



Estudio clínico y molecular de la enfermedad de Wilson en pacientes cubanos

ENTIDADES EJECUTORAS PRINCIPALES: Centro Nacional de Genética Médica, Instituto Nacional de Gastroenterología, Universidad de Guantánamo

Entidades ejecutoras participantes: Universidad de La Habana; Hospitales Universitarios Borrás Marfán, Hospital 10 de Octubre; Delegación territorial del CITMA, Guantánamo

Otras entidades: Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN); Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

AUTORES PRINCIPALES: Yulia Clark Feoktistova¹, Caridad Ruenes Domech², Hilda Roblejo Balbuena³

Otros autores: Georgina Espinosa López⁴, Elsa F. García Bacallao², Carlos Castañeda Guillot², Trini Fragoso Arbelo⁵, Estela Morales Peralta⁶, Teresa Collazo Mesa⁵, Liudmila Feoktistova¹, Iliana Clark Feoktistova⁷

Colaboradores: Julio Raúl Fernández Massó, Felicia Pomar Montalvo, Carlos Maragoto Rizo, Antonio Alejandro Esperón, Lídice Reyes Navarro

Filiación: ¹Universidad de Guantánamo (UG). ²Instituto Nacional de Gastroenterología (ING). ³Centro Nacional de Genética Médica (CNGM). ⁴Universidad de La Habana (UH). ⁵Hospital Pediátrico Universitario Borrás Marfán. ⁶Hospital 10 de Octubre. ⁷Delegación Territorial del CITMA

RESUMEN

Palabras clave

estudio clínico; estudio molecular; enfermedad de Wilson; Cuba

La enfermedad de Wilson (EW) presenta una expresión clínica muy variable, lo cual, contribuye a las dificultades en el diagnóstico clínico y se requiere entonces del estudio molecular. El objetivo general fue establecer el diagnóstico clínico y molecular de la enfermedad de Wilson en Cuba. El problema científico está dado por la ausencia del diagnóstico molecular para los pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la EW. La imposibilidad de realizar la correlación entre el genotipo y el fenotipo, así como, la falta de una estrategia de trabajo a seguir en Cuba para el estudio molecular. Por primera vez en Cuba se analizaron 154 individuos que incluyen a los enfermos y a los familiares. Se introdujeron las tecnologías para el diagnóstico molecular de EW. Se detectaron las mutaciones en los pacientes cubanos con esta enfermedad y se caracterizaron molecularmente 75 alelos. Se determinaron los polimorfismos de un solo nucleótido en el 100 % de los pacientes, familiares y controles negativos. Se estudió la correlación entre genotipo y el fenotipo. Se implementó y se generalizó una estrategia racional para el diagnóstico clínico y molecular, que puede servir a otras poblaciones con ascendencia genética similar a la de Cuba. Este es el segundo país de América Latina que realiza los estudios moleculares a más de 100 pacientes con diagnóstico presuntivo de EW. Es el primer país con cobertura nacional para el estudio clínico y molecular de los pacientes

con la EW en América Latina. Por primera para la ciencia se identificaron tres mutaciones nuevas, hubo relación entre la concentración de cobre en orina y el tipo de mutación. Estos resultados se han publicado en un total de 19 artículos, que han alcanzado en total 90 citas. Se escribió el capítulo de un libro. Hay dos publicaciones en fase de revisión por el cuerpo editorial de la revista *Biometales* y la revista *Gastroenterología de México*. Han permitido la formación de un máster, un doctor y dos especialistas en Gastroenterología. Los resultados son avalados por cuatro premios nacionales y uno internacional. Se obtuvieron seis reconocimientos por resultados científico-técnicos avalados por el Ministerio de Salud Pública. Se participó en 20 eventos que incluyen provinciales, nacionales e internacionales.

La enfermedad de Wilson (EW) se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo. La causa molecular que la provoca son las mutaciones en el gen *ATP7B*. Esta enfermedad representa un problema de salud en Cuba.

El objetivo general fue establecer y generalizar la estrategia para el diagnóstico clínico y molecular de la EW en Cuba. Fueron otros objetivos los siguientes:

- Clasificar a los pacientes según sus manifestaciones clínicas.
- Determinar las mutaciones y los polimorfismos en el gen *ATP7B* y sus frecuencias alélicas en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de EW.
- Relacionar el genotipo y el fenotipo en los pacientes cubanos donde se determina la causa molecular de la EW.
- Predecir el impacto de las mutaciones que provocan el cambio de un aminoácido por otro en la proteína *ATP7B*.

Clasificación de los pacientes según sus manifestaciones clínicas

Los especialistas realizaron la clasificación de las manifestaciones clínicas en los pacientes: hepáticas (77), neurológicas y psiquiátricas (11), mixtas (11) y asintomáticas (9). se realizó el diagnóstico clínico por el método propuesto por Ferenci y cols¹.

