



## Resumen Proyecto de Investigación

### **Avanzar en el diagnóstico y la prognosis de la enfermedad de Wilson**

IP: Carmen Espinós

Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas,  
Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia (<http://espinos.cipf.es/>)

### **OBJETIVOS**

**(1) DIAGNÓSTICO GENÉTICO.** El objetivo general es caracterizar genéticamente los pacientes con EW de la Comunitat Valenciana y ahondar en su epidemiología genética.

#### Objetivos específicos:

- 1.1.- Evaluación clínica de pacientes y reclutamiento de muestras para la extracción de DNA.
- 1.2.- Análisis mutacional del gen *ATP7B*.
- 1.3.- Correlación genotipo-fenotipo.
- 1.4.- Epidemiología genética.

**(2) BIOMARCADORES.** El objetivo general es la identificación de la firma de microRNAs que pueda actuar como biomarcador de la enfermedad útil para el pronóstico de la misma y valoración del tratamiento de nuevos fármacos.

#### Objetivos específicos:

- 2.1.- Reclutamiento de muestras de pacientes.
- 2.2.- Obtención de plasma.
- 2.3.- Análisis de microRNAs.
- 2.4.- Validación de resultados mediante RT-qPCR.

**(3) MODIFICADORES GENÉTICOS.** El objetivo general es la caracterización de variantes genéticas que puedan contribuir al fenotipo de los pacientes Wilson.

#### Objetivos específicos:

- 3.1.- Selección de muestras de DNA de la serie clínica reclutada.
- 3.2.- Secuenciación de exoma en los pacientes incluidos.
- 3.3.- Filtrado informático de genes.
- 3.4.- Validación y análisis de cambios identificados.



## ESTADO ACTUAL DEL PROYECTO

### (1) DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Durante este año nuestra serie clínica ha sido completada. En total, esta serie comprende 28 casos índice procedentes del H. U. i P. La Fe y 5 del H. Gral. U. d' Elx. Además, hemos recibido un total de 12 muestras para realizar el análisis genético de *ATP7B* procedentes de otros centros hospitalarios de la Comunitat Valenciana en los que se ha dado a conocer nuestro proyecto (H. Sagunto, H. U. Peset, H. Gral. U. Alicante, H. Gral. U. Valencia, H. Clínico Valencia y H. U. del Vinalopó).

Hasta la fecha, hemos realizado el estudio genético de *ATP7B* de 45 casos índice. Este estudio comprende el análisis de las regiones codificantes, intrónicas flanqueantes y promotora mediante secuenciación Sanger; y el estudio de grandes deleciones y duplicaciones por MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Se ha logrado el diagnóstico genético en 26 casos, en 4 casos sólo se ha identificado un único cambio y en 11 casos no se han detectado mutaciones patológicas. En los 4 casos restantes, que proceden del H. U. i P. La Fe, los pacientes presentan una clínica compatible con el diagnóstico de EW, pero no se ha conseguido identificar en ellos posibles cambios patológicos

Con el fin de tratar de resolver el diagnóstico genético en estos 4 casos, se ha llevado a cabo un análisis basado en la captura y secuenciación masiva de las regiones codificantes, no codificantes y promotora del gen *ATP7B*, basado en tecnología NGS (*Next Generation Sequencing*). Con esta aproximación, en dos casos se han identificado mutaciones intrónicas profundas con una frecuencia inferior al 1% en la población y estudios de segregación en muestra de familiares confirman estos cambios como candidatos. Sin embargo, los análisis realizados a nivel de mRNA procedente de sangre periférica de los pacientes portadores de los cambios descartan que pudiesen causar alguna alteración en el patrón de *splicing* del gen.

Los resultados obtenidos en los 4 casos sin diagnóstico genético resuelto en este análisis completo de *ATP7B* sugieren que mutaciones en otros genes causan un fenotipo Wilson. Para ello, se ha planteado la realización de secuenciación de exoma en alguno de estos casos índices y familiares, y en la medida de lo posible en paralelo, estudios de transcriptómica. En colaboración con la Dra. Marina Berenguer hemos tenido acceso a biopsia hepática de uno de estos probandos y estamos pendientes de obtener nueva muestra de DNA para iniciar estudios genómicos y transcriptómicos, con el fin de caracterizar las bases moleculares que subyacen en la enfermedad en esta familia.

En el marco clínico, se ha realizado una resonancia magnética (RMN) de precisión, que permite la cuantificación de metales, en aquellos pacientes procedentes del H. U. i P. La Fe en los que se detectaron signos neurológicos (temblor, distonía, parkinsonismo). Junto con las Dras. Sastre y Martínez se seleccionaron los pacientes que cumplían esta condición, y en 9 casos ha sido realizada esta prueba. Actualmente, los técnicos de radiología se encuentran analizando los datos obtenidos para las múltiples variables registradas en la prueba.



## **(2) BIOMARCADORES**

Para esta parte del proyecto contamos con muestras de plasma de 24 pacientes (16 casos índice) que son supervisados en las Unidades de Medicina Digestiva y Neurología del H. U. i P. La Fe y el H. Gral. U. d' Elx y que cuentan con diagnóstico genético de *ATP7B* resuelto. Puesto que en esta cohorte predomