientes de que verdadeira prevalência na população geral é desconhecida (Imberti et al., 2016). Dada a dificuldade no seu diagnóstico e a alta letalidade, juntamente com a complexidade para fazer um diagnóstico *post-mortem*, pode facilmente subestimar-se a prevalência desta doença (Pflaumer, 2017).

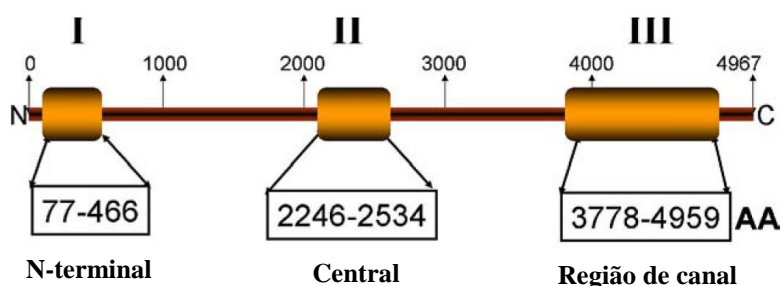
### 1.3.2. Recetor de rianodina tipo 2

O recetor de rianodina tipo 2 (RyR2), codificado pelo gene RyR2 que contém 105 exões, é uma das maiores e mais complexas proteínas de canal iónico, compreendendo 4967 aminoácidos (Medeiros-Domingo et al., 2009). Localiza-se no retículo sarcoplasmático (RS) das células do músculo cardíaco e desempenha um papel essencial no acoplamento excitação-contração nos cardiomiócitos (George CH, 2006), uma vez que regula a duração e a amplitude do fluxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a partir do retículo RS (Galati et al., 2016), por despolarização da membrana celular, conduzindo à contração cardíaca.

Em condições fisiológicas, o RyR2 abre brevemente e medeia uma liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS iniciando-se a contração do cardiomiócito (isto é, a fase sistólica do ciclo cardíaco) (Bers, 2002). Após a conclusão da sístole, os iões de  $\text{Ca}^{2+}$  são ativamente transferidos para a RS pela (SR)- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) para permitir o relaxamento do músculo cardíaco (ou seja, a fase diastólica), completando-se o ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fabiato, 1983). No entanto, mutações de RyR2 causam libertação espontânea de iões  $\text{Ca}^{2+}$  do RS na diástole, particularmente durante uma ativação adrenérgica intensa (Imberti et al., 2016), como ocorre em situações de atividade física ou emoções intensas. A saída anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, devido a disfunções no RyR2, altera a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos e gera

pós-despolarizações tardias causando TVPC (George et al., 2006), o que acaba por conduzir a arritmias letais. Grande parte das mutações de RyR2, identificadas na TVPC, são, na sua maioria, mutações de *Missense* onde substituições de um único par de bases conduzem à substituição de aminoácidos (Rodríguez-Calvo et al., 2008) e resultam num aumento de função (Roston et al., 2017a).

Um estudo realizado por Tester *et al.* em 2004 sugeriu que as mutações em RyR2 podem contribuir para, pelo menos, um em cada sete casos de MSI (Tester et al., 2004). Deste modo, a análise da expressão e de alterações no gene RyR2 deve ser realizada em estudos *post-mortem* em todos os casos em que se pretenda determinar se a TVPC foi a causa de MSI em indivíduos assintomáticos. Esta análise genética deve ser também realizada quando se pretenda diagnosticar a TVPC em familiares de indivíduos vítimas de MSC. Contudo, o diagnóstico genético de mutações no gene RyR2 é complexo devido ao grande tamanho do gene (105 exões traduzidos e ~16,5kb mRNA, codificando 4967 aminoácidos) (Abriel and Zaklyazminskaya, 2013). Todavia, o estudo realizado por Medeiros-Domingo *et al.* das 128 mutações descritas associadas à TVPC1, demonstrou que apenas 45 dos 105 exões traduzidos do gene RyR2 apresentam mutações associadas à TVPC estando essas mutações agrupadas em três “*Hot-Spot*” denominados domínios I, II e III (Figura 1). Este fenómeno de agrupamento de mutações poderá resultar numa abordagem mais económica para o teste genético para diagnóstico da TVPC (Medeiros-Domingo et al., 2009).



**Figura 1:** Representação das mutações agrupadas no recetor de rianodina do tipo 2 (RyR2) distribuídas em 3 regiões “*Hot-Spot*” denominadas domínios I (N-terminal), II (central) e III (região de canal). **Adaptado de:** The RYR2-Encoded Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel in Patients Diagnosed Previously With Either Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia or Genotype Negative, Exercise-Induced Long QT Syndrome, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 54, No. 22, 2009

AA-Número estimado de aminoácidos para cada domínio.

Além disso, este estudo conclui que cerca de 65% das mutações no gene RyR2 podem ser detetadas pelo rastreio de 16 exões (Medeiros-Domingo et al., 2009) - 3, 8, 14, 45, 46,



Estabelecer um diagnóstico correto *post-mortem*, numa vítima de MSC, pode revelar-se fundamental para os familiares da vítima. Com base nesse diagnóstico, poderá ser possível evitar outras mortes, em familiares próximos, prevenindo futuros eventos cardíacos fatais através de aconselhamento genético e de cardiologia especializados, do ajuste do estilo de vida ou iniciando tratamento farmacológico, se disponível (Michaud et al., 2011), para tratar doenças cardíacas que até aí eram totalmente desconhecidas.

Mais de 95% dos distúrbios genéticos cardíacos na população em geral são herdados de forma autossômica dominante, de tal forma que os familiares de primeiro grau têm 50% de probabilidade de herdar a mesma mutação de um gene (Cerrone and Priori, 2011),(Wilde and Behr, 2013). Deste modo, um diagnóstico *post-mortem* preciso da doença cardíaca subjacente com base em técnicas avançadas de Genética Molecular é essencial.

Considerando que cerca de 15% dos indivíduos com MSI apresentam TVPC (Tester et al., 2012) relacionada com mutações no gene RyR2, identificar um familiar potencialmente vulnerável a esta síndrome, o mais cedo possível, é uma contribuição terapêutica indireta viável a partir da realização dos testes genéticos (Schwartz et al., 2013).

A gestão do estudo familiar de um jovem com MSC é complexa e deve ser idealmente adaptada a uma abordagem multidisciplinar especializada (Semsarian et al., 2015), que deve englobar a medicina geral e familiar, a cardiologia e a genética.

Devido à natureza dinâmica das arritmias associadas à TVPC, o eletrocardiograma (ECG) de esforço é a ferramenta de diagnóstico mais útil para o estudo de pacientes, pois oferece a possibilidade de reproduzir as condições que favorecem a taquiarritmia ventricular. Durante o teste de esforço, a suspeita de TVPC é geralmente formulada com o aparecimento de alguns sinais eletrocardiográficos que podem incluir contrações ventriculares prematuras isoladas (CVP), CVP bigeminadas, CVP em pares, taquicardia ventricular (três ou mais CVPs consecutivas) e taquicardia ventricular bidirecional ou polimórfica (Hayashi et al., 2012),(Tan and Scheinman, 2008). Quanto ao ECG de 12 derivações em repouso, este é frequentemente normal, apesar de uma bradicardia sinusal relativa ou ondas U proeminentes poderem estar presentes, sendo, contudo, estes achados não específicos (Ylanen et al., 2010). Este estudo deve ainda ser complementado por um registo Holter de 24 horas, que é especialmente valioso em crianças (Imberti et al., 2016) e permite a identificação dos achados típicos do ECG durante o exercício ou o *stress* emocional.

Apesar da importância que estas ferramentas possuem no diagnóstico dos familiares de vítimas de MSC, um estudo realizado por Hayashi *et al.* em 2009 constatou que os episódios cardíacos também ocorrem em indivíduos que possuem mutação genética e com prova de esforço normal (Hayashi *et al.*, 2009). Estes factos realçam a importância do rastreio familiar, incluindo o teste genético, mesmo após uma prova de esforço negativa.

Deste modo, o estudo genético de familiares é particularmente importante porque, se não for tratada, a TVPC é uma patologia com mau prognóstico, mas este pode melhorar significativamente quando a doença é corretamente identificada e a terapia é de imediato implementada (Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008).

Em 2015, a Sociedade Europeia de Cardiologia publicou um artigo com recomendações para a abordagem de doentes com arritmias ventriculares e para a prevenção de MSC onde inclui recomendações para o diagnóstico da TVPC (Figura 3).

Diagnóstico de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC)		
Recomendações	Classe <sup>a</sup>	Nível <sup>b</sup>
A TVPC é diagnosticada na presença de um coração estruturalmente normal, de um ECG normal e de TV polimórfica ou bidireccional induzida pelo esforço ou emoção.	I	C
A TVPC é diagnosticada em doentes portadores de mutação(ões) patogénica(s) dos genes RyR2 ou CASQ2.	I	C

ECG = eletrocardiograma; TV = taquicardia ventricular;  
 TVPC = taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica.  
<sup>a</sup>Classe de recomendação. <sup>b</sup>Nível de evidência.

**Figura 3:** Recomendações da Sociedade Europeia de Cardiologia para o diagnóstico da TVPC. O nível de evidência e a classe da recomendação de opções de gerenciamento específicas foram tidas em conta e classificados de acordo com escalas predefinidas, pelos especialistas de Sociedade Europeia de Cardiologia, conforme descrito no Anexo 1. **Adaptado de:** Recomendações da ESC para a abordagem de Doentes com Arritmias Ventriculares e Prevenção de Morte Súbita Cardíaca, European Heart Journal, 2015

#### 1.3.4. Prevenção e tratamento em casos de TVPC

Dado que, tanto o *stress* físico como o emocional podem desencadear a TVPC, mudanças do estilo de vida, que podem passar por limitar ou evitar o desporto competitivo, o exercício extenuante e a exposição a ambientes stressantes podem revelar-se fundamentais (Hammond-Haley *et al.*, 2016). Os limites para a atividade física permitida podem ser definidos com base no resultado do ECG de esforço, realizados em ambiente hospitalar. O uso de dispositivos de monitorização da frequência cardíaca,

durante a atividade física, podem ser úteis para manter a frequência cardíaca dentro de um intervalo seguro (Imberti et al., 2016).

A abordagem terapêutica em pacientes com TVPC, pode passar ainda por medidas farmacológicas, pela intervenção na inervação do ventrículo esquerdo e pelo uso de desfibriladores implantáveis. A terapia farmacológica mais eficaz nos indivíduos sintomáticos são os fármacos antiarrítmicos, os beta-bloqueadores. Além disso, a intervenção na inervação do ventrículo esquerdo, pode ser equacionada como forma de tratamento nos indivíduos que são resistentes ao tratamento farmacológico (Priori et al., 2013c). A colocação de um desfibrilador implantável também deve ser considerada em pacientes com TVPC que não respondem a beta-bloqueadores nem à flecaínida (Priori et al., 2013a). No entanto, para certos autores esta deve ser considerada como a última opção terapêutica, tendo como principal indicação os indivíduos com maior risco de manifestarem TVPC (Mohamed et al., 2006),(Pizzale et al., 2008).

Além do diagnóstico da TVPC, a Sociedade Europeia de Cardiologia publicou ainda, no artigo com recomendações para a abordagem de doentes com arritmias ventriculares e para a prevenção de MSC, as recomendações para a estratificação de risco e tratamento da TVPC (Figura 4).

<b>Estratificação de risco e tratamento da Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica</b>		
<b>Recomendações</b>	<b>Classe<sup>a</sup></b>	<b>Nível<sup>b</sup></b>
São recomendadas as seguintes alterações do estilo de vida em todos os doentes com diagnóstico de TVPC: evicção de desportos competitivos, exercício físico vigoroso e ambientes com stress.	<b>I</b>	<b>C</b>
São recomendados os betabloqueantes em todos os doentes com um diagnóstico clínico de TVPC, baseado na documentação da presença de AVs espontâneas ou induzidas por stress.	<b>I</b>	<b>C</b>
É recomendada a implantação de um CDI, para além dos betabloqueantes com ou sem flecaínida, em doentes com um diagnóstico de TVPC que apresentem paragem cardíaca, síncope recorrente ou TV polimórfica/bidireccional apesar da terapêutica otimizada.	<b>I</b>	<b>C</b>
Deve ser considerada a terapêutica com betabloqueantes para os membros da família geneticamente positivos, mesmo após uma prova de esforço negativa.	<b>IIa</b>	<b>C</b>
Deve ser considerada a flecaínida além dos betabloqueantes nos doentes com diagnóstico de TVPC que tiveram síncope recorrente ou TV polimórfica/bidireccional enquanto medicados com betabloqueantes, quando há risco/contraindicações para um CDI, ou quando o CDI não está disponível ou é recusado pelo doente.	<b>IIa</b>	<b>C</b>
Deve ser considerada a flecaínida além dos betabloqueantes nos doentes com diagnóstico de TVPC e portadores de um CDI para reduzir os choques apropriados pelo CDI.	<b>IIa</b>	<b>C</b>

Pode ser considerada a desnervação simpática cardíaca esquerda em doentes com diagnóstico de TVPC que tiveram síncope recorrente ou TV polimórfica/bidireccional/diversos choques apropriados por CDI enquanto medicados com betabloqueantes ou com betabloqueantes mais flecaínida ou em doentes intolerantes ou com contra-indicações aos betabloqueantes.	IIb	C
Não é recomendado o EEF com EVP na estratificação de risco da morte súbita cardíaca.	III	C

AV = arritmia ventricular; CDI = cardioversor desfibrilhador implantável; EEF = estudo eletrofisiológico; EVP = estimulação ventricular programada; MSC = morte súbita cardíaca; TV = taquicardia ventricular; TVPC = taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. <sup>a</sup>Classe de recomendação. <sup>b</sup>Nível de evidência.

**Figura 4:** Recomendações da Sociedade Europeia de Cardiologia para a estratificação de risco e tratamento da TVPC. O nível de evidência e a classe da recomendação de opções de gerenciamento específicas foram tidas em conta e classificados de acordo com escalas predefinidas, pelos especialistas de Sociedade Europeia de Cardiologia, conforme descrito no Anexo 1. **Adaptado de:** Recomendações da ESC para a abordagem de Doentes com Arritmias Ventriculares e Prevenção de Morte Súbita Cardíaca, European Heart Journal, 2015

## **2. OBJETIVOS**

Esta investigação incidiu no estudo de possíveis variações genéticas no gene RyR2 numa população de 50 indivíduos saudáveis, com idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos, residentes no Norte de Portugal e praticantes regulares de atividades desportivas.

Posto isto, os principais objetivos foram:

- padronizar um protocolo experimental para a análise de possíveis variações genéticas no gene RyR2;
- estudar o gene RyR2 como potencial marcador da presença de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, ou seja, analisar as sequências obtidas, em *software* apropriado, por comparação com as sequências referência, a fim de se detetar possíveis variações genéticas;
- comparar os resultados obtidos, para uma população do Norte de Portugal, com outros estudos relacionados com o gene RyR2, efetuados noutras populações.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. Colheita de Amostras Biológicas

A população estudada inclui 50 indivíduos saudáveis (do género masculino e feminino) e com idades compreendidas entre os 18 e os 40. Estes voluntários são residentes no Norte de Portugal e praticantes regulares de atividades desportivas.

Antes da realização da colheita de amostras foi entregue um documento com todas a informações (Anexo 2), acerca do estudo que se pretendia realizar, ou seja, os seus objetivos, métodos e benefícios previstos, e facultada uma explicação a todos os participantes. Posteriormente, foi assinado pelos voluntários um documento onde expressaram o seu consentimento informado, esclarecido e livre para a participação neste estudo genético (Anexo 3).

A colheita das amostras biológicas foi realizada através de um método indolor e não invasivo, que consiste na utilização de uma zaragatoa *Whatman*<sup>TM</sup> (*Sigma-Aldrich*) para recolher algumas células da mucosa bucal. Após a colheita, as amostras foram devidamente identificadas, secas à temperatura ambiente e posteriormente armazenadas num local limpo e seco.

