

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	4
LISTADO DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	9
1. La enfermedad de Wilson (EW)	11
1.1 Aspectos clínicos	12
1.1.1 Enfermedad hepática	12
1.1.2 Enfermedad neurológica y psiquiátrica	12
1.1.3 Otras manifestaciones clínicas.....	13
1.2 Métodos diagnósticos.....	14
1.3 Tratamiento y pronosis	19
2. <i>ATP7B</i> , gen implicado en la enfermedad de Wilson	21
2.1 Genética de <i>ATP7B</i>	22
2.2 Papel de <i>ATP7B</i> en la homeostasis del cobre en los hepatocitos	24
2.3 Efecto de mutaciones en <i>ATP7B</i> sobre su función.....	26
2.4 Patogénesis de la toxicidad por cobre	27
3. Epidemiología clínica y genética	28
4. Factores modificadores de la enfermedad de Wilson	30
5. Biomarcadores.....	33
5.1 Biomarcadores en la enfermedad de Wilson y fenotipos relacionados	33
5.2 Potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores	37
CAPÍTULO I: ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN GENÉTICA EN PACIENTES CON FENOTIPO CLÍNICO DE EW . 41	
Hipótesis y Objetivos del Capítulo I	43
Resultados	45
1. Cribado mutacional de <i>ATP7B</i> y otros genes implicados en enfermedades hepáticas relacionadas	45
1.1 Serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’ Elx.....	46
1.1.1 Variantes identificadas en <i>ATP7B</i> mediante secuenciación directa y MLPA	47
1.1.2 Estudio completo del gen <i>ATP7B</i> mediante enriquecimiento dirigido y secuenciación masiva .	49
1.1.3 Secuenciación de exoma	53
1.1.4 Resultados globales de la serie	55
1.2 Cribado mutacional en pacientes de diferentes series.....	56
2. Estudios funcionales de expresión y regulación de variantes en <i>ATP7B</i>	60
2.1 Caracterización de variantes de <i>splicing</i> en mRNA de sangre periférica y mediante ensayo de minígenos	60
2.2 Análisis de expresión de variantes en la región promotora.....	64
3. Análisis de modificadores genéticos.....	65
3.1 Cribado mutacional en genes implicados en el metabolismo del cobre	66
3.1.1 Correlación genotipo-fenotipo	67
3.2 Cribado mutacional en otros genes asociados a patología	69
3.2.1 Caracterización funcional de LMNA p.R419C en fibroblastos	70
Discusión	79
Conclusiones.....	97

CAPÍTULO II: BÚSQUEDA DE miRNAs CIRCULANTES EN PLASMA COMO BIOMARCADORES EN LA EW	99
Hipótesis y Objetivos del Capítulo II	101
Resultados.....	103
1. Características de las poblaciones de estudio	103
2. Determinación de miRNAs circulantes en plasma mediante miRNA-seq	105
2.1 Análisis primario	105
2.2 Análisis de representación diferencial.....	106
2.3 Caracterización mediante enriquecimiento funcional	108
3. Perfil de miRNAs circulantes candidatos en plasma como biomarcadores	109
3.1 Primera cohorte de investigación.....	110
3.2 Segunda cohorte de validación	115
Discusión	119
Conclusiones	131
MATERIAL Y MÉTODOS	133
1. Sujetos del estudio	135
1.1 Serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d'Elx	135
1.2 Otros pacientes estudiados	135
1.3 Obtención de DNA genómico desde muestra biológica	136
2. Análisis mutacional del gen <i>ATP7B</i> y otros genes implicados en enfermedades hepáticas relacionadas	137
2.1 Estudios genéticos basados en secuenciación directa (Sanger) y MLPA	137
2.1.1 Diseño de <i>primers</i> para amplificación por PCR y secuenciación directa	137
2.1.2 Estudio de la dosis génica mediante MLPA	138
2.2 Estudios genéticos basados en técnicas NGS	138
2.2.1 Análisis de <i>ATP7B</i> mediante enriquecimiento dirigido y secuenciación masiva	138
2.2.2 Secuenciación de exoma	139
2.3 Análisis bioinformáticos	140
2.3.1 Análisis de las secuencias obtenidas mediante secuenciación directa (Sanger)	140
2.3.2 Identificación de variantes en número de copia (CNVs) mediante análisis de fragmentos	140
2.3.3 <i>Pipeline</i> para análisis primario de datos de secuenciación masiva de <i>ATP7B</i>	141
2.3.4 <i>Pipeline</i> para anotación de variantes identificadas en secuenciación masiva	142
2.3.5 Filtrado, priorización e interpretación de variantes.....	143
3. Caracterización funcional de variantes en <i>ATP7B</i>	145
3.1 Cultivos celulares.....	145
3.2 Análisis de la expresión de variantes de <i>splicing</i> en mRNA de pacientes	146
3.3 Análisis de la expresión de variantes de <i>splicing</i> mediante ensayo de minigenes	146
3.4 Ensayo de la actividad luciferasa de variantes en la región promotora	147
4. Análisis de modificadores genéticos	148
4.1 Secuenciación de exoma y análisis bioinformáticos.....	148
4.2 Cribado mutacional de genes y variantes candidatas mediante secuenciación directa	148
4.3 Estudios funcionales para la caracterización de LMNA p.R419C.....	149
4.3.1 Cultivos celulares.....	149
4.3.2 Inmunofluorescencia.....	149
4.3.3 Tratamiento con H ₂ O ₂ y ensayo de viabilidad	150
4.3.4 Estudio de la respiración y producción de H ₂ O ₂ mitocondrial	150
4.3.5 Análisis de expresión de genes con función antioxidante mediante PCR cuantitativa (qPCR) ..	152

