**Memoria 2017**

**Objetivos.**

Nuestro proyecto se desdobla en dos objetivos: (1) estudiar la prevalencia de la enfermedad de Wilson (WD) entre la población infantil de tres comunidades autónomas (Madrid, Valencia, Canarias); (2) identificar los genes implicados en su tráfico basolateral, por creer que estos encierran la clave tanto de su translocación al canalículo biliar, cuando los niveles de Cu en la célula son elevados y potencialmente tóxicos, como de su regreso a la red trans del Golgi (TGN) cuando el exceso de Cu es eliminado y se recuperan sus niveles fisiológicos; es más, consideramos que su identificación ha de ayudar tanto al diagnóstico de las cuprotoxicosis pleomórficas asociadas al tráfico de ATP7B como a la terapia génica que se prevé factible a medio plazo.

**Estado actual del proyecto.**

Acabamos de finalizar la disección “in vivo” del tráfico de ATP7B en el hepatocito. El estudio se ha realizado sobre la base de comparar el tráfico de ATP7B regulado por cobre en ratas normales y en ratas en las que la vía de tráfico fue bloqueada. Las ratas injectadas intravenosamente con una única dosis de Cu, calculada para crear una concentración de Cu anormalmente alta (40 µM), mostraron una movilización completa del ATP7B retenido en la TGN y su translocación al dominio apical donde se estructura el canalículo biliar. Los estudios de microscopía confocal de alta resolución y de STED demuestran una incorporación mayoritaria de ATP7B a la membrana del canalículo biliar, lo que sugiere que ATP7B funciona en esta facilitando el paso del Cu y su vertido en la bilis. Los estudios realizados en las ratas estimuladas con Cu también muestran durante el proceso de translocación la presencia de vesículas transportadoras que transitan por la membrana basolateral. Es más, en ratas inyectadas con el inhibidor de la endocitosis DYNASOR (100 µl, 80 µM) 1 hora antes de serles administrado el Cu, la vía de transporte de ATP7B fue completamente bloqueada, acumulándose las vesículas transportadoras de ATP7B en el domino basolateral del hepatocito y siendo, como resultado, completamente bloqueada la incorporación de ATP7B al canalículo biliar. Es más, la obtención de muestras de bilis durante el proceso de translocación de ATP7B al canalículo biliar mostró un aumento substancial del cobre en la bilis, mientras que en los animales con la vía de ATP7B bloqueada la eliminación biliar del Cu cesó, aumentando significativamente sus niveles en el hígado. Los estudios realizados confirman que el aumento de los niveles de Cu en el hepatocito estimula la translocación de ATP7B al canalículo biliar, que ATP7B es transportado a través de la vía basolateral y que la membrana del canalículo biliar es probablemente el sitio donde ATP7B funciona en la eliminación del Cu por la bilis. No obstante, la demostración del funcionamiento de ATP7B en la membrana del canalículo biliar requiere de estudios funcionales independientes, de ahí que describamos estos en los estudios que realizaremos los próximos meses.

El estudio de la prevalencia de la enfermedad de Wilson es un objetivo nuevo y se prevé iniciarlo en Enero del 2017. Su importancia radica en el hecho de que estudios pilotos realizados en Korea, Japón y Reino Unido indican prevalencias de la EW de entre 1/1.394-1/7.026, mientras que las cifras que se manejan en nuestro país son de entre 1/19.000 y 1/200.000, lo que indica que un alto número de enfermos Wilson no son diagnosticados y tratados, y por tanto que siendo la EW una enfermedad tratable si se diagnostica precozmente, el posible el fracaso en su diagnóstico, o su diagnóstico tardío, estén ocasionando en los pacientes daños multiorgánicos irreversibles, cuando no su fallecimiento.

**Siguientes pasos a 4/6 meses vista.**

Nos proponemos realizar estudios complementarios que demuestren sin ambages que los niveles altos de cobre en el hepatocito estimulan la incorporación de ATP7B a la membrana del canalículo biliar. Para ello utilizaremos tres estrategias: (a) el estudio de construcciones en las que se ha insertado la proteína fluorescente EGFP en el dominio NH-citoplasmático de ATP7B. Cabe señalar que este tipo de construcciones, muy utilizadas en el estudio de otras proteínas, no ha funcionado cuando la EGFP ha sido incorporada a los extremos NH- y -COOH de ATP7B, razón por la cual hemos elegido insertarla entre los dominios 1-2 y 2-3 de unión al Cu, aparentemente prescindibles. Los resultados son “a priori” impredecibles, pero si la proteína construida conservase su movilidad esperamos estudiar con la técnica TIRF su incorporación a la membrana del canalículo biliar, si se produce; (b) el estudio en criosecciones de hígado de la distribución de ATP7B en la zona canalicular utilizando anticuerpos marcados con oro de 5 y 10 nm; (c) examinar si el retorno de ATP7B a la TGN una vez normalizados los niveles de cobre en el hepatocito es impedido si bloqueamos su endocitosis apical, lo que estamos en condiciones de estudiar in vivo.

Como decimos en la introducción, en enero empezaremos el estudio de la prevalencia de la EW en la población infantil.

**Dificultades detectadas durante el desarrollo del proyecto.**

Las dificultades técnicas que plantean los experimentos, esto no es novedoso, van siendo superadas, unas requieren más tiempo que otras. Las personas y medios disponibles son escasos.

**Si se ha realizado alguna colaboración con otros miembros de Equipo Wilson, describirla**.

Se ha realizado el estudio de la distribución de ATP7B en una biopsia de hígado perteneciente a un enfermo diagnosticado de Wilson y sin mutaciones en ATP7B procedente del Hospital la Fe de Valencia, enviada por Ana Sánchez del laboratorio de Carmen Espinós. A pesar del interés de la muestra suministrada y haber detectado ATP7B en los canalículos biliares (la señal fue muy baja) no estamos satisfechos con el estudio que realizamos ya que no pudo ser hecho de la forma más adecuada, lo que hubiera sido deseable dada su importancia. La razón de ello es que se nos suministró la biopsia sin haber tenido la oportunidad de estudiar previamente otras (no teníamos experiencia previa con biopsias en las que por lo general la cantidad de tejido/órgano suministrada es muy reducida); tampoco tuvimos el deseable y esencial acceso a la historia clínica del paciente, habiendo preguntado, pero no obteniéndose respuesta acerca de la base clínica del diagnóstico y los parámetros que atañen al Cu. Los problemas técnicos que nos planteó la muestra fueron menores de lo esperado y tras su estudio hemos aprendido a trabajar con biopsias. Sin embargo, es deseable que las biopsias sean estudiadas dentro de un protocolo experimental adecuado; ello es porque el transporte de ATP7B en el hepatocito conlleva su estimulación por el Cu y es esencial que la muestra venga acompañada del informe correspondiente de los niveles de Cu en el hígado a estudiar; las muestras de enfermos con niveles altos de Cu pueden ser estudiadas por microscopía directamente; sin embargo, las muestras que contengan niveles normales o bajos de Cu tendrán que ser tratadas adecuadamente para obtener hepatocitos susceptibles de ser tratados con el metal antes de realizar el estudio microscópico.

**Si se tiene en proyecto algún tipo de colaboración con gente externa al Equipo, describirla.**

Colaboramos con los Drs. Francisco Nieto (Parque Científico de Madrid), Akihito Tsubota (Nikei University, Japón) y Andree Zibert, Universitätsklinikum Münster.

**Sugerencias y peticiones si las hay.**

Petición: Necesitamos contratar un Dr./Dra. para realizar el estudio de la prevalencia de la enfermedad de Wilson en la población infantil.