### 3.2. Desenho dos *Primers*

Antes do início da execução do protocolo experimental foi decidido que apenas se iriam estudar 3 dos 105 exões do gene RyR2.

Como referido anteriormente, estudos diversos apontam para que cerca de 65% das mutações no gene RyR2 podem ser detetadas pelo rastreio de 16 exões, os exões: 3, 8, 14, 45, 46, 47, 49, 88, 89, 90, 93, 96, 97, 100, 101 e 103 e por essa razão selecionamos três destes exões. Além disso, na escolha dos exões para o estudo, teve-se em atenção o tamanho dos exões (Tabela 1), para que estes não fossem demasiado pequenos de modo a facilitar o desenho dos *primers*, nem muito grandes, para facilitar a posterior análise e interpretação. Deste modo, optou-se pela escolha do exão 3, localizado no domínio I (N-terminal e dos exões 93, e 103 que se localizam no domínio III (região de canal) que é o mais representativo.

**Tabela 1:** Tamanho (em par de bases) dos 16 exões nos quais podem ser detetadas 65% das mutações do gene RyR2.

Exão	Tamanho*	Exão	Tamanho*	Exão	Tamanho*	Exão	Tamanho*
3	105	46	106	89	82	97	134
8	113	47	121	90	1298	100	135
14	122	49	170	93	87	101	157
45	136	88	105	96	43	103	101

\*o tamanho é expresso em pb (par de bases)

Selecionados os exões, procedemos ao desenho dos respetivos *primers foward* e *reverse*. O processo teve início com a procura da sequência nucleotídica dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 através do *browser Ensembl genome* (<http://www.ensembl.org/index.htm>). De seguida, foram exportadas as sequências dos três exões garantindo que cada uma possuía 250 nucleótidos nas zonas flanqueantes 5' e 3' (Tabela 2), uma vez que será nessas zonas intrónicas que se deverá selecionar os *primers* de forma a que mesmo com a perda das extremidades durante a sequenciação (comum devido à falha de leitura de algumas bases), seja possível analisar o exão por completo.

**Tabela 2:** *Primers foward* e *reverse* (representado a amarelo) selecionados para os fragmentos correspondentes aos exões 3, 93 e 103 (possível de visualizar a cinzento) do gene RyR2.**Exão 3**

TCCGCCACCTCGGCCTCCAGAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCCGGCC  
 ACTATCTCTGGTTTTTTTAAAATGTATTAACATGAGGAGTAATGACAGTGTTCCTTGATGA  
 CTGGGGAACCTTGCAGTAGAAAGTTGACAAATACTGTTTCTATGAAAGAACTGGAGCCTC  
 CTAAGGTAAGCTGGGTCTGGATGCTTGATGAAGATGATGCTGCTGACTGCTCTTCCTCTTT  
 CTGTGCAGAAATGTGCCCCCAGACCTCTCCATCTGCACCTTTGTGCTGGAGCAGTCCCTCTC  
 TGTCCGGGCGCTGCAGGAGATGCTGGCTAACACCGTGGAGAAATCAGAAGGGGCAAGTA  
 CCCAATTTATGTAGACTTGTAGTATTTTAATGAGCTCAGCTACTATAGGAACAATTTCTTT  
 CACAGGTGTCAGAGATTTCTTTTTGCTAAAATAAGTCCATGCCTTTTCAGTTGGAATGTCC  
 TTAGGTTTGACTTTCTGCTTTATCTAGCATATTTGTGGTGTCTTGAAAATAAAAAAATAT  
 ATCCAAGCTTGATGTGATCTGTGCTACTAGGCCTCGTGCTTATGTCTGTTGTTAAAACC

**Exão 93**

TCTTCTAGCATTAAACATTCTCTGAAATTATGTTTTCACTGCGGGTATGCTTTTTTATTC  
 TTTGTCTCCTCCATGGTGGCAGAAATGTTCTCCCTCACTTTTAGGTCTGCAGCACCAAGAA  
 TGGTGCTTGAAACAGTAGGCTTGCATCAATTGTTTGGGGTAAATGAATGAATGCTTTATT  
 TAAATTGACTGCAGGTTTC AAGCCTGTTGATTCAGTGACTTTTCATAATGTTTTTCACCCCT  
 CAGAACTATTTTGCTCGCAACTTTTACAACATGAGAATGTTAGCCTTATTTGTCGCATTTG  
 CTATCAATTTTCATCTTGCTCTTTTATAAGGTACGTACATCTCACTGTTTTAATTACTGGTAT  
 AAAACTCCAAATAGAAATGAATGTAAAGATTTACGATGAACGTATCTACTA CTGCTAGT  
 GAACATGTCTAAACC TATTATGAAATACTGGTGCCTAGGCCTGATATCACTGTTATCTAG

**Continuação Tabela 2**

GAAGGCAAGATAGATTTGTTCCCTGAGAAGTGAGAAATGCCTCAACTGAAGGGCATTGAT  
TTAGCAGAGGGCTTCCCCACAGTATCCCAGCCTAA

**Exão 103**

TCATCATCATCTTGTTCCTGTCTGCGTCTGCTACTTCTTGCTGCTGGTACCTGTGTCATTT  
AAGCCAACACCAAGATATAGTTACAGCGACAGTTCCATTTATATTCGTGGGCTTGGCACA  
GCCTCCATGTGATGATCTTTGACGTGTATTGAGTGAACCAAATAATAGCTGCCCTACATG  
GCGAGTTGTGTTTTCTTTTGTGTTTTCTGAACTCTGACGTTAATATTTCCCTTTGTTTT  
CTAGACCAAATGCTTCATCTGTGGGATAGGCAATGATTACTTCGACACAGTGCCACATGG  
CTTTGAAACCCACACTTTACAGGAGCACAACCTGGCTAATTACTTGTGAGTGTGC CCGTTT  
CAGAATCTTCCACCCTCTCCAGTAGACGCCACTGGTCCCTGCCATCTCAGAATAGAGAGG  
AAGTTTTTGTGTTTATGTTTAAAAAATAATTGCTGCAGATACTTTAAAAGAAAGTCCAACAG  
CTAATGGCTCTCTTTTCTGAGTAGGTTGACTTAAGAGGTTAAGTTGCAGCTCTTCAT  
GTAAGTGATGCTTTCTAGAACCTTGAAATGAAGAGGTGGACAGGGAGGAGCA

Para a seleção de cada par de *primers* recorreremos ao programa *PerlPrimer*. Essa seleção obedeceu a uma série de critérios (Tabela 3) descritos a seguir pela ordem de importância.

Em primeiro lugar, e além da complementaridade com a sequência alvo, a sequência de bases dos primers *forward* e *reverse* não devem ter dímeros extensíveis (Ext dímer dG = 0), ou seja, não deve haver complementaridade entre os *primers*, uma vez que isso pode diminuir a capacidade de detecção da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e aumentar os riscos de aparecimento de resultados falsos negativos.

Em segundo lugar, a energia do *Full dimer* dG (Kcal/mol) deve ser a mais positiva possível (>-3), pois se os *primers* apresentam valores muito negativos de dG, a quantidade de energia necessária para romper o dímero é maior, ou seja, seriam necessárias temperaturas mais altas, o que pode perturbar a reação PCR.

Por último, o par de *primers* deve possuir temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) semelhantes, ou seja, os respectivos pontos de fusão médios devem ser próximos de modo a facilitar o *annealing* e possibilitar a continuidade dos ciclos.

A confirmação da especificidade dos *primers* foi realizada por meio de consulta na base de dados Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Este passo é importante porque os *primers* podem ser semelhantes a duas ou mais regiões do genoma, e, ao contrário do esperado, poderão ser amplificadas outras regiões para além das de interesse para o estudo. Além disso, colocaram-se as sequências dos *primers forward* e *reverse* dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 na base de dados NIST (National

Institute of Standards and Technology) (<https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>) de modo a verificar-se, através dos resultados do *Auto Dimer*, que os *primers* dos exões não formavam dímeros entre si.

**Tabela 3:** Características dos pares de *primers* selecionados para as sequências dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com 250 nucleótidos nas zonas flanqueantes 5' e 3'.

		Posição	Tamanho (pb)	Tm* (°C)
<b>Exão 3</b>				
<i>Forward primer</i>	ATGAAGATGATGCTGCTGAC	208	20	58.51
<i>Reverse primer</i>	CACCTGTGAAAGAAATTGTTCC	430	22	58.51
<i>Extension dG</i>	0			
<i>Full dimer dG</i>	-1,94			
<b>Exão 93</b>				
<i>Forward primer</i>	AAGCCTGTTGATTTCAGTGAC	204	20	58.57
<i>Reverse primer</i>	GGTTTAGACATGTTCACTAGCAG	444	23	59.57
<i>Extension dG</i>	0			
<i>Full dimer dG</i>	-3,68			
<b>Exão 103</b>				
<i>Forward primer</i>	TGAACCAAATAATAGCTGCCC	155	21	58.83
<i>Reverse primer</i>	GGTGGAAGATTCTGAAACGG	381	20	59.02
<i>Extension dG</i>	0			
<i>Full dimer dG</i>	-2,17			

\*Temperatura de *melting*

### 3.3. Extração de DNA

A extração de DNA a partir de zaragoas bucais foi efetuada numa câmara com uma fonte de raios U.V. (*Aura PCR, EuroClone*<sup>®</sup>) com recurso ao *Kit Prep-n-Go*<sup>TM</sup> *Buffer* (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>).

Em cada zaragatoa bucal foi cortada a sua extremidade e colocada num tubo de 1,5 mL, devidamente identificado. A cada tubo com amostra foram adicionados 200 µL de água DNase-free (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) e 200µL de *Prep-n-Go*<sup>TM</sup> *Buffer* (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>), realizando-se também o controlo negativo da extração. Posteriormente incubaram-se os tubos num termobloco a 90°C durante 20 minutos.

Por fim, armazenaram-se as amostras extraídas a uma temperatura de -20°C.

### 3.4. Amplificação do DNA

No processo de reação em cadeia da polimerase, dos exões 9, 93 e 103 do gene RyR2, as amostras foram amplificadas utilizando o termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*®), e com recurso ao *Kit HotStarTaq® Plus Master Mix* (*Qiagen*).

As condições da reação de amplificação utilizando a *HotStarTaq® Plus Master Mix* (*Qiagen*) preconizadas no protocolo fornecido pelo fabricante estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Configuração da reação de amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene *RyR2* usando a *HotStarTaq® Plus Master Mix* (*Qiagen*).

Componente	Volume/reação	Concentração final
<b>HotStarTaq Plus Master Mix, 2x</b>	10 µl	1 unidade de HotStarTaq Plus DNA Polymerase 1x PCR Buffer* 200 µM de cada dNTP
<b>Primers:</b>		
<b>Foward</b>	Variável	0.1-0.5 µM
<b>Reverse</b>	Variável	0.1-0.5 µM
<b>H<sub>2</sub>O DNase-free</b>	Variável	-
<b>Amostra</b>	Variável	<200 ng/reação
<b>Volume total da reação</b>	<b>20 µl</b>	

\* Contêm 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

A fim de se determinar um protocolo otimizado para a amplificação dos três exões, utilizando a *HotStarTaq® Plus Master Mix* (*Qiagen*), variou-se a concentração dos *primers foward* e *reverse* em 0.25 e 0.5µM, como descrito nas Tabelas 5 e 6, respetivamente. Cada *primer* foi utilizado numa concentração de 10µM.

**Tabela 5:** Condições da reação de amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com utilização dos *primers foward* e *reverse* a uma concentração de 0.25µM em cada reação.

Componente	Volume/reação	Concentração final
<b>HotStarTaq Plus Master Mix, 2x</b>	10 µl	1 unidade de <i>HotStarTaq Plus</i> DNA Polymerase 1x PCR Buffer* 200 µM de cada dNTP
<b>Primers:</b>		
<b>Foward</b>	0.5 µl	0.25 µM
<b>Reverse</b>	0.5 µl	0.25 µM
<b>H<sub>2</sub>O DNase-free</b>	8 µl	-
<b>Amostra</b>	1 µl	
<b>Volume total da reação</b>	<b>20 µl</b>	

**Tabela 6:** Condições da reação de amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com utilização dos *primers foward* e *reverse* a uma concentração de 0.5µM em cada reação.

Componente	Volume/reação	Concentração final
<b>HotStarTaq Plus Master Mix, 2x</b>	10 µl	1 unidade de <i>HotStarTaq Plus</i> DNA Polymerase 1x PCR Buffer* 200 µM de cada dNTP
<b>Primers:</b>		
<b>Foward</b>	1 µl	0.5 µM
<b>Reverse</b>	1 µl	0.5 µM
<b>H<sub>2</sub>O DNase-free</b>	7 µl	-
<b>Amostra</b>	1 µl	
<b>Volume total da reação</b>	<b>20 µl</b>	

Com base nos resultados obtidos após a amplificação realizada com diferentes concentrações de *primers foward* e *reverse* no volume final de cada reação determinou-se que se deveria efetuar a reação de todas as amostras com 0.5 µM de cada *primer*. As reações de amplificação foram realizadas em tubos *MicroAmp*<sup>®</sup> de 0,2mL (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>).

Embora aquando do desenho dos *primers* fosse verificado que os pares de *primers* selecionados dos exões em estudo do gene RyR2 não formavam dímeros entre si optou-se por, neste protocolo, apenas utilizar um par de *primers* por reação uma vez que a

presença de diversos pares de *primers* pode diminuir consideravelmente a sensibilidade da reação (Bellau-Pujol et al., 2005). Posto isto, em cada tubo de reação foi pipetado 19 $\mu$ L de *mix*, previamente elaborada para cada par de *primers*, e contendo *HotStarTaq Plus Master Mix 2x*, os *primers forward* e *reverse* e a H<sub>2</sub>O DNase-free (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) de acordo com a Tabela 6.

Posteriormente adicionou-se 1 $\mu$ L de amostra, em cada tubo de reação de cada par de *primers* dos três exões em estudo.

A reação de PCR exibiu 3 fases onde as amostras foram submetidas a uma combinação adequada de tempo e temperatura seguindo as recomendações do fabricante do *Kit* de amplificação *HotStarTaq<sup>®</sup> Plus Master Mix (Qiagen)*, de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7:** Configuração da reação usando o *HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen)*

	<i>Fases</i>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
<b>1</b>	<b>1 Ciclo</b>		
	Ativação inicial	5 min	95°C
<b>2</b>	<b>38 Ciclos</b>		
	Desnaturação	30 s	94°C
	<i>Annealing</i>	30 s	50°C-68°C
	Extensão	1 min	72°C
<b>3</b>	<b>1 Ciclo</b>		
	Extensão final	10 min	72°C

**Fase 1-** Ativação inicial. No primeiro ciclo é realizada uma ativação inicial de modo a ativar a *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* otimizando a fase de desnaturação.

**Fase 2-** Esta fase é dividida em 3 etapas: a desnaturação, o *annealing* e a extensão. A cada ciclo de amplificação, o número de cópias da sequência-alvo é duplicado e, com a evolução dos ciclos da reação, ocorre aumento exponencial do número dessas sequências.

**Fase 3-** Extensão final.

De modo a verificar-se qual a temperatura ideal de *annealing* dos *primers forward* e *reverse* dos exões 3,93 e 103, realizou-se uma análise HRM (*High Resolution Melting*).