Análisis de las mutaciones en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la EW

El estudio molecular en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la EW se realiza desde el año 2003 en Cuba, aunque hay un estudio previo donde se determinan las mutaciones en dos pacientes cubanos². Se identificaron un total de 15 mutaciones, tres de ellas descritas por primera vez para la ciencia. La mutación más frecuente en la muestra estudiada fue la p.H1069Q³. Se detectaron 12 mutaciones en los seg-

mentos de transmembranas, dos en el lazo de unión al ATP y una en el dominio Cu1. La segunda y tercera mutación más frecuente fue p.E646D y p.V978A.

La cuarta mutación más frecuente en esta investigación fue la variante p.L708P⁴. El 100 % de los individuos que presentaron esta variante sus ancestros provenían de las Islas Canarias. La mutación p.N41S se identificó por primera vez, en Brasil, en un paciente, el genotipo fue p.N41S/c.3402delC⁵. En Cuba se muestra la mayor frecuencia de esta variante⁶.

Por primera vez en Cuba se hallaron 16 heterocigóticos compuestos; de ellos, nueve genotipos no se figuraron en la literatura internacional. Se detectó un homocigótico para la variante p.H1069Q/p.H1069Q y 37 heterocigóticos. Los resultados de este trabajo confirmaron la heterogeneidad de las mutaciones en los pacientes con la EW, similar a otras poblaciones^{7,8}.

Relación genotipo-fenotipo

El diagnóstico clínico y el molecular permitieron la realización de la correlación genotipo-fenotipo por primera vez en Cuba. El 82 % de los pacientes donde se hallaron las mutaciones responsables de la EW presentaron manifestaciones hepáticas, y el 18 % tuvieron manifestaciones neurológicas y mixtas (hepáticas y neurológicas).

El 66,7 % y el 80 % de los pacientes que presentaron las mutaciones c.2304insC y c.3402delC respectivamente tuvieron el inicio de la enfermedad antes de los 15 años. Estas variantes provocan el corrimiento del marco abierto de lectura y, en consecuencia, se interrumpe la síntesis de la proteína *ATP7B*. Los pacientes cubanos que presentaron estas mutaciones se diagnosticaron de manera precoz.

Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las concentraciones del cobre en orina y el tipo de mutación, con un nivel de $p < 0,002$. Por primera vez para la ciencia se detectó que los pacientes que tuvieron la combinación de mutaciones con cambio de sentido y deleciones presentaron mayor concentración de cobre en orina recolectada

en 24 h que los que presentan solamente las mutaciones con cambio de sentido.

Estudio molecular en las familias cubanas

La prevención es esencial en el análisis de los pacientes con la EW. El estudio familiar incorporando la herramienta molecular fue un elemento novedoso. En la presente investigación se concluyó el diagnóstico molecular en el 71,4 % de las familias analizadas. Se detectaron 6 individuos portadores; estos se consideraron en un principio como enfermos y con el estudio molecular se conoció su verdadera condición. En el estudio familiar se hallaron dos pacientes asintomáticos, y después del estudio molecular se confirma uno y que el otro es portador. Los pacientes asintomáticos tienen consultas periódicas de control para instaurar el tratamiento precoz (prevención) cuando comiencen los síntomas.

Análisis de los polimorfismos en el gen *ATP7B* en los pacientes cubanos

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son herramientas fundamentales para ofrecer el diagnóstico molecular. Por primera vez en Cuba se identificaron cinco polimorfismos: p.L456V, p.K832R c.2448-25G>A, p.T991T y p.A1140V⁹⁻¹⁴, los cuales permitieron construir los haplotipos y relacionar con las mutaciones en las familias afectadas.

Bioinformática

El análisis bioinformático en este estudio fue crucial para el entendimiento del efecto que causa las mutaciones identificadas en el gen *ATP7B* en la proteína. El programa Polyphen-2 predijo la probabilidad de: cinco mutaciones pueden provocar daño muy probable a la proteína *ATP7B*, dos variantes pueden inducir un daño posible a la proteína y dos mutaciones se clasificaron como benignas. Hubo correspondencia entre el resultado del programa bioinformático y las pruebas del laboratorio realizadas en otras poblaciones¹⁵.

Estrategia molecular para el diagnóstico de la EW en Cuba

Se propuso y se implementó una estrategia racional que posibilita de forma integrada y eficaz diagnóstico clínico y molecular de los pacientes cubanos con la EW.

Aportes y novedad científica

Fueron publicados 19 artículos: 13 artículos originales, 4 revisiones bibliográficas y 2 resúmenes de eventos, los cuales alcanzaron 90 citas. Las publicaciones internacionales indexadas en Scopus y Web of Science fueron *European J Hu-*

man Genetics (FI: 3,636), *Acta Pediátrica Española* (FI: 0,10), *Medicc Review* (FI: 1,18), *Revista Gastroenterología de México* (FI: 0,338).

Se detectaron 12 variantes descritas en diferentes poblaciones y se encontraron tres mutaciones informadas en el mundo por primera vez. Es la primera investigación que introduce el diagnóstico molecular de la EW en Cuba. Se describe la relación entre el genotipo y el fenotipo y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las concentraciones de cobre en orina y el tipo de mutación. Es el primer estudio donde se diseña la estrategia racional para el diagnóstico clínico y molecular de la EW en Cuba y puede servir como guía para otras poblaciones con ascendencia genética similar al de la población cubana.