5. Estudio de miRNAs circulantes en plasma	153
5.1 Población de estudio.....	153
5.2 Extracción de RNA total circulante	154
5.3 Preparación de librerías de small-RNA y secuenciación masiva	154
5.4 Análisis bioinformáticos	156
5.4.1 Análisis primario	156
5.4.2 Análisis de representación diferencial y enriquecimiento funcional	157
5.5 Validación de miRNAs circulantes en plasma mediante qPCR.....	157
5.6 Análisis estadísticos	159
ANEXOS	161
BIBLIOGRAFÍA	183

LISTADO DE FIGURAS

Figura I1: Cronología de contribuciones clave en el conocimiento de la EW	11
Figura I2: Anillo de Kayser-Fleischer (K-F).....	13
Figura I3: Histología en muestra de biopsia de hígado en pacientes con la EW.....	17
Figura I4: Resonancia Magnética Nuclear (RMN) cerebral en pacientes con la EW.....	18
Figura I5: Representación esquemática de los dominios de ATP7B.....	21
Figura I6: Ciclo catalítico de ATP7B.....	22
Figura I7: Distribución del cobre en el hepatocito.....	25
Figura I8: Distribución geográfica de mutaciones prevalentes en <i>ATP7B</i>	30
Figura I9: Esquema de la biogénesis de los miRNAs en la célula.....	38
Figura R1.1: Colección de muestras para estudio genético de la EW y su distribución según el lugar de procedencia de la muestra.....	45
Figura R1.2: Perfil al diagnóstico de los pacientes reclutados en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’ Elx.....	46
Figura R1.3: Variantes patológicas (P) y probablemente patológicas (PP) caracterizadas en <i>ATP7B</i> mediante secuenciación directa y MLPA en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’ Elx.....	48
Figura R1.4: Familias con tres variantes detectadas en <i>ATP7B</i>	48
Figura R1.5: Caracterización de la delección en el cromosoma 13 detectada en EW24 mediante secuenciación masiva.....	51
Figura R1.6: Variantes identificadas en fEW-12 mediante diferentes estrategias de análisis genético de <i>ATP7B</i> (secuenciación directa y masiva).....	52
Figura R1.7: Familias investigadas mediante secuenciación de exoma.....	53
Figura R1.8: Análisis de las variantes identificadas en <i>CCDC115</i>	55
Figura R1.9: Resumen del análisis genético de <i>ATP7B</i> en los 25 casos índice de la serie clínica H. U. Insular Materno-Infantil – H. U. de Gran Canaria Dr. Negrín.....	56
Figura R1.10: Resumen del estudio genético de <i>ATP7B</i> realizado en 27 casos índice procedentes de diferentes centros hospitalarios.....	58
Figura R1.11: Casos singulares con diagnóstico genético de la EW.....	59
Figura R1.12: Análisis de transcritos de variantes de <i>splicing</i>	61
Figura R1.13: Análisis del cambio c.2447+1G>T.....	62
Figura R1.14: Análisis de c.2865+467A>G.....	63
Figura R1.15: Análisis <i>in vitro</i> de la variante c.-447C>T.....	65
Figura R1.16: Familias con mutaciones patológicas en <i>ATP7B</i> estudiadas mediante secuenciación de exoma para el análisis de modificadores genéticos.....	65
Figura R1.17: Distribución de variantes identificadas en 65 genes relacionados en el metabolismo del cobre.....	66
Figura R1.18: Análisis de la variante p.R419C identificada en LMNA.....	70
Figura R1.19: Análisis de la morfología nuclear en fibroblastos portadores de LMNA p.R419C.....	71
Figura R1.20: Evaluación del efecto de H ₂ O ₂ en la viabilidad celular de fibroblastos portadores de LMNA p.R419C.....	72
Figura R1.21: Análisis del perfil de consumo de O ₂ (OCR) y producción de H ₂ O ₂ de fibroblastos LMNA p.R419C en célula intacta.....	74