A HRM ajuda na escolha da melhor temperatura de *annealing* dos *primers* porque sendo um PCR em tempo real (q-PCR) pode observar-se a curva de amplificação, a

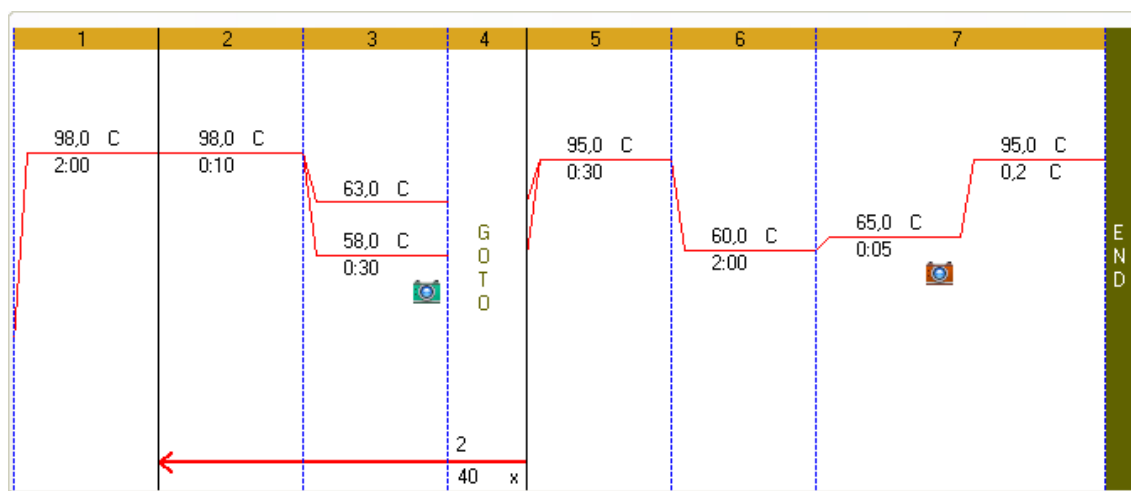
inclinação e o ciclo limiar em que a amplificação inicia. Na PCR normal apenas se pode observar o resultado final de amplificação, o que também ajuda a escolher a temperatura de *annealing* se não houver outra opção, contudo consegue-se obter mais dados com a q-PCR.

Para a realização da análise de HRM seguiu-se o protocolo otimizado do grupo de investigação BIOMICs (*Bioscience & Microtechnologies*) da Universidade do País Basco com recurso ao *EvaGreen® Master Mix (Biotium)*. Além disso, foram utilizadas três amostras referência estando as condições da reação descritas na Tabela 8.

**Tabela 8:** Condições da reação de q-PCR dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 usando a *EvaGreen® Master Mix (Biotium)*.

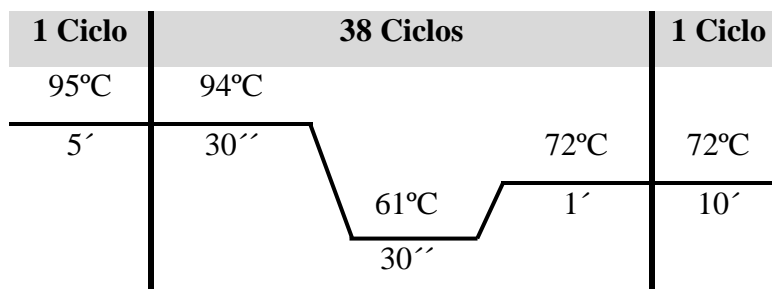
Componente	Volume/reação	Concentração final
<b>EvaGreen® Master Mix</b>	2.5 µl	-
<b>Primers:</b>		
<b>Foward</b>	0.5 µl	-
<b>Reverse</b>	0.5 µl	-
<b>H<sub>2</sub>O DNase-free</b>	0.5 µl	-
<b>Amostra</b>	1 µl	1 ng/µl
<b>Volume total da reação</b>	<b>5 µl</b>	

O processo foi realizado no termociclador *CFX96™ IVD Real-Time PCR Systems (BIO-RAD)* programado para que as temperaturas de *annealing* dos *primers* variassem num intervalo dos 58°C aos 63°C, como descrito na Figura 5.



**Figura 5:** Programação do termociclador onde se demonstra o tempo, temperatura e número de ciclos de cada uma das fases da q-PCR.

Face aos resultados obtidos, as reações de amplificação das amostras contendo os pares de *primers* dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 foram realizadas com uma temperatura de *annealing* de 61°C. Desta forma, o termociclador foi programado de acordo com o esquema da Figura 6.



**Figura 6:** Demonstração esquemática da programação no termociclador com tempo, temperatura e número de ciclos de cada uma das fases da PCR.

### 3.5. Eletroforese capilar automatizada

De modo a verificar o sucesso da amplificação do DNA das amostras realizamos uma eletroforese capilar automatizada utilizando o sistema *QIAxcel* (*Qiagen*).

O sistema *QIAxcel* realiza a separação totalmente automatizada de fragmentos de DNA de acordo com seu peso molecular. O instrumento *QIAxcel Advanced* inclui uma série de diodos emissores de luz e coletores micro-óticos que se encaixam em capilares dentro de cartuchos de gel *QIAxcel*. Os fragmentos de DNA migram depois através de uma matriz de gel dentro dos pontos de excitação e detecção de passagem no capilar e o sinal é transmitido através de um tubo fotomultiplicador para o *software QIAxcel ScreenGel* para interpretação de dados. Os resultados são depois apresentados num relatório final, no qual consta a imagem do gel, com os marcadores de tamanho, e os eletroferogramas das amostras.

Como o consumo de amostra é inferior a 0,1µl as amostras podem ser utilizadas para análises posteriores.

### 3.6. Purificação do produto amplificado

Após a amplificação, os dNTPs e os *primers* não consumidos na reação permanecem em contacto com os produtos da PCR, podendo interferir negativamente na reação de sequenciação. Por esse motivo, o produto amplificado resultante da PCR foi purificado com recurso a um sistema enzimático *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (*Affymetrix*) que trata os produtos da PCR, removendo os *primers* e dNTPs não utilizados, sem que ocorra perda de amostra.

O protocolo de purificação foi o seguinte:

1. Adicionar, diretamente aos tubos contendo os produtos da reação após PCR, 5 $\mu$ L de *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (*Affymetrix*);
2. No termociclador *GeneAmp*<sup>®</sup> *PCR System 9700* (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>):
  - a. Incubar as amostras a 37°C durante 15 minutos, para degradar os restantes *primers* e nucleótidos;
  - b. Incubar as amostras 80°C durante 15 minutos, para inativar o reagente *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (*Affymetrix*).
3. Armazenar os produtos da PCR tratados a -20°C para posterior utilização na sequenciação das amostras.

Este protocolo baseia-se na ação da enzima Exonuclease I que degrada os *primers* e dNTPs não consumidos à temperatura de 37°C. De seguida, a enzima é inativada por meio de calor excessivo durante a incubação a 80°C.

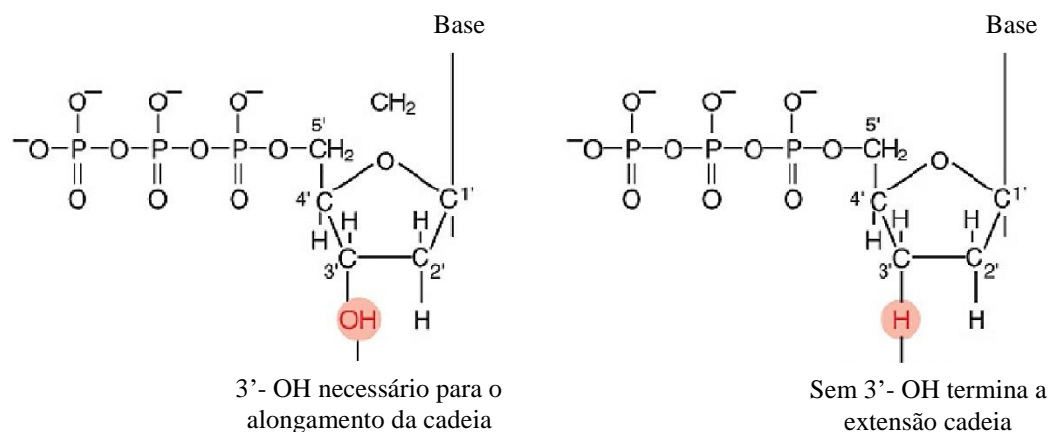
As principais vantagens deste protocolo são a rapidez e o número reduzido de passos a executar e de reagentes a utilizar.

### 3.7. Sequenciação do DNA

A reação de sequenciação é similar a uma reação de PCR, na qual a amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro*, porém, na sequenciação apenas um *primer forward* (sentido 5'-3') ou *reverse* (sentido 3'-5') é utilizado para síntese das cadeias de DNA. Neste estudo optou-se por utilizar apenas o *primer forward*, para a reação de sequenciação, embora o uso do *primer reverse* possa também ser considerado nos casos em que os resultados de algumas amostras não sejam satisfatórios.

Durante a reação, a DNA polimerase sintetiza novas cadeias de DNA, o *primer* liga-se à sequência complementar e os nucleótidos são incorporados de acordo com a cadeia

de DNA molde. Ocorre tanto a incorporação dos nucleótidos livres não marcados, os desoxinucleotídeos comuns (dNTPs), quanto a de nucleótidos marcados com fluorescência (“*dye terminators*”), os didesoxinucleotídeos (ddNTPs), nos quais foi removido o grupo hidroxila na posição 3’ terminal (Figura 7). Os ddNTPs são também chamados de nucleótidos de terminação uma vez que ocorre a ligação de uma cadeia molde de DNA aos ddNTPs a leitura é interrompida gerando um fragmento de tamanho correspondente ao local onde o nucleótido de terminação foi incorporado na cadeia de DNA molde pois sem o grupo hidroxila 3’ terminal dos ddNTPs não é possível ocorrer a ligação peptídica determinando a interrupção da fase de extensão. No final da reação são gerados fragmentos de vários tamanhos, uma vez que a adição de ddNTPs marcados ocorre aleatoriamente durante a reação de sequenciação.



**Figura 7:** Representação esquemática de um desoxinucleotídeo (dNTP), (à esquerda) e de um didesoxinucleotídeo (ddNTP) (à direita), no qual foi removido o grupo hidroxila na posição 3’ terminal. **Adaptado de:** Whole Genome Sequencing. (2017). In *ScienceAid*. Accessed March 12, 2017, from [https://scienceaid.net/Whole\\_Genome\\_Sequencing](https://scienceaid.net/Whole_Genome_Sequencing)

Neste estudo a sequenciação do DNA das amostras foi realizada com recurso ao *Kit* de reação *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)*. Este *kit* é constituído por desoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), *buffer* Tris-HCl, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), Ampli Taq DNA polimerase e didesoxinucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ligados a moléculas fluorescentes de alta sensibilidade, denominadas dicloro-rodaminas. As dicloro-rodaminas dicloro R6G, dicloro ROX, dicloro R110 e dicloro TAMRA são ligadas respetivamente aos didesoxinucleotídeos. As

diclororodaminas são moléculas aceptoras de fluorescência e são ligadas, por sua vez, a moléculas doadoras de fluorescência, a 6-carboxi-fluoresceína (6 FAM).

As condições da reação de sequenciação foram as preconizadas no protocolo fornecido pelo fabricante do *Kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, sendo que o volume foi reduzido para os valores observados na Tabela 9.

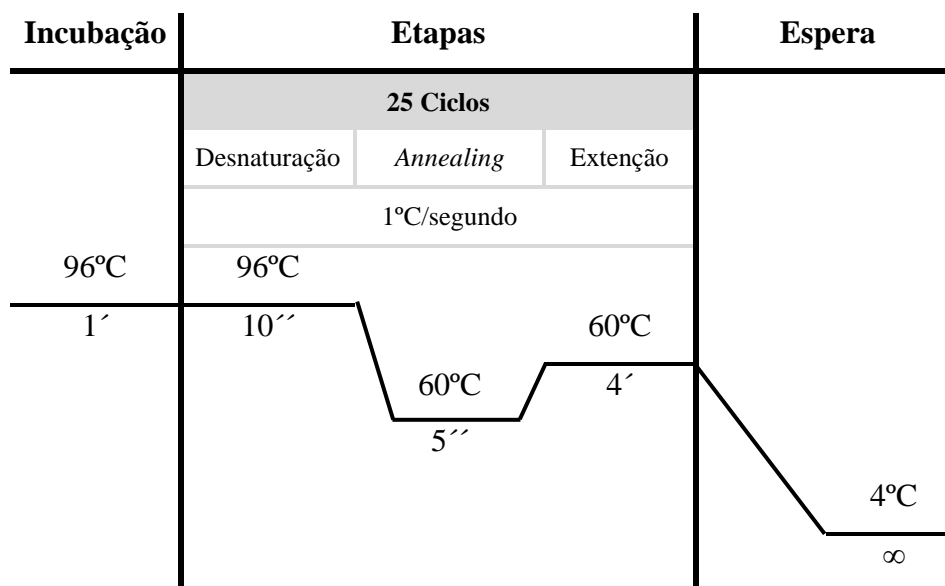
**Tabela 9:** Condições da reação de sequenciação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 com utilização do *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)* num volume final de 10 µL.

Componente	Foward	Reverse
<b>BigDye™ Terminator 3.1 Ready</b>	2 µL	2 µL
<b>Reaction Mix</b>		
<b>BigDye™ Terminator v1.1 &amp; v3.1 5X</b>	1 µL	1 µL
<b>Sequencing Buffer</b>		
<b>Primer (3.2 µM)</b>	1 µL	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O DNase-free</b>	5 µL	5 µL
<b>Amostra</b>	1 µl	1 µl
<b>Volume total da reação</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

Seguindo-se as recomendações do fabricante, para um volume de *BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems®)* inferior a 8 µL, deve ser utilizado o tampão *BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems®)*. O uso deste tampão permite reduzir os custos da sequenciação sem afetar a precisão da sequência ou o comprimento da leitura.

As reações foram realizadas em placas de 96 orifícios (*VWR®*) devidamente seladas com película térmica (*Axygen®*) no selador térmico 5390 (*Eppendorf®*).

O processo de sequenciação foi realizado no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®)* programado segundo as recomendações de fabricante do *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, descrito no esquema da Figura 8.



**Figura 8:** Demonstração esquemática da programação no termociclador para a sequenciação das amostras.

### 3.8. Purificação do produto sequenciado

A purificação do produto da reação da sequenciação tem o objetivo de eliminar resíduos da solução de forma a que estes não interfiram na leitura realizada pelo sequenciador. Desta forma, os terminadores ddNTPs marcados com fluorescência, os dNTPs e os sais devem ser removidos dos produtos da sequenciação antes da análise de eletroforese capilar de modo a aumentar a qualidade das sequências produzidas.

As reacções de sequenciação foram purificadas com o *Kit* de purificação *BigDye*<sup>®</sup> *Xterminator*<sup>™</sup> (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>), que remove eficientemente os terminadores *BigDye* não incorporados sem perda de amostra e num curto espaço de tempo.

A solução *XTerminator*<sup>™</sup> *Solution*, atua por ligação às impurezas, mantendo na solução somente os fragmentos para a sequenciação. O reagente *Sam*<sup>™</sup> *Solution*, remove os ddNTPs residuais e estabiliza os fragmentos remanescentes para a sequenciação.

O protocolo de purificação, seguindo as recomendações do fabricante, foi o seguinte:

1. Na placa de reação de sequenciação, pipetar:
  - a) 45µL de *Sam*<sup>™</sup> *Solution*;
  - b) 10µL de *XTerminator*<sup>™</sup> *Solution*.

**Nota:** Antes de pipetar a solução *XTerminator*<sup>™</sup> realizar um *vortex* de 10 segundos, uma vez que este produto é muito viscoso e de difícil pipetagem. Deve voltar-se a fazê-lo sempre que se considere necessário.

2. Selar novamente a placa de reação com a película de vedação térmica (*Axygen*<sup>®</sup>) no selador térmico.
3. Colocar a placa no agitador de placas *IKA MS3* digital (*IKA*<sup>®</sup>) durante 30 minutos a 2.000 rotações por minuto.
4. Centrifugar a placa a 1000×g durante 2 minutos na centrífuga 5810 (*Eppendorf*<sup>TM</sup>).

A centrifugação de 2 minutos tem como objetivo deslocar as impurezas residuais para o fundo do tubo de reação, o que reduz a intensidade de ruídos na sequenciação no sequenciador automático.

Após a purificação as amostras devem ser processadas no sequenciador num prazo de 48 horas de modo a prevenir a degradação da fluorescência, o que poderia comprometer o sinal durante a sequenciação.