Se mostraron cambios conformacionales en todos los exones que se seleccionaron del gen *ATP7B*, y las mutaciones, conocidas y de nueva aparición, en la población cubana. Se evidenció gran heterogeneidad de las mutaciones. Se estableció la relación entre el tipo de mutación y la edad de inicio de los síntomas en los pacientes con diagnóstico presuntivo de esta enfermedad.

Los resultados de esta investigación permitieron perfeccionar los procedimientos para el diagnóstico diferencial de la EW en Cuba. Se realizó la introducción de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de la EW. Se confirmaron las mutaciones p.H1069Q y c.3402delC descritas con anterioridad en pacientes cubanos. Se realizó el estudio molecular en las familias, que constituyó la piedra angular para el asesoramiento genético, necesario en la práctica médica. Se diseñó la estrategia racional para el diagnóstico clínico y molecular de la EW en Cuba. Se realizó el diagnóstico precoz, la identificación de los portadores, de los asintomáticos y de los pacientes, con lo cual, al instaurarse el tratamiento temprano, mejoró la calidad de vida de los enfermos. Cuba se convierte en el tercer país latinoamericano que establece el diagnóstico molecular de la EW y es el primero con cobertura nacional en América Latina.

Referencias bibliográficas

1. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, Schilsky M, Cox D, Berr F. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* 2003; 23: 139-142.
2. Ha-Hao D, Hefter H, Stremmel W, Castañeda C, Hernández A, Cox D and Auburger G. His1069Gln and six novel Wilson disease mutations: analysis of relevance for early diagnosis and phenotype. *European Journal of Human Genetics* 1998; 6: 616-623.
3. Iark Y, Ruenes C, García E, Fragoso T, Robaina Z, Roblejo H, Piloto Y, Maragoto C, García I, Reyes L, Castañeda C. Estudio molecular de la enfermedad de Wilson en pacientes cubanos. *Acta Pediatr Esp* 2011; 69 (supl): S23.

4. Clark Y, Collazo T, Ruenes C, García E, Robaina Z, Fragoso T et al. Detección de cambios conformacionales y mutaciones en el exón 8 del gen ATP7B en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson. *Revista Biotecnología Aplicada*. 2011; 28: 87-90.
5. Deguti MM, Genschel J, Cancado LR, Barbosa E, Bochow B, Mucenic M et al. Wilson Disease: Novel Mutations in the ATP7B Gene and Clinical Correlation in Brazilian Patients. *Human Mutation. Mutation in Brief* 2004; 698.
6. Clark Y, Collazo T, Ruenes C, García EF, Robaina Z, Fragoso T. Análisis molecular del exón 2 del gen ATP7B en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson. *Revista Habanera Ciencias Médicas*. 2011; 10(3): 281-286.
7. Maleki I, Reza M and Najm H. Novel Mutations of ATP7B gene in Iranian patients with Wilson's disease. *Res Mol Med* 2013; 1(1): 44-47.
8. Wu F, Wan J, Pu Ch, Qiao L and Jiang Ch. Wilson's disease: A comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 6419-6431.
9. Clark Y, Ruenes C, García EF, Collazo T, Robaina Z, Castañeda C, Roblejo H. Identificación del polimorfismo K832R en pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2013; 12(2): 197-202.
10. Clark Y, Ruenes C, García E F, Roblejo H, Robaina Z, Morales E. p. K832R and p. T991T polymorphisms' analysis in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 2017; 16(2):167-175.
11. Clark Y, Ruenes C, García E, Collazo T, Robaina Z y Roblejo H. Identificación del polimorfismo c.2448-25G>A en pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. *Revista MEDISUR*. 2015; 13(5): 617-621.
12. Clark Y, Ruenes C, García E, Collazo T, Roblejo H, Morales E et al. Study of T991T polymorphism in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease. *Biotecnología Aplicada* 2016; 33: 3221-3224.
13. Clark Y, Ruenes C, García E, Roblejo H, Robaina Z y Morales E. p. K832R and p. T991T polymorphisms' analysis in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 2017; 16(2):167-175.
14. Clark Y, Ruenes C, García E, Collazo T, Roblejo H, Morales E et al. Detection of T991T polymorphism in Cuban families with clinical diagnosis of Wilson's disease. *Medisur* 2017; 5(1): 1-6.
15. Quitti R, Siotto M, Bucossi S and Polimanti R. In silico investigation of ATP7B gene: insights from functional prediction of non-synonymous substitution to protein structure. *Biometals* 2014; 27: 53-64.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

Dr. C. Yulia Clark Feoktistova. *Calle 2, Edificio 23, apartamento 143C, Reparto Obrero. Guantánamo. Cuba. CP 32 700. Correo electrónico: feoktistova@cug.co.cu*