Figura R1.22: Análisis del perfil de consumo de O ₂ (OCR) y producción de H ₂ O ₂ de fibroblastos LMNA p.R419C en célula permeabilizada.....	76
Figura R1.23: Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo en fibroblastos LMNA p.R419C mediante PCR cuantitativa (qPCR)	77
Figura R2.1: Control del procesamiento de lecturas obtenidas mediante miRNA-seq en las 40 muestras de la primera cohorte de investigación.	106
Figura R2.2: Concordancia de miRNAs maduros detectados en muestras de plasma de pacientes entre las cuatro estrategias de análisis de representación diferencial.	107
Figura R2.3: Validación del perfil de miRNAs circulantes en plasma mediante PCR cuantitativa (qPCR) en muestras de la primera cohorte de investigación.	111
Figura R2.4: Evaluación del rendimiento de los modelos de regresión logística simple para predecir el riesgo de progresión hepática.....	114
Figura R2.5: Validación del perfil de miRNAs circulantes en plasma mediante PCR cuantitativa (qPCR) en muestras de la segunda cohorte de validación.	117
Figura M1: Esquema del protocolo de NEBNext para preparación de librerías de small-RNA.	155

LISTADO DE TABLAS

Tabla I1: Escala diagnóstica desarrollada en la 8ª Reunión Internacional sobre la EW	19
Tabla I2: Tipos de variantes descritas en <i>ATP7B</i> y su frecuencia.	23
Tabla R1.1: Evaluación de la cobertura, enriquecimiento y <i>variant calling</i> de la herramienta NGS.....	49
Tabla R1.2: Regiones con cobertura <20x en <i>ATP7B</i>	50
Tabla R1.3: Haplotipo del locus <i>ATP7B</i> construido con los SNPs detectados en el cribado mutacional de los pacientes de la familia fEW-60.	53
Tabla R1.4: Predicción <i>in silico</i> de <i>ATP7B</i> c.-447C>T	64
Tabla R1.5: Variantes candidatas en genes del metabolismo del cobre relacionados con <i>ATP7B</i>	67
Tabla R1.6: Resultado del cribado mutacional en 12 pacientes seleccionados y su descripción clínica	68
Tabla R1.7: Otras variantes detectadas en la ampliación del cribado mutacional en genes implicados en el metabolismo del cobre relacionados con <i>ATP7B</i>	69
Tabla R2.1: Características clínicas y demográficas de los grupos de pacientes.	103
Tabla R2.2: Características demográficas de los grupos de individuos control.....	105
Tabla R2.3: miRNAs maduros significativamente desregulados en plasma de pacientes mediante el método QLF en los diseños 1 y 2.....	108
Tabla R2.4: Rutas de señalización y otros procesos biológicos de interés significativamente desregulados por los 18 miRNAs sobrerrepresentados en el grupo de pacientes de la primera cohorte de investigación.....	109
Tabla R2.5: Parámetros de los modelos de regresión logística para predecir el riesgo de progresión hepática.	113
Tabla M1: Filtros de calidad aplicados a variantes de tipo SNPs y a pequeñas inserciones/deleciones (<i>indels</i>)	142
Tabla M2: Parámetros utilizados para el alineamiento con Bowtie de lecturas de 16-28 pb frente a miRNAs precursores.....	156
Tabla M3: Sondas <i>TaqMan Advanced</i> utilizadas para la validación de miRNAs circulantes mediante qPCR	158