### 3.9. Sequenciação automática de DNA

A sequenciação automática permite determinar a sequência dos nucleótidos num determinado fragmento de DNA, através de um sequenciador automático. Este método baseia-se na capacidade da DNA polimerase incorporar ddNTPs e na eficiência da eletroforese capilar que separa os fragmentos de DNA.

Assim, para a sequenciação automática foram preparadas placas *PCR-96-AB-C* (*Axygen*<sup>®</sup>) contendo 6 µL de *HiDi<sup>TM</sup> Formamide* (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) e 10 µL de suspensão dos produtos da PCR de sequenciação purificados. Seguidamente, as amostras foram submetidas a uma eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism<sup>®</sup> 3130xl Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>). Neste sequenciador, de 16 capilares, os fragmentos a serem sequenciados são injetados para o interior do capilar entrando nesta fase em contacto com o polímero. Quando submetidos a alta voltagem, esses fragmentos tendem a mover-se, no interior do capilar preenchido com o polímero, do polo negativo em direção para o polo positivo. Assim, os fragmentos marcados em diferentes locais com ddNTPs fluorescentes migram progressivamente, de acordo com o seu peso molecular. Os resultados são depois transferidos para *software* do equipamento onde são transformados, por processamento algorítmico quimiométrico, em eletroferogramas.

### **3.10. Análise dos resultados**

Os dados obtidos, após sequenciação automática, foram analisados nos *software* *SeqScape*<sup>®</sup> v.3 (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) e *Sequencing Analysis*<sup>®</sup> v.5.4 (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>), com o objetivo de se averiguar a presença das variações de sequência das amostras em estudo por comparação com as sequências de referência dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 obtidas na base de dados *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

### **3.11. Análise estatística**

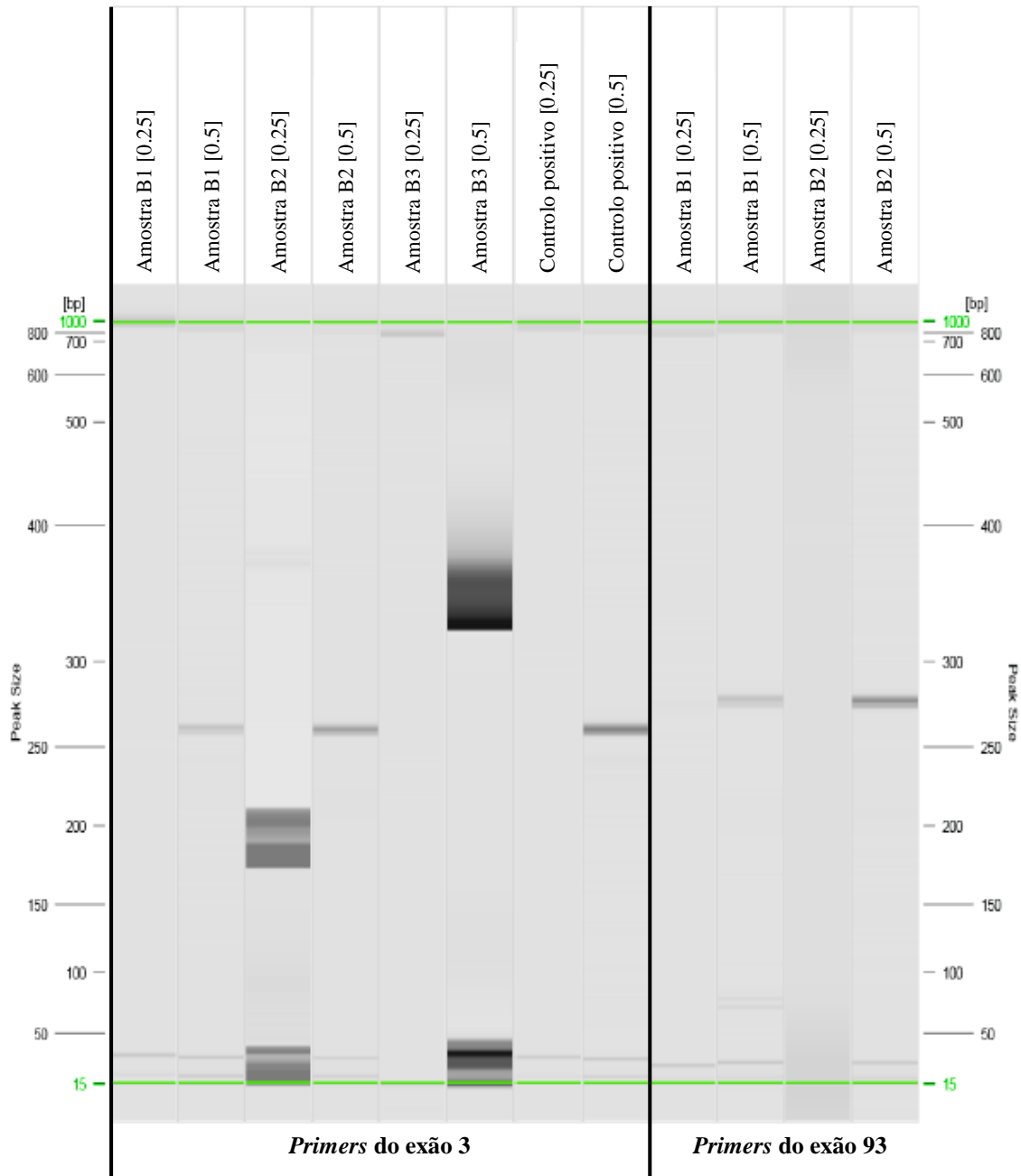
Foram realizados cálculos estatísticos a fim de ser determinar a probabilidade de na nossa amostragem de 50 indivíduos existir pelo menos uma variação genética nos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2.

Esta análise foi efetuada com recurso a cálculos de probabilidade condicionada e ao Teorema de Bayes que foram realizados na folha de cálculo do *Microsoft Excel*.

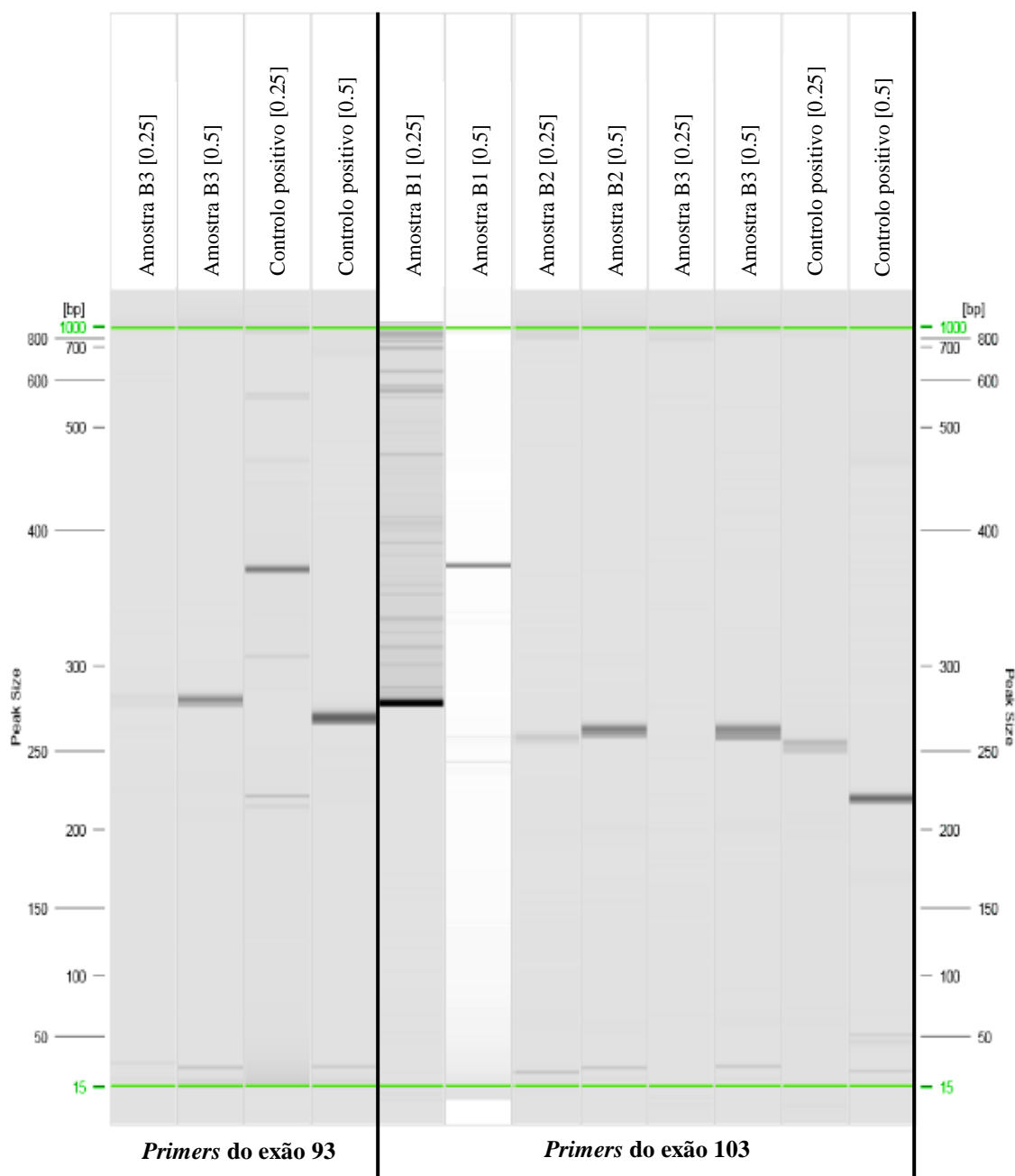
## **4. RESULTADOS**

De seguida são apresentados os resultados obtidos nos vários processos realizados ao longo deste estudo, com o intuito de identificar possíveis variações genéticas nos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2.

**4.1. Padronização da concentração dos *primers forward* e *reverse* para a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 utilizando *HotStarTaq® Plus Master Mix (Qiagen)***



**Figura 9**

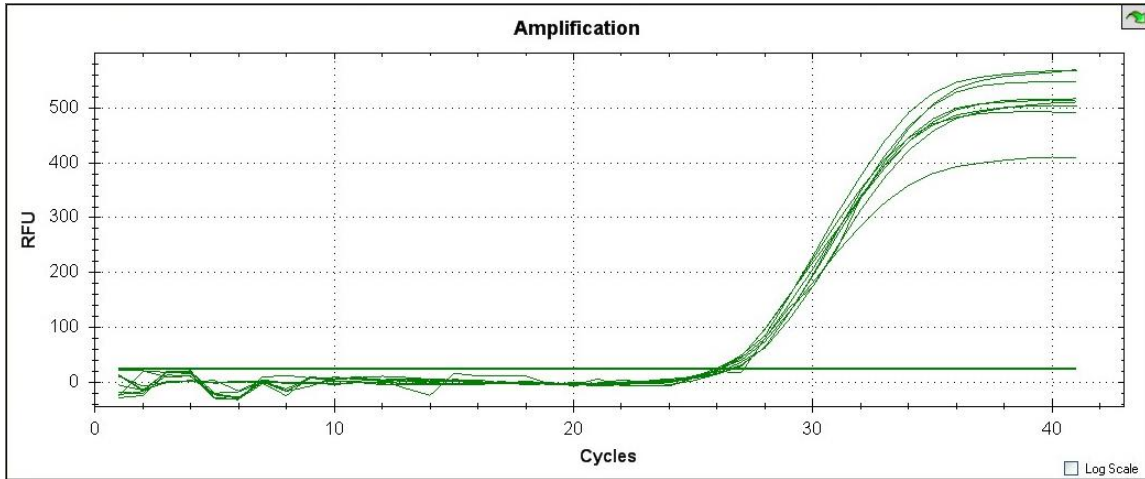


**Figura 10**

**Figura 9 e 10:** Imagem obtida a partir do *software QIAxcel ScreenGel* com os eletroferogramas, e os marcadores de tamanho (representado a verde), após corrida eletroforética das amostras amplificadas com concentrações de 0.25 e 0,5 μM dos *primers* dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2.

Os eletroferogramas demonstram que à concentração de 0.5 μM dos *primers* dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2, as amostras tiveram uma melhor amplificação uma vez que a maioria das amostras, a esta concentração, migraram mais linearmente durante a corrida eletroforética.

#### 4.2. Padronização da temperatura de *annealing* para a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 a partir de DNA de referência



**Figura 11:** Gráfico obtido durante a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 das amostras do DNA de referência.

O gráfico representa o aumento da fluorescência (e, por conseguinte, do número de cópias da sequência de interesse) ao longo dos ciclos da q-PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	63,0											
B	62,7											
C	62,2											
D	61,2	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		Unk	Unk	
E	60,0	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		Unk	Unk	
F	59,0	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk		Unk	Unk	
G	58,3											
H	58,0											

**Figura 12**

Well	Cq
D04	26,21
D05	26,39
D06	26,09
E04	26,09
E05	26,64
E06	25,90
F04	27,11
F05	26,56
F06	26,12

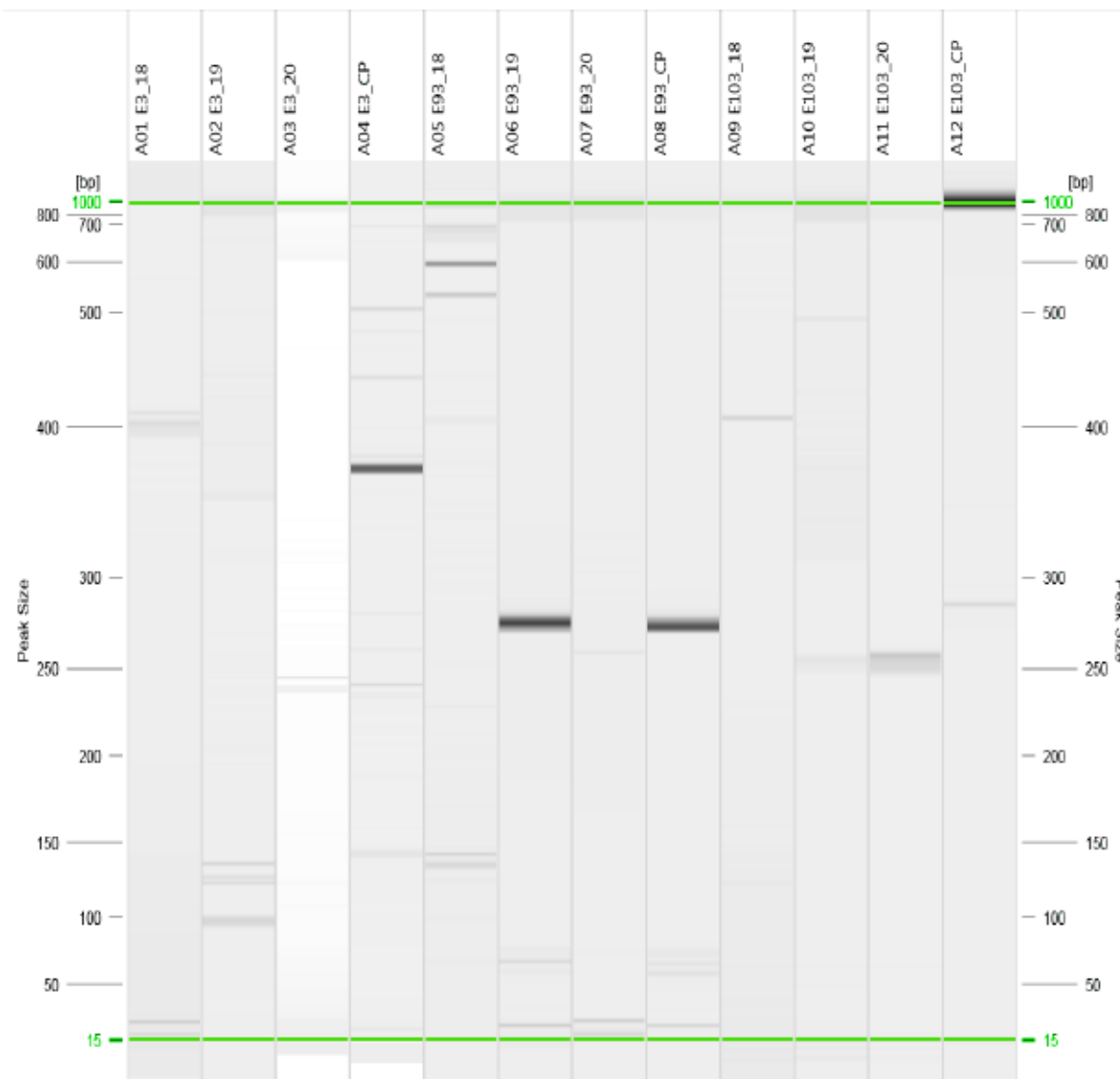
**Figura 13**

**Figura 12 e 13:** Visualização dos resultados obtidos durante a q-PCR dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 das amostras do DNA de referência (Figura 11).

Na Figura 13 observa-se a temperatura à qual a fluorescência excede o limiar e inicia a curva de amplificação (Cq). Verifica-se que as amostras da linha D, que amplificam a uma temperatura de 61°C (*annealing*), excedem o limiar no mesmo ciclo de amplificação

(~26), com um desvio muito pequeno para todas. A 60°C o *annealing* também funciona, contudo o desvio do valor do ciclo limiar onde começa a curva de amplificação é maior. Deste modo, a temperatura de *annealing* a 61°C será a recomendada.

### 4.3. Eletroforese capilar automatizada das amostras para comprovar a amplificação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2

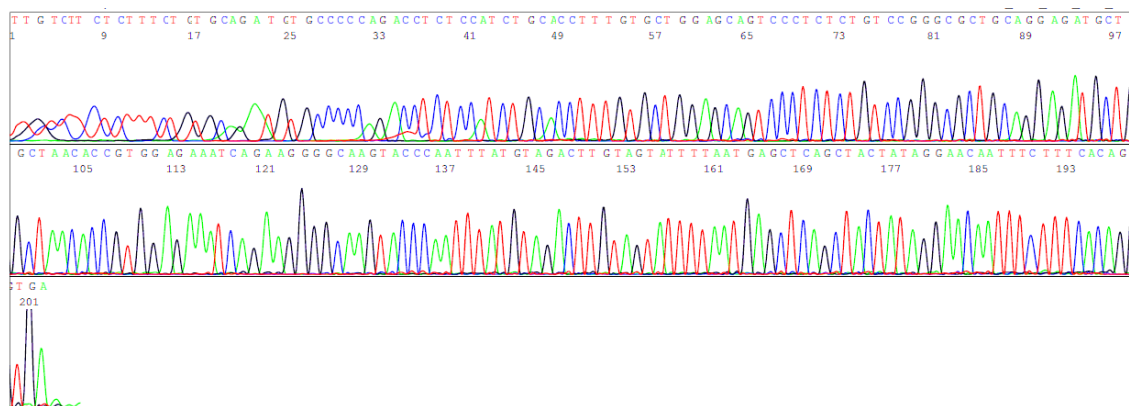


**Figura 14:** Imagem obtida após eletroforese no *QIAxcel ScreenGel* evidenciando os fragmentos amplificados dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 das amostras 18, 19 e 20, e os marcadores de tamanho (representado a verde).

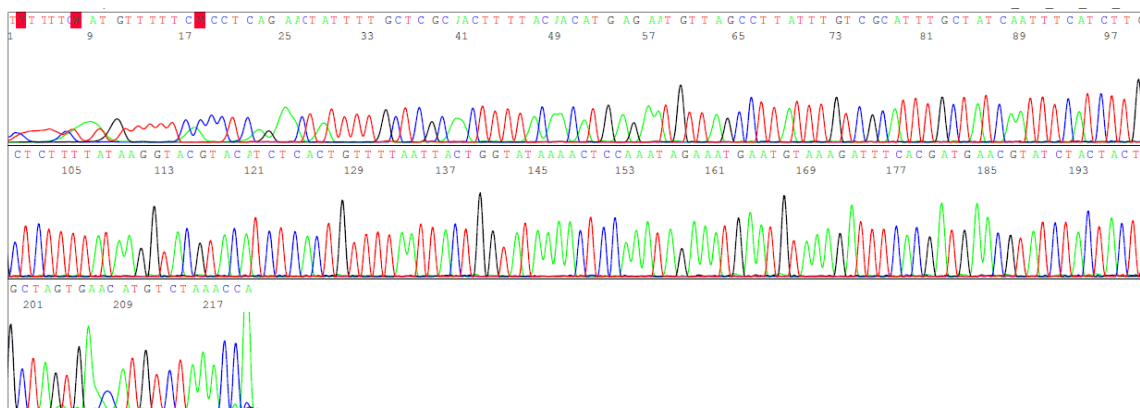
Na imagem é possível observar as bandas correspondentes à amplificação de algumas amostras para alguns exões do gene RyR2.

#### 4.4. Eletroferogramas das sequências obtidas através da sequenciação dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2

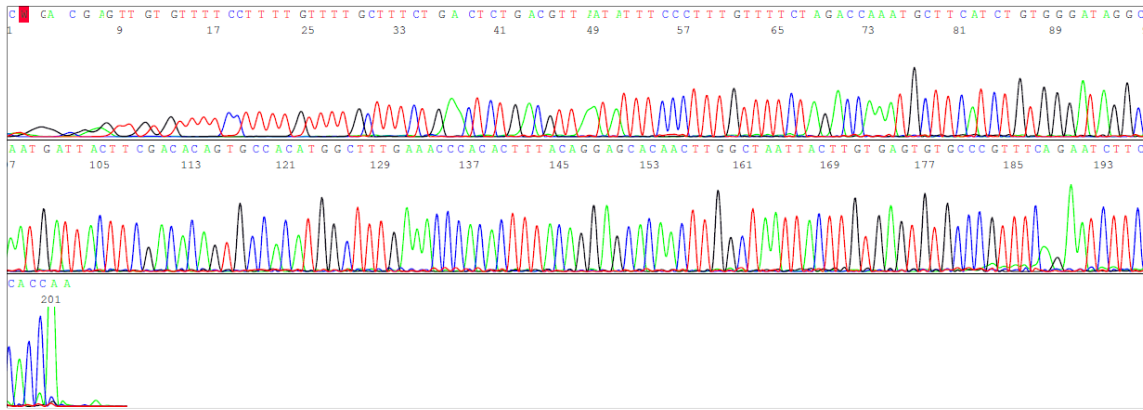
Através dos eletroferogramas que se seguem, obtidos no *software Sequencing Analysis*® v.5.4 (Applied Biosystems®), pode observar-se a composição em nucleótidos dos fragmentos de DNA. O *software Sequencing Analysis*® v.5.4 (Applied Biosystems®) permitiu analisar os dados produzidos no sequenciador automático *ABI Prism*® 3130xl *Genetic Analyser* (Applied Biosystems®). No esquema de cores da leitura dos nucleótidos a base A está representada a verde; a base T a vermelho; a base C a azul e a base G a preto.



**Figura 15:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software Sequencing Analysis*® v.5.4 (Applied Biosystems®), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o *primer forward* do exão 3 do gene RyR2.

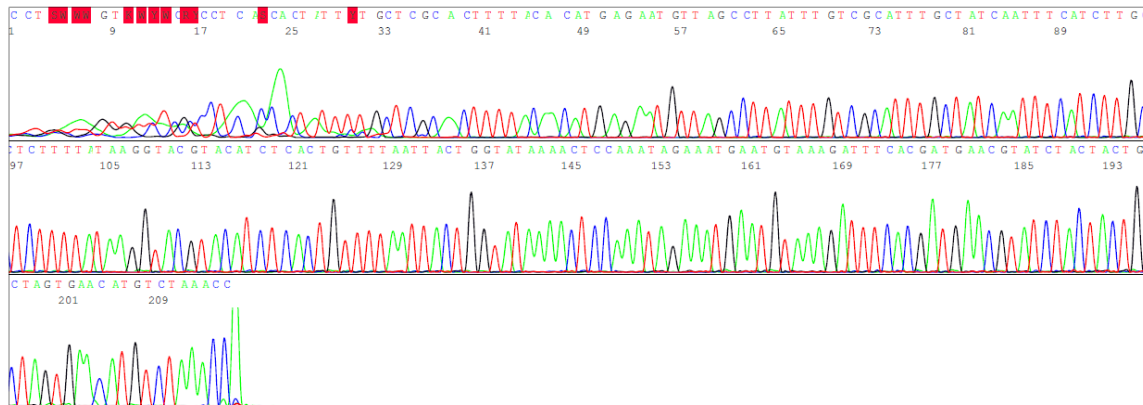


**Figura 16:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software Sequencing Analysis*® v.5.4 (Applied Biosystems®), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o *primer forward* do exão 93 do gene RyR2.

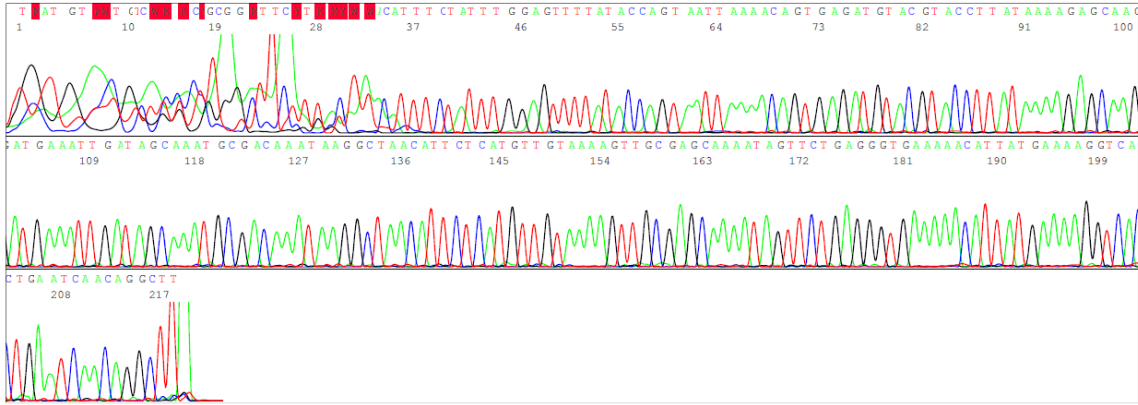


**Figura 17:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software Sequencing Analysis*<sup>®</sup> v.5.4 (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o *primer forward* do exão 103 do gene RyR2.

Uma vez que os resultados referentes às amostras sequenciadas com o *primer forward* do exão 93 do gene RyR2 não estavam a ser satisfatórias, na medida em que a havia perdas na leitura de algumas bases no início da sequência durante a sequenciação (Figuras 16 e 18), optou-se por realizar também a análise do exão 93 com o *primer reverse* (Figura 19). Acredita-se que estas perdas na leitura das extremidades durante a sequenciação ocorreram devido a falhas na hibridização do *primer forward* na amostra.



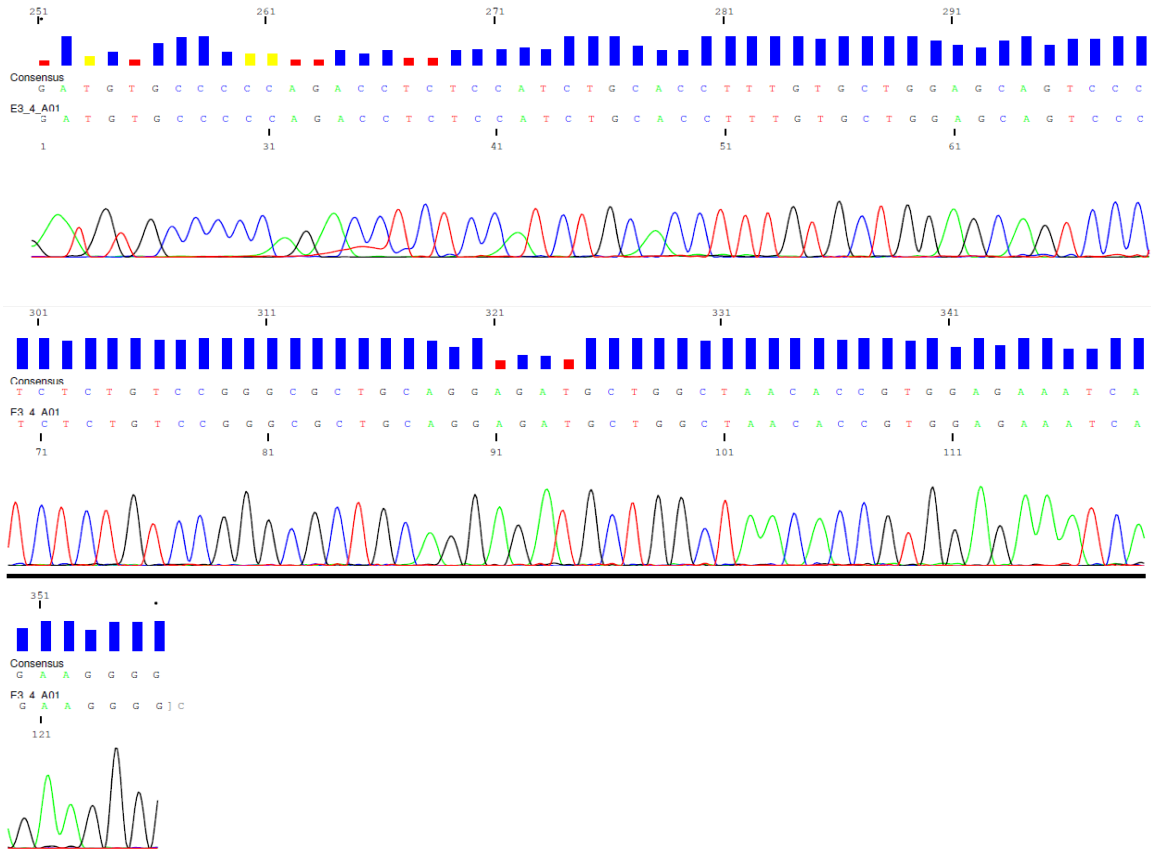
**Figura 18:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software Sequencing Analysis*<sup>®</sup> v.5.4 (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B5, sequenciado com o *primer forward* do exão 93 do gene RyR2.



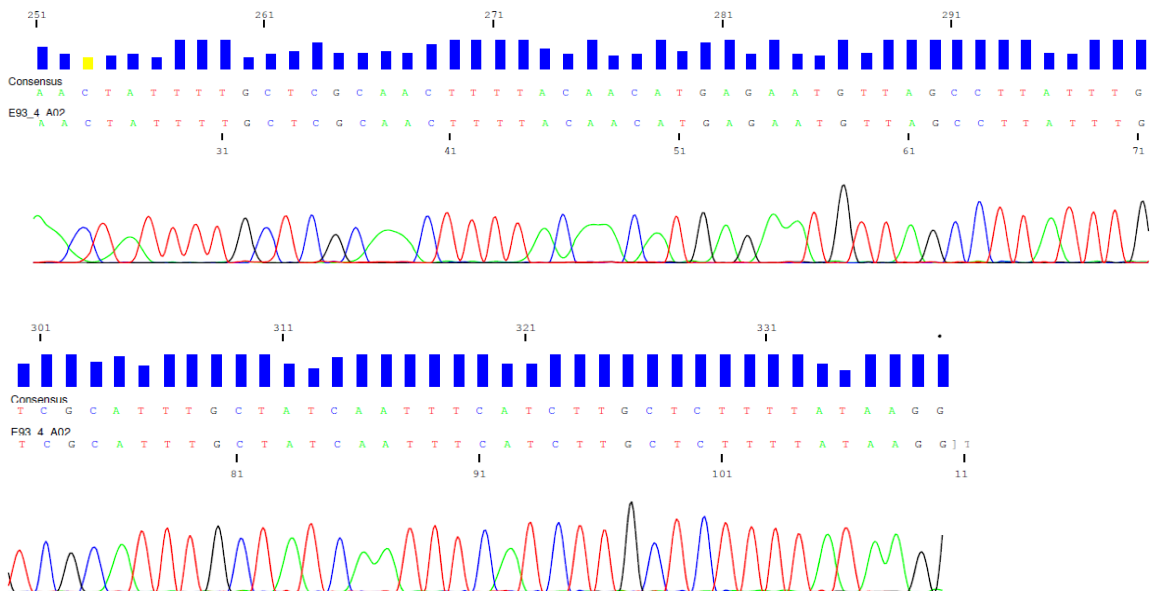
**Figura 19:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software Sequencing Analysis*® v.5.4 (*Applied Biosystems*®), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B5, sequenciado com o *primer reverse* do exão 93 do gene RyR2.

#### 4.5. Análise das sequências obtidas das amostras de DNA através da comparação com a sequências referências dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2

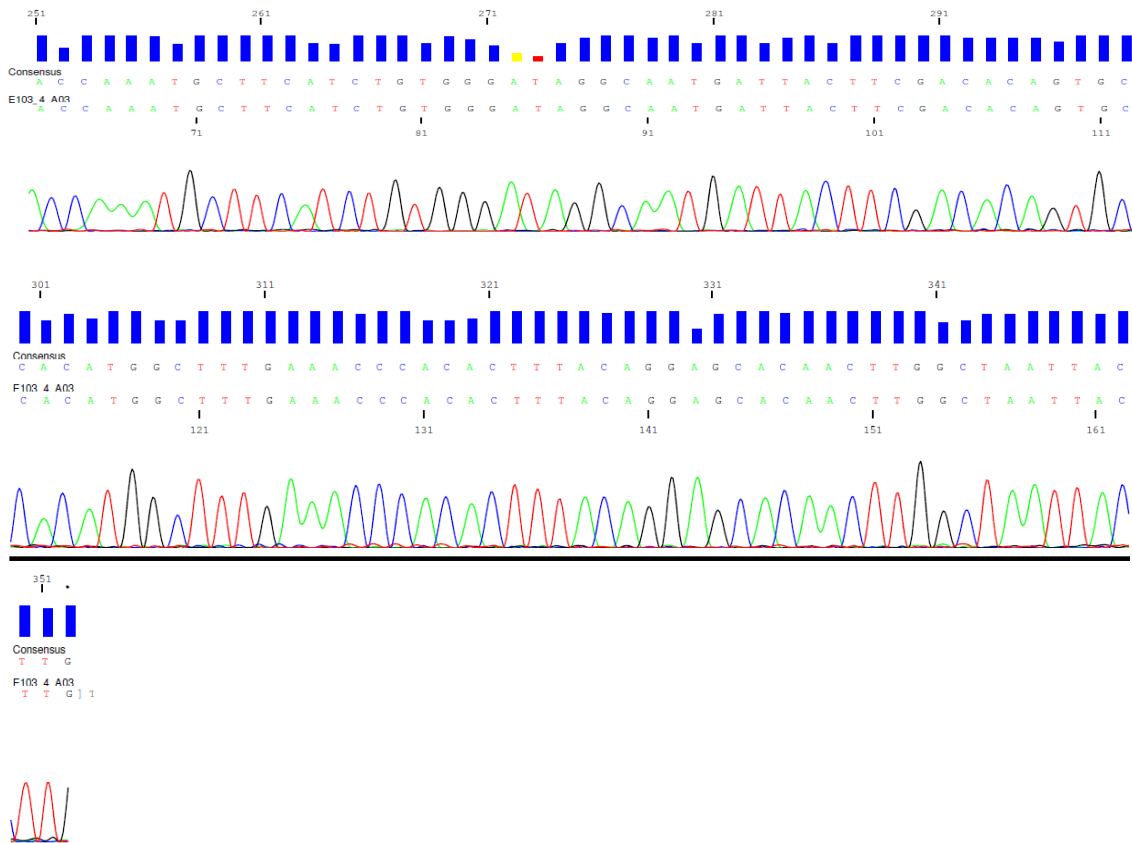
Através dos eletroferogramas apresentados de seguida, obtidos no *software SeqScape*® v.3 (*Applied Biosystems*®), pode observar-se a composição em nucleótidos dos fragmentos de DNA. O *software SeqScape*® v.3 (*Applied Biosystems*®) permitiu a comparação da sequência obtida, após sequenciação, com a sequência referências, previamente selecionada a partir da base de dados *Ensembl*, permitindo detetar e assinalar possíveis variações genéticas. No esquema de cores da leitura dos nucleótidos a base A está representada a verde; a base T a vermelho; a base C a azul e a base G a preto.



**Figura 20:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software SeqScape® v.3* (*Applied Biosystems®*), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o *primer foward* do exão 3 do gene RyR2.

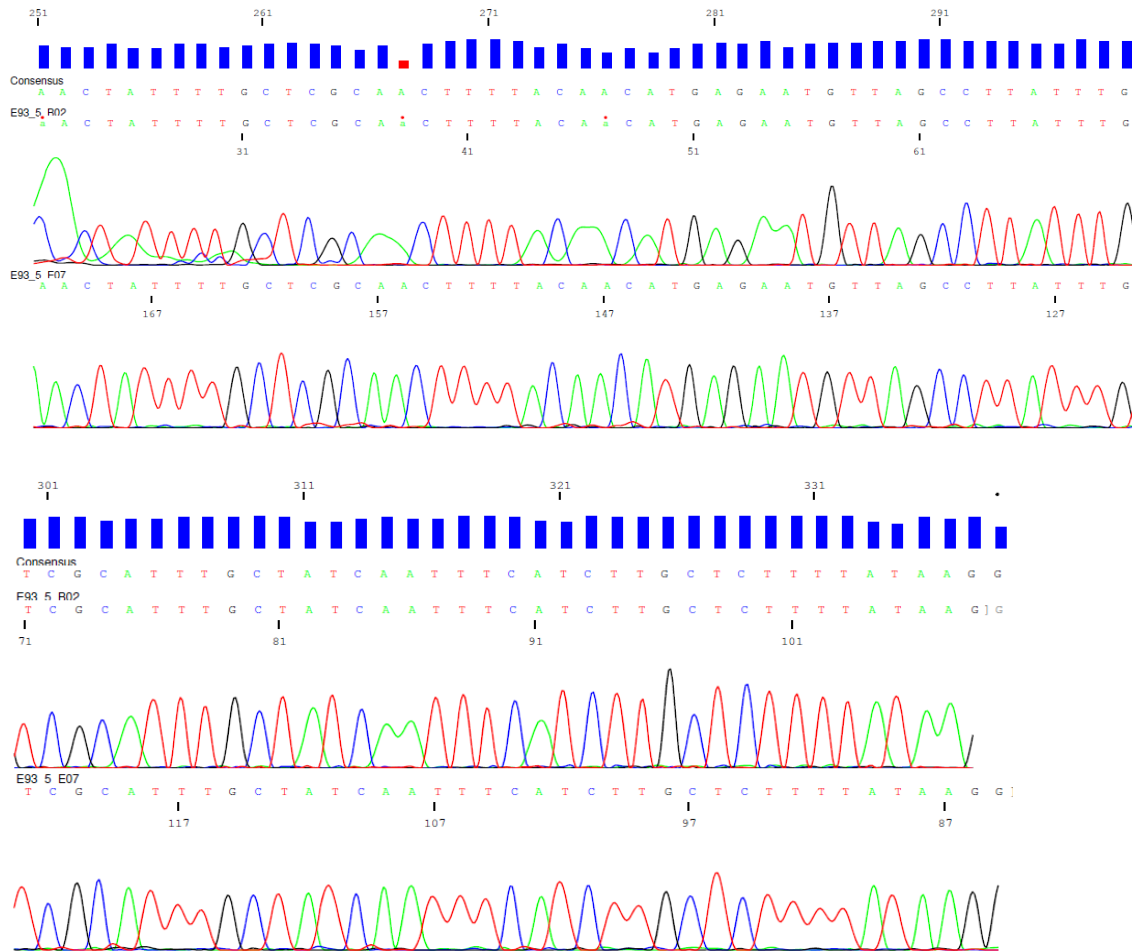


**Figura 21:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software SeqScape® v.3* (*Applied Biosystems®*), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o *primer foward* do exão 93 do gene RyR2.



**Figura 22:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software SeqScape® v.3* (*Applied Biosystems®*), de um fragmento de DNA extraído da zaragatoa bucal da amostra B4, sequenciado com o *primer foward* do exão 103 do gene RyR2.

No eletroferograma da Figura 23 pode observar-se a composição em nucleótidos dos fragmentos de DNA, obtidos no *software SeqScape® v.3* (*Applied Biosystems®*) que permitiu a comparação das sequências obtidas, após sequenciação com os *primers foward* e *reverse* do exão 93 do gene RyR2, com a sequência referência. No esquema de cores da leitura dos nucleótidos a base A está representada a verde; a base T a vermelho; a base C a azul e a base G a preto.



**Figura 23:** Exemplo de um eletroferograma, visualizado no *software SeqScape® v.3* (*Applied Biosystems®*), dos fragmentos de DNA extraídos da zaragatoa bucal da amostra B5, sequenciados com os *primer forward* e *reverse* do exão 93 do gene RyR2.

## **5. DISCUSSÃO**

A MSC pode ocorrer em todas as idades e, em geral, a doença arterial coronária e o enfarte agudo do miocárdio representam mais de 90% dos casos (Zipes and Wellens, 1998), (Eckart et al., 2011). Contudo, quando se considera a MSC em jovens ( $\leq 40$  anos) estima-se que 30% de todas as mortes não traumáticas são causadas por uma variedade de distúrbios arritmogénicos (Germann and Perron, 2005) (Gráfico 1). Uma vez que esses distúrbios não causam qualquer alteração estrutural no coração, nenhuma causa de morte é geralmente identificada na autópsia médico-legal completa e esses casos são designados como MSI. Diversos estudos mais recentes, citados de seguida, estão em conformidade com os de Germann *et al.* (Germann and Perron, 2005).

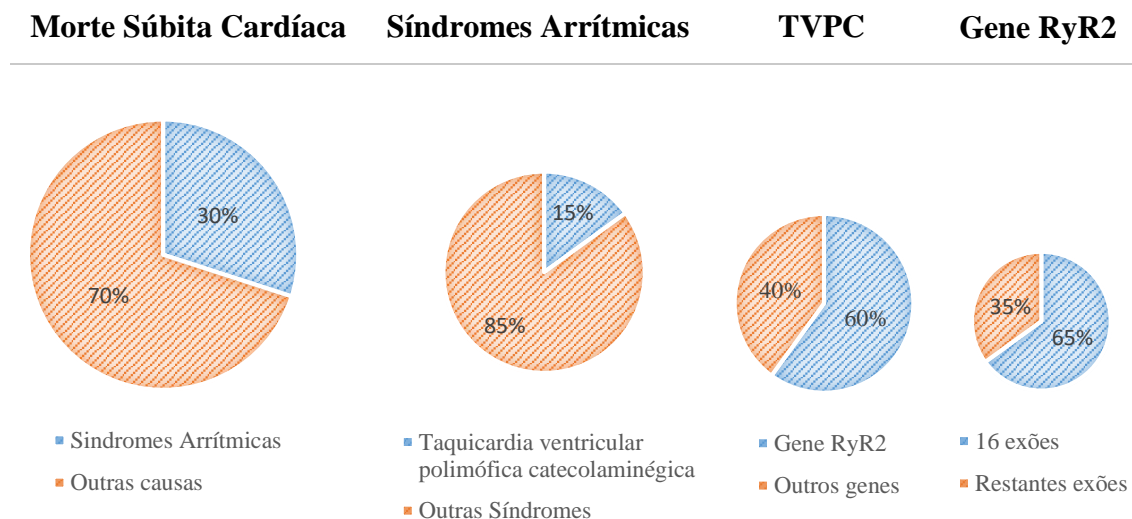
Nos estudos de Kaufenstein *et al.* foi realizada a análise genética em 15 casos de MSI de modo a detetarem mutações nos principais genes que causam canalopatias cardíacas. O teste genético revelou mutações que podem explicar a causa da morte em 4 dos 15 casos de MSI (27%) (Kaufenstein et al., 2013). Também o estudo de Campuzano *et al.* realizou análises genéticas, nos principais genes associados à MSC, em 29 casos de MSI em jovens ( $<15$  anos) (Campuzano et al., 2014). Nessa análise foram identificadas variações genéticas potencialmente patogénicas em 41% dos casos (sendo que cerca de 30% foram em genes arritmogénicos). Já Gladding *et al.* usaram amostras de recém-nascidos, vítimas de MSI, e identificaram variações genéticas causadoras de doença em 4 dos 19 casos (21 %) (Gladding et al., 2010). Entre 2009 e 2011, a análise genética de 15 vítimas jovens de MSI provenientes de departamentos de medicina forense da Suécia revelou que 6 das vítimas (40%) apresentavam mutações patogénicas como possível causa de MSC sendo que 2 delas (~13%) se encontravam no gene RyR2 (Stattin et al., 2016).

Admite-se que cerca de 15% dos indivíduos com MSI apresentam TVPC (Tester et al., 2012) e 60% desses casos estão relacionados com mutações autossómicas dominantes no gene RyR2. Em conformidade com isso, entre 2008 e 2014 Yu *et al.* realizaram um estudo em Hong Kong a fim de detetarem mutações no gene RyR2 em 10 crianças diagnosticadas com TVPC, confirmando-se mutações nesse gene em 6 delas (60%) (Yu et al., 2016). Também Roston *et al.* realizou um estudo em jovens ( $<19$  anos de idade) com TVPC e nos seus familiares de primeiro grau. O teste genético foi realizado em 194 indivíduos sendo que 117 (60%) apresentava TVPC1 associada a mutações no gene RyR2 (Roston et al., 2017b).

O estudo de Medeiros-Domingo *et al.* aponta que 65% das mutações no gene RyR2, associadas à TVPC, podem ser detetadas pelo rastreio de 16 dos 105 exões do gene RyR2

- 3, 8, 14, 45, 46, 47, 49, 88, 89, 90, 93, 96, 97, 100, 101 e 103. (Medeiros-Domingo et al., 2009). No presente estudo foi definido que apenas se estudariam 3 destes 16 exões do gene RyR2, os exões 3, 93 e 103.

**Gráfico 1:** Representação gráfica onde se demonstram as percentagens de: MSC com origem em síndromes arrítmicas; relevância da TVPC entre as síndromes arrítmicas; relação da TVPC com o gene RyR2; distribuição das mutações nos exões do gene RyR2.



Os cálculos estatísticos deste estudo mostraram que a probabilidade de na nossa amostra de 50 indivíduos estes apresentarem, pelo menos, uma variação genética nos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 é de 0.3%. Esta probabilidade é reduzida, como seria de esperar, uma vez que partimos de amostras de indivíduos saudáveis e não de amostras *post-mortem* de indivíduos cuja causa de morte permanece desconhecida depois de uma autópsia médico-legal completa, incluindo a realização de exames complementares de diagnóstico (toxicológicos e histológicos), a avaliação da história clínica e a investigação das circunstâncias da morte.

Após a análise completa no grupo de amostragem deste estudo, não foi encontrada nenhuma variação genética nos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2. Não podemos, contudo, afirmar se estes resultados se encontram ou não em conformidade com os estudos citados em bibliografia, uma vez que não há nenhum estudo publicado onde a amostragem corresponde a uma população assintomática, sem diagnóstico de TVPC nem relato de casos de MSC na família.

É ainda de realçar que o gene RyR2 não foi totalmente sequenciado, nem o rastreio dos 16 exões, recomendado por Medeiros-Domingo *et al.*, foi realizado. De referir

igualmente que, o número de voluntários (n=50) é reduzido, tendo em consideração que a incidência dos indivíduos apresentarem pelo menos uma variação genética nos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 é de 3/1000. Desta forma, não se pode concluir que os indivíduos não apresentam TVPC associada a mutações no gene RyR2, uma vez que, para isso, ter-se-ia de fazer um rastreio mais completo.

Considerando estas limitações, e embora não fossem detetadas quaisquer variações genéticas nos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 das amostras analisadas, o protocolo experimental desta investigação demonstrou ter bons resultados face ao que era pretendido estudar.

