

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
RESUM	XV
PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL.....	XVI
CAPÍTULO I: DESARROLLO DE EOSAL-CNV PARA LA DETECCIÓN DE CNV EN EL GEN <i>DMD</i>	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Distrofia muscular de Duchenne (DMD).....	3
1.1. Manifestaciones clínicas y evolución.....	4
1.2. Gen <i>DMD</i>	4
1.3. Alteraciones genéticas en el gen <i>DMD</i>	6
1.4. Herencia de la distrofia muscular de Duchenne.....	9
1.5. Tratamiento de la enfermedad y terapias innovadoras.....	9
2. Diagnóstico de la enfermedad distrofia muscular de Duchenne (DMD)	14
3. EOSAL–CNV para la detección de CNV mediante análisis de fragmentos.....	19
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
4. Muestras	28
5. Extracción de ADN	28
6. Diseño de cebadores	29
7. Optimización de la PCR EOSAL–CNV para el gen <i>DMD</i>	30
8. Electroforesis capilar	33
9. Análisis de los resultados.....	34
RESULTADOS	38
10. Diseño de cebadores.....	39
11. Optimización de la PCR EOSAL–CNV para el gen <i>DMD</i>	46
11.1. Establecimiento del <i>pool</i> de cebadores óptimo.....	46
11.2. Elección de la ADN polimerasa	51
11.3. Concentración e integridad del ADN	54
12. Validación del método EOSAL–CNV en muestras clínicas	55
12.1. Integridad del ADN en la validación clínica	62

DISCUSIÓN	66
13. Motivación del estudio	67
14. Desarrollo y optimización de la tecnología	68
15. Ventajas y limitaciones de la tecnología EOSAL-CNV para el gen <i>DMD</i>	69
16. Aplicabilidad futura y líneas de mejora.....	71
CONCLUSIONES	73
CAPÍTULO II: DESARROLLO DE LA TÉCNICA EOSAL-NGS.....	75
INTRODUCCIÓN	76
17. Alteraciones genéticas en cáncer.....	77
18. Gen <i>TP53</i>	78
18.1. Importancia del gen <i>TP53</i> en la leucemia linfocítica crónica (LLC).....	79
19. Secuenciación Sanger.....	80
20. Secuenciación de nueva generación (NGS)	81
20.1. Secuenciación Illumina.....	85
20.1.1 Paneles génicos mediante secuenciación Illumina	88
OBJETIVOS	90
MATERIAL Y MÉTODOS.....	93
21. Muestras	94
22. Extracción de ADN	94
23. Diseño de cebadores.....	94
24. Optimización de la PCR en dos pasos para el panel de <i>TP53</i>	95
24.1. Optimización de la PCR1 en el protocolo de dos pasos de PCR	96
24.2. Optimización de la PCR2 en el protocolo de dos pasos de PCR	97
25. Optimización de la PCR en un solo paso (EOSAL-NGS).....	98
26. Control de calidad de las librerías	99
27. Secuenciación Illumina	99
28. Análisis bioinformático	100
RESULTADOS	101
29. Diseño de cebadores.....	102
30. Optimización del panel de <i>TP53</i> en dos reacciones de PCR	105
30.1. Optimización de las condiciones de PCR	106
30.2. Optimización de la concentración de los cebadores en los <i>pools</i> A y B.....	107
30.3. Optimización de la concentración de molde de ADN en PCR	109
31. Optimización de la tecnología EOSAL-NGS.....	110
31.1. ADN polimerasas	111
31.2. Concentración del set 1 y 2 de cebadores	115
31.3. Aditivos	117
31.4. Programa de PCR	121

32.	Validación clínica en muestras de Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)	123
33.	Certificación de calidad en los programas EMQN	127
DISCUSIÓN		129
34.	Motivación del estudio	130
35.	Desarrollo y optimización de la tecnología	130
36.	Ventajas y limitaciones de la tecnología EOSAL-NGS	132
37.	Aplicabilidad futura y líneas de mejora.....	133
CONCLUSIONES		134
CONCLUSIONES GENERALES		136
REFERENCIAS		138
ANEXOS		155