Com este estudo, embora com limitações, foi possível demonstrar a possibilidade de serem realizados testes genéticos para o rastreio de síndromes arrítmicas, como a TVPC. No entanto, atualmente existem métodos como a *Next Generation Sequencing* (NGS) e o *Whole Exome Sequencing* (WES) que serão, provavelmente, a estratégia mais eficaz para descobrir a etiologia das síndromes arrítmicas possivelmente responsáveis pela MSC (Stattin et al., 2016).

A NGS é um método de deteção de variações genéticas rápido, barato, sensível e de alto rendimento que pode ser implementado na prática diária quotidiana em Genética Forense, proporcionando novos conhecimentos sobre fisiopatologia da MSC (Chanavat et al., 2016). Contudo, dada a enorme quantidade de informações geradas pela NGS, seria crucial uma estratégia rigorosa de filtragem das variações identificadas, juntamente com uma colaboração multidisciplinar, a fim de se determinar o seu potencial papel patogénico na causa da morte (Farrugia et al., 2015). Já a WES é uma estratégia eficiente para detetar variações genéticas, raras e potencialmente patogénicas, no exoma, e que possam estar subjacentes à causa de MSI (Neubauer et al., 2016). Porém, a possível identificação de variantes de significância desconhecida torna desafiadora a interpretação dos resultados.

Apesar da atual falta de conhecimento na classificação de patogenicidade de variantes genéticas ambíguas, a identificação de variações genéticas patogénicas ou potencialmente patogénicas em casos de MSI permite a realização de avaliação clínica, aconselhamento genético e medidas preventivas de parentes em risco, com o objetivo de prevenir novos casos de MS na mesma família (Campuzano et al., 2014). Face a isso, seria bastante proveitoso que num futuro próximo se iniciassem exames genéticos de forma mais rotineira num laboratório forense, como Laboratório de Biologia e Genética Forenses do INMLCF, I.P., principalmente em casos de MSI, a fim de se estabelecer um diagnóstico *post-mortem* correto. Para tal, no exame médico-legal *post-mortem* dever-se-ia incluir a

colheita e preservação de tecido cardíaco, assim como de sangue periférico, para permitir a análise genética sempre que seja admissível que a morte possa estar relacionada com alterações genéticas hereditárias com repercussões no ritmo cardíaco, tal como acontece na TVPC (Priori et al., 2016). Assim, um correto diagnóstico *post-mortem* poderia, nestes casos, revelar-se fundamental para os familiares da vítima, uma vez que as mutações no gene RyR2, associadas à TVPC, têm um padrão de herança autossômica dominante (Priori and Chen, 2011).

Entre 2005 e 2013 foi realizado um estudo genético no Japão em indivíduos com mutações no gene RyR2 e nos seus pais, confirmando a origem hereditária das respetivas mutações (Ohno et al., 2015). Contudo, este estudo constatou que a herança das mutações no gene RYR2 foi significativamente mais frequente nas mães (34,3%). Também o estudo de Priori *et al.* confirmou uma maior frequência na herança materna comparativamente com a paterna (Priori et al., 2002). No entanto, acredita-se que essa baixa frequência de herança paterna pode resultar do mau prognóstico de pacientes do sexo masculino, em comparação com mulheres (Priori et al., 2002), morrendo estes antes da idade de reprodução.

Porém, dados limitados suportam uma elevada taxa de mutações *de novo* no gene RyR2 (van der Werf et al., 2012a), (Kawamura et al., 2013), o que significa que nenhum dos progenitores detém a mutação genética. Numa análise de *coorte* japonesa de 14 indivíduos com TVPC, o teste genético resultou numa taxa de mutações *de novo* no gene RyR2 de 57% (Kawamura et al., 2013). Também o estudo de 15 famílias holandesas revelou variantes RyR2 *de novo* em quase metade dos indivíduos (van der Werf et al., 2012a). Todavia, com base nos estudos existentes, é impossível calcular a verdadeira taxa de variantes *de novo* devido ao rastreio parental incompleto (Roston et al., 2017b).

O rastreio parental, principalmente em parentes assintomáticos, pode fornecer resultados diagnósticos potencialmente explicativos que podem ajudar a identificar indivíduos que possam estar em risco. Foi realizado um estudo no Canadá envolvendo 96 indivíduos, familiares de primeiro grau de pacientes com paragem cardíaca ou vítimas de MSI, com fenótipo para anormalidades cardíacas (Steinberg et al., 2016). Detetaram-se mutações causadoras de doenças identificadas em 20 dos familiares testados (21%) sendo que as mutações no gene RyR2 foram das mais comuns, apresentando a TVPC uma correlação fenótipo-genótipo de 75%. Entre 1994 e 2007, após um estudo genealógico em 4 famílias com vários episódios de MSC em indivíduos jovens, 1404 indivíduos aparentados da Iha da Gran Canaria (Espanha) foram sujeitos a testes genéticos a fim de

se determinar uma causa genética para esses eventos fatais (Wanguemert et al., 2015). Neste estudo identificou-se uma mutação *missense* no exão 13 do gene RyR2 em 185 (~13%) dos indivíduos aparentados, sendo 6 destes vítimas de MSC.

Posto isto, é altamente recomendável uma avaliação interdisciplinar abrangente dos familiares em primeiro grau das vítimas MSI, uma vez que dessa forma poderá ser possível evitar outras mortes, prevenindo-se futuros eventos cardíacos fatais, através de um aconselhamento genético e de cardiologia especializados, do ajuste do estilo de vida ou iniciando tratamento farmacológico, ou outro, se disponível (Michaud et al., 2011), com vista ao tratamento de doenças cardíacas que até aí eram totalmente desconhecidas para estes pacientes.

## **6. CONCLUSÕES**

As conclusões do presente estudo foram:

1. O protocolo para a análise dos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 foi padronizado e concretizado com sucesso;
2. As sequências obtidas foram estudadas em *software* apropriados, através da comparação com sequências de referência, não se detetando variações genéticas nos exões 3, 93 e 103 do gene RyR2 na população estudada;
3. Apesar de não serem encontradas quaisquer variações genéticas nos exões 3, 93 e 103, da população estudada, não podemos excluir o gene RyR2 como possível marcador da TVPC uma vez que não se realizou um rastreio completo de todo o gene nem de todos os exões recomendados. Além disso, a inexistência de variações nestes 3 exões não nos permite afastar a hipótese de esta população estudada vir a desenvolver TVPC;
4. A inclusão de estudos genéticos *post-mortem*, em casos de MSC, em indivíduos com corações estruturalmente normais é altamente recomendável.

Deste modo, consideramos ser necessário e importante a integração de estudos genéticos, para o despiste das canalopatias mais frequentes, na investigação da MSC de indivíduos jovens em Portugal. Os testes genéticos *post-mortem* quando realizados rotineiramente nos casos de MSI podem ter uma acuidade diagnóstica maior e os familiares em primeiro grau das vítimas podiam ser avaliados sobre o risco de possuir uma condição cardíaca fatal. Além disso, a avaliação por testes genéticos de familiares de vítimas de MSC poderia reduzir a morbidade e a mortalidade através do envio deste indivíduos para consulta de especialidade de forma a ser monitorizada a sua função cardíaca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriel H and Zaklyazminskaya EV (2013) Cardiac channelopathies: genetic and molecular mechanisms. *Gene* **517**:1-11.
- Ackerman MJ (2009) State of postmortem genetic testing known as the cardiac channel molecular autopsy in the forensic evaluation of unexplained sudden cardiac death in the young. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* **32 Suppl 2**:S86-89.
- Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Semsarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C and Zipes DP (2011) HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* **8**:1308-1339.
- Basso C, Burke M, Fornes P, Gallagher PJ, de Gouveia RH, Sheppard M, Thiene G and van der Wal A (2008) Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **452**:11-18.
- Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, Ginevra C and Freymuth F (2005) Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *Journal of virological methods* **126**:53-63.
- Bers DM (2002) Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7**:d1697-1711.
- Campuzano O, Sanchez-Molero O, Allegue C, Coll M, Mademont-Soler I, Selga E, Ferrer-Costa C, Mates J, Iglesias A, Sarquella-Brugada G, Cesar S, Brugada J, Castella J, Medallo J and Brugada R (2014) Post-mortem genetic analysis in juvenile cases of sudden cardiac death. *Forensic science international* **245**:30-37.
- Cerrone M and Priori SG (2011) Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. *European heart journal* **32**:2109-2118.
- Chanavat V, Janin A and Millat G (2016) A fast and cost-effective molecular diagnostic tool for genetic diseases involved in sudden cardiac death. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **453**:80-85.
- Chappex N, Schlaepfer J, Fellmann F, Bhuiyan ZA, Wilhelm M and Michaud K (2015) Sudden cardiac death among general population and sport related population in forensic experience. *Journal of forensic and legal medicine* **35**:62-68.
- D'Ovidio C, Carnevale A, Grassi VM, Rosato E, Del Olmo B, Coll M, Campuzano O, Iglesias A, Brugada R and Oliva A (2017) Sudden death due to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia following negative stress-test outcome: genetics and clinical implications. *Forensic science, medicine, and pathology* **13**:217-225.

- Doolan A, Langlois N, Chiu C, Ingles J, Lind JM and Semsarian C (2008) Postmortem molecular analysis of KCNQ1 and SCN5A genes in sudden unexplained death in young Australians. *International journal of cardiology* **127**:138-141.
- Eckart RE, Shry EA, Burke AP, McNear JA, Appel DA, Castillo-Rojas LM, Avedissian L, Pearse LA, Potter RN, Tremaine L, Gentlesk PJ, Huffer L, Reich SS and Stevenson WG (2011) Sudden death in young adults: an autopsy-based series of a population undergoing active surveillance. *Journal of the American College of Cardiology* **58**:1254-1261.
- Elger B, Michaud K and Mangin P (2010) When information can save lives: the duty to warn relatives about sudden cardiac death and environmental risks. *The Hastings Center report* **40**:39-45.
- Fabiato A (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* **245**:C1-14.
- Farrugia A, Keyser C, Hollard C, Raul JS, Muller J and Ludes B (2015) Targeted next generation sequencing application in cardiac channelopathies: Analysis of a cohort of autopsy-negative sudden unexplained deaths. *Forensic science international* **254**:5-11.
- Galati F, Galati A and Massari S (2016) RyR2 QQ2958 Genotype and Risk of Malignant Ventricular Arrhythmias. *Cardiology research and practice* **2016**:2868604.
- George CH, Walters N, Thomas NL, West RR, Lai FA (2006) Arrhythmogenic mutation-linked defects in ryanodine receptor autoregulation reveal a novel mechanism of Ca<sup>2+</sup> release channel dysfunction. *Circulation research* **98**:88-97.
- George CH, Jundi H, Walters N, Thomas NL, West RR and Lai FA (2006) Arrhythmogenic mutation-linked defects in ryanodine receptor autoregulation reveal a novel mechanism of Ca<sup>2+</sup> release channel dysfunction. *Circulation research* **98**:88-97.
- Germann CA and Perron AD (2005) Sudden cardiac death in athletes: a guide for emergency physicians. *The American journal of emergency medicine* **23**:504-509.
- Gladding PA, Evans CA, Crawford J, Chung SK, Vaughan A, Webster D, Neas K, Love DR, Rees MI, Shelling AN and Skinner JR (2010) Posthumous diagnosis of long QT syndrome from neonatal screening cards. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* **7**:481-486.
- Gomes JL (2014) A Morte Súbita Cardíaca, Fundação Portuguesa de Cardiologia.
- Grani C, Chappex N, Fracasso T, Vital C, Kellerhals C, Schmied C, Saguner AM, Trachsel LD, Eser P, Michaud K and Wilhelm M (2016) Sports-related sudden cardiac death in Switzerland classified by static and dynamic components of exercise. *European journal of preventive cardiology* **23**:1228-1236.
- Hammond-Haley M, Patel RS, Providencia R and Lambiase PD (2016) Exercise restrictions for patients with inherited cardiac conditions: Current guidelines, challenges and limitations. *International journal of cardiology* **209**:234-241.
- Haugaa KH, Leren IS, Berge KE, Bathen J, Loennechen JP, Anfinsen OG, Fruh A, Edvardsen T, Kongsgard E, Leren TP and Amlie JP (2010) High prevalence of exercise-induced arrhythmias in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation-positive family members diagnosed by cascade genetic

- screening. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* **12**:417-423.
- Hayashi M, Denjoy I, Extramiana F, Maltret A, Buisson NR, Lupoglazoff JM, Klug D, Hayashi M, Takatsuki S, Villain E, Kamblock J, Messali A, Guicheney P, Lunardi J and Leenhardt A (2009) Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* **119**:2426-2434.
- Hayashi M, Denjoy I, Hayashi M, Extramiana F, Maltret A, Roux-Buisson N, Lupoglazoff JM, Klug D, Maury P, Messali A, Guicheney P and Leenhardt A (2012) The role of stress test for predicting genetic mutations and future cardiac events in asymptomatic relatives of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia probands. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* **14**:1344-1351.
- Imberti JF, Underwood K, Mazzanti A and Priori SG (2016) Clinical Challenges in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Heart, lung & circulation* **25**:777-783.
- Ingles J and Semsarian C (2007) Sudden cardiac death in the young: a clinical genetic approach. *Internal medicine journal* **37**:32-37.
- Kaufenstein S, Kiehne N, Jenewein T, Biel S, Kopp M, König R, Erkapic D, Rothschild M and Neumann T (2013) Genetic analysis of sudden unexplained death: a multidisciplinary approach. *Forensic science international* **229**:122-127.
- Kawamura M, Ohno S, Naiki N, Nagaoka I, Dochi K, Wang Q, Hasegawa K, Kimura H, Miyamoto A, Mizusawa Y, Itoh H, Makiyama T, Sumitomo N, Ushinohama H, Oyama K, Murakoshi N, Aonuma K, Horigome H, Honda T, Yoshinaga M, Ito M and Horie M (2013) Genetic background of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in Japan. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **77**:1705-1713.
- Kawata H, Ohno S, Aiba T, Sakaguchi H, Miyazaki A, Sumitomo N, Kamakura T, Nakajima I, Inoue YY, Miyamoto K, Okamura H, Noda T, Kusano K, Kamakura S, Miyamoto Y, Shiraishi I, Horie M and Shimizu W (2016) Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) Associated With Ryanodine Receptor (RyR2) Gene Mutations- Long-Term Prognosis After Initiation of Medical Treatment. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **80**:1907-1915.
- Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD and Coumel P (1995) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation* **91**:1512-1519.
- Leren IS, Haugaa KH, Edvardsen T, Anfinsen OG, Kongsgard E, Berge KE, Leren TP and Amlie JP (2010) [Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia].

- Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* **130**:139-142.
- Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, van Tintelen JP, Mannens MM, Wilde AA and Ackerman MJ (2009) The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *Journal of the American College of Cardiology* **54**:2065-2074.
- Michaud K, Mangin P and Elger BS (2011) Genetic analysis of sudden cardiac death victims: a survey of current forensic autopsy practices. *International journal of legal medicine* **125**:359-366.
- Mohamed U, Gollob MH, Gow RM and Krahn AD (2006) Sudden cardiac death despite an implantable cardioverter-defibrillator in a young female with catecholaminergic ventricular tachycardia. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* **3**:1486-1489.
- Neubauer J, Haas C, Bartsch C, Medeiros-Domingo A and Berger W (2016) Post-mortem whole-exome sequencing (WES) with a focus on cardiac disease-associated genes in five young sudden unexplained death (SUD) cases. *International journal of legal medicine*.
- Ohno S, Hasegawa K and Horie M (2015) Gender Differences in the Inheritance Mode of RYR2 Mutations in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Patients. *PloS one* **10**:e0131517.
- Oliva A, Grassi VM, Campuzano O, Brion M, Arena V, Partemi S, Coll M, Pascali VL, Brugada J, Carracedo A and Brugada R (2017) Medico-legal perspectives on sudden cardiac death in young athletes. *International journal of legal medicine* **131**:393-409.
- Pflaumer A (2017) Catecholaminergic polymorphic tachycardia: underestimated and overtreated? *Heart (British Cardiac Society)* **103**:889-890.
- Pflaumer A and Davis AM (2012) Guidelines for the diagnosis and management of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Heart, lung & circulation* **21**:96-100.
- Pizzale S, Gollob MH, Gow R and Birnie DH (2008) Sudden death in a young man with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **19**:1319-1321.
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA and Guicheney P (2002) Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation research* **91**:e21-26.
- Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alders M, Lupoglazoff JM, Vaksman G, Dubosq-Bidot L, Sebillon P, Mannens MM, Guicheney P and Wilde AA (2005) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *Journal of medical genetics* **42**:863-870.

- Priori SG, Blomstrom-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekval TM, Spaulding C and Van Veldhuisen DJ (2016) 2015 ESC Guidelines for the Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. *Revista espanola de cardiologia (English ed)* **69**:176.
- Priori SG and Chen SR (2011) Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis. *Circulation research* **108**:871-883.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimone L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A and DeLogu A (2002) Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* **106**:69-74.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G and Tracy C (2013a) Executive summary: HRS/EHRA/APHS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* **10**:e85-108.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G and Tracy C (2013b) HRS/EHRA/APHS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* **10**:1932-1963.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C, Ackerman M, Belhassen B, Estes NA, 3rd, Fatkin D, Kalman J, Kaufman E, Kirchhof P, Schulze-Bahr E, Wolpert C, Vohra J, Refaat M, Etheridge SP, Campbell RM, Martin ET and Quek SC (2013c) Executive summary: HRS/EHRA/APHS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* **15**:1389-1406.
- Rodriguez-Calvo MS, Brion M, Allegue C, Concheiro L and Carracedo A (2008) Molecular genetics of sudden cardiac death. *Forensic science international* **182**:1-12.
- Roston TM, Cunningham TC and Sanatani S (2017a) Advances in the diagnosis and treatment of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Cardiology in the young* **27**:S49-s56.
- Roston TM, Yuchi Z, Kannankeril PJ, Hathaway J, Vinocur JM, Etheridge SP, Potts JE, Maginot KR, Salerno JC, Cohen MI, Hamilton RM, Pflaumer A, Mohammed S,

- Kimlicka L, Kanter RJ, LaPage MJ, Collins KK, Gebauer RA, Temple JD, Batra AS, Erickson C, Mischak-Knecht M, Kubus P, Bar-Cohen Y, Kantoch M, Thomas VC, Hessling G, Anderson C, Young ML, Choi SHJ, Cabrera Ortega M, Lau YR, Johnsrude CL, Fournier A, Van Petegem F and Sanatani S (2017b) The clinical and genetic spectrum of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: findings from an international multicentre registry. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*.
- Sarquella-Brugada G, Campuzano O, Iglesias A, Sanchez-Malagon J, Guerra-Balic M, Brugada J and Brugada R (2013) Genetics of sudden cardiac death in children and young athletes. *Cardiology in the young* **23**:159-173.
- Schwartz PJ, Ackerman MJ, George AL, Jr. and Wilde AA (2013) Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *Journal of the American College of Cardiology* **62**:169-180.
- Semsarian C, Ingles J and Wilde AA (2015) Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *European heart journal* **36**:1290-1296.
- Sen-Chowdhry S and McKenna WJ (2006) Sudden cardiac death in the young: a strategy for prevention by targeted evaluation. *Cardiology* **105**:196-206.
- Siscovick DS PP (2010) Overview of sudden cardiac arrest and sudden cardiac death. *UpToDate*.
- Skinner JR, Duflou JA and Semsarian C (2008) Reducing sudden death in young people in Australia and New Zealand: the TRAGADY initiative. *The Medical journal of Australia* **189**:539-540.
- Stattin EL, Westin IM, Cederquist K, Jonasson J, Jonsson BA, Morner S, Norberg A, Krantz P and Wisten A (2016) Genetic screening in sudden cardiac death in the young can save future lives. *International journal of legal medicine* **130**:59-66.
- Steinberg C, Padfield GJ, Champagne J, Sanatani S, Angaran P, Andrade JG, Roberts JD, Healey JS, Chauhan VS, Birnie DH, Janzen M, Gerull B, Klein GJ, Leather R, Simpson CS, Seifer C, Talajic M, Gardner M and Krahn AD (2016) Cardiac Abnormalities in First-Degree Relatives of Unexplained Cardiac Arrest Victims: A Report From the Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* **9**.
- Sumitomo N, Harada K, Nagashima M, Yasuda T, Nakamura Y, Aragaki Y, Saito A, Kurosaki K, Jouo K, Koujiro M, Konishi S, Matsuoka S, Oono T, Hayakawa S, Miura M, Ushinohama H, Shibata T and Niimura I (2003) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: electrocardiographic characteristics and optimal therapeutic strategies to prevent sudden death. *Heart (British Cardiac Society)* **89**:66-70.
- Swan H, Piippo K, Viitasalo M, Heikkila P, Paavonen T, Kainulainen K, Kere J, Keto P, Kontula K and Toivonen L (1999) Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *Journal of the American College of Cardiology* **34**:2035-2042.

- Tan JH and Scheinman MM (2008) Exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia in adults without structural heart disease. *The American journal of cardiology* **101**:1142-1146.
- Tester DJ and Ackerman MJ (2012) The molecular autopsy: should the evaluation continue after the funeral? *Pediatric cardiology* **33**:461-470.
- Tester DJ, Medeiros-Domingo A, Will ML, Haglund CM and Ackerman MJ (2012) Cardiac channel molecular autopsy: insights from 173 consecutive cases of autopsy-negative sudden unexplained death referred for postmortem genetic testing. *Mayo Clinic proceedings* **87**:524-539.
- Tester DJ, Spoon DB, Valdivia HH, Makielski JC and Ackerman MJ (2004) Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases. *Mayo Clinic proceedings* **79**:1380-1384.
- van der Werf C, Nederend I, Hofman N, van Geloven N, Ebink C, Frohn-Mulder IM, Alings AM, Bosker HA, Bracke FA, van den Heuvel F, Waalewijn RA, Bikker H, van Tintelen JP, Bhuiyan ZA, van den Berg MP and Wilde AA (2012a) Familial evaluation in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: disease penetrance and expression in cardiac ryanodine receptor mutation-carrying relatives. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* **5**:748-756.
- van der Werf C, Zwinderman AH and Wilde AA (2012b) Therapeutic approach for patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: state of the art and future developments. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* **14**:175-183.
- Wang D, Shah KR, Um SY, Eng LS, Zhou B, Lin Y, Mitchell AA, Nicaj L, Prinz M, McDonald TV, Sampson BA and Tang Y (2014) Cardiac channelopathy testing in 274 ethnically diverse sudden unexplained deaths. *Forensic science international* **237**:90-99.
- Wanguemert F, Bosch Calero C, Perez C, Campuzano O, Beltran-Alvarez P, Scornik FS, Iglesias A, Berne P, Allegue C, Ruiz Hernandez PM, Brugada J, Perez GJ and Brugada R (2015) Clinical and molecular characterization of a cardiac ryanodine receptor founder mutation causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* **12**:1636-1643.
- Wilde AA and Behr ER (2013) Genetic testing for inherited cardiac disease. *Nature reviews Cardiology* **10**:571-583.
- Ylanen K, Poutanen T, Hiippala A, Swan H and Korppi M (2010) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *European journal of pediatrics* **169**:535-542.
- Yu TC, Liu AP, Lun KS, Chung BH and Yung TC (2016) Clinical and genetic profile of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in Hong Kong Chinese children. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi* **22**:314-319.
- Zipes DP and Wellens HJ (1998) Sudden cardiac death. *Circulation* **98**:2334-2351.

**Anexo 1:** Classificação dos níveis de evidência e das classes da recomendação, de acordo com escalas predefinidas pelos especialistas de sociedade europeia de cardiologia, para o diagnóstico, estratificação de risco e tratamento da TVPC.

Classes de recomendações		
Classes de recomendações	Definição	Terminologia a utilizar
<b>Classe I</b>	Evidência e/ou consenso geral de que determinado tratamento ou intervenção é benéfico, útil e eficaz.	É recomendado /é indicado
<b>Classe II</b>	Evidências contraditórias e/ou divergências de opiniões sobre a utilidade/eficácia de determinado tratamento ou intervenção.	
<i>Classe IIa</i>	<i>Peso da evidência/opinião maioritariamente a favor da utilidade/eficácia.</i>	<i>Deve ser considerado</i>
<i>Classe IIb</i>	<i>Utilidade/eficácia pouco comprovada pela evidência/opinião.</i>	<i>Pode ser considerado</i>
<b>Classe III</b>	Evidências ou consenso geral de que determinado tratamento ou intervenção não é útil/eficaz e que poderá ser prejudicial em certas situações.	Não é recomendado

Níveis de evidência	
<b>Nível de Evidência A</b>	Informação recolhida a partir de vários ensaios clínicos aleatorizados ou de meta-análises.
<b>Nível de Evidência B</b>	Informação recolhida a partir de um único ensaio clínico aleatorizado ou estudos alargados não aleatorizados.
<b>Nível de Evidência C</b>	Opinião consensual dos especialistas e/ou pequenos estudos, estudos retrospectivos e registos.

**Anexo 2:** Documento entregue aos participantes com informação acerca estudo que se pretendia realizar, dos seus objetivos, métodos e benefícios previstos.

## Informação ao Participante

### 1. IDENTIFICAÇÃO DO ESTUDO

#### a. Designação do estudo

Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e expressão do gene RyR2

#### b. Investigadora Responsável

Ana Beatriz Carneiro Abreu

#### c. Entidade Promotora

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

#### d. Descrição e Objetivo do Estudo

A morte súbita cardíaca é definida como uma morte inesperada, devido a patologia cardíaca, que ocorre dentro de um curto período de tempo a partir do início de quaisquer sintomas relacionados ao coração em uma pessoa com ou sem doença cardíaca pré-existente conhecida.

Estudos genéticos tem vindo a mostrar que algumas das patologias cardíacas, que levam à morte súbita em jovens, são devidas a anomalias genéticas, onde se inclui a taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica.

A taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica é uma doença hereditária que é estimulada pela prática de exercício físico ou por emoções extenuantes e causada por movimentações intracelulares anormais de  $Ca^{2+}$  no tecido cardíaco resultante de mutações no gene RyR2.

Uma vez que estas anomalias genéticas podem ser responsáveis por 30-50% das mortes, em jovens até aos 40 anos de idade, será objetivo desta investigação a análise de possíveis mutações no gene RyR2 numa população de jovens-adultos, com idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos, residentes no norte de Portugal e que pratiquem exercício físico regularmente.

#### e. Métodos do Estudo

A recolha de amostras será realizada através um método rápido, indolor e não invasivo, que consiste na utilização de uma zaragatoa para recolher algumas células da mucosa bucal. Posteriormente as amostras colhidas passarão por processos de extração, quantificação, amplificação e sequenciação do material genético para que possamos analisar os possíveis polimorfismos do gene RyR2.

## **2. CARÁCTER VOLUNTÁRIO DA PARTICIPAÇÃO**

- I.** Esta investigação é de carácter voluntário e não serão atribuídas quaisquer renumerações para a participação;
- II.** O voluntário terá toda a liberdade para decidir se aceita ou não participar podendo refletir sobre o pedido de participação e inclusive poder ouvir opinião de familiares e/ou amigos;
- III.** Existe a possibilidade do participante saber o resultado do teste genético tendo para tal de manifestar essa intenção em local apropriado na Folha de Consentimento informado, esclarecido e livre.

## **3. APROVAÇÃO DO ESTUDO**

Esta investigação foi submetida a aprovação pela Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar S. João – EPE.

**Anexo 3:** *Template* do Consentimento informado, esclarecido e livre entregue a todos os participantes deste estudo.

## Consentimento informado, esclarecido e livre

### Designação do estudo

**Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e expressão do gene RyR2**

*Confirmando que expliquei ao participante a investigação referida, de forma adequada e compreensível, e os benefícios e riscos associadas à sua realização.*

Informação escrita em anexo:  Não  Sim (Nº de páginas: 2)

**A Investigadora responsável**

Nome: **Ana Beatriz Carneiro Abreu**

\_\_\_\_\_ *assinatura*

### Identificação do participante

Nome: \_\_\_\_\_

BI/CC nº: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Telemóvel: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

#### Participante

· Compreendi a explicação que me foi facultada acerca do estudo que se tenciona realizar: os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto.

· Solicitei todas as informações de que necessitei, sabendo que o esclarecimento é fundamental para uma boa decisão.

· Fui informado da possibilidade de livremente recusar a participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na assistência que é prestada.

Concordo com a participação neste estudo, de acordo com os esclarecimentos que me foram prestados, no documento do qual me foi entregue uma cópia, e **pretendo**  ou **não pretendo**  ser informado acerca do resultado do teste genético.

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

\_\_\_\_\_ *assinatura*

## **Anexo 4:** Documento com a aprovação do estudo pela Comissão de Ética para a saúde do Hospital São João.

### **Comissão de Ética para a Saúde do HSJ Parecer**

**Projeto de investigação:** “Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e expressão do gene RyR2”.

**Promotor:**

- Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

**Concepção e pertinência do estudo**

- Trata-se de um estudo a realizar no âmbito do Mestrado em Ciências Forenses na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), que tem como objetivo a análise da expressão e de possíveis mutações no gene RyR2 numa população portuguesa com idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos.
- O estudo terminará em agosto de 2017 e será financiado por verbas provenientes do Mestrado em Ciências Forenses.
- Um grupo de 50 indivíduos será previamente seleccionado segundo os seguintes critérios de inclusão: 1) idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos; 2) que realizem actividade física rotineira; uma amostra de sangue será colhida (picada de um dedo) e transportada em cartões FTA<sup>®</sup> para que posteriormente se possa extrair, purificar e amplificar o material genético (DNA – PCR em tempo real; gene que codifica os RyR2 receptors).
- O estudo é pertinente, muito importante e está muito bem fundamentado.
  - Os critérios de inclusão e de exclusão estão suficientemente detalhados; *no entanto, não consta no protocolo submetido à CES a origem da população a ser recrutada para o estudo e também não consta que procedimentos vão ser seguidos caso seja identificada uma mutação no gene RyR2, pois como bem descrito na introdução está associado a morte súbita (constará na Folha de Informação ao Participante se este querera saber o resultado do seu teste genético?)*.
- A Investigadora Principal, Ana Beatriz Carneiro Abreu, Licenciada em Biologia (com Pós-Graduação em Antropologia Forense e a frequentar o Mestrado em Ciências Forenses na FMUP, dispõe das competências técnicas e científicas para a realização do estudo [Orientadora da Dissertação: Professora Laura Cainé (FMUP); Co-orientadores: Professor Agostinho Santos (FMUP); Benedita Abreu Silva (Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses)].

- O estudo será realizado no Serviço de Genética e Ciências Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses da Delegação do Norte que dispõe das condições necessárias para a realização do estudo, mas não está referenciado no protocolo submetido à CES a autorização do Diretor de Serviço.
- **Benefício/Risco**
  - Dada a natureza do estudo não haverá benefícios, riscos ou incómodos (para além de uma colheita de sangue por picada de um dedo) para o participante no estudo.
- **Respeito pela liberdade e autonomia do sujeito do ensaio**

Dada a hipótese do estudo genético em causa poder identificar indivíduos em risco de morte súbita deve figurar na folha do consentimento a possibilidade do participante querer saber ou não o resultado do teste e caso seja positiva a presença da mutação que orientação está preconizada.
- **Confidencialidade dos dados**

A confidencialidade dos dados está garantida.
- **Indemnização por danos**

Não aplicável.
- **Continuação do tratamento**

Não aplicável.
- **Propriedade dos dados**

Não aplicável.

#### **Conclusão**

Em face da análise do protocolo do estudo “Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica e expressão do gene RyR2”, proponho a sua aprovação pela CES do HSJ/FMUP, após a obtenção de respostas às questões formuladas em sublinhado e em itálico.

Porto, 17 de junho de 2016

O Relator  
Prof. Manuel Vaz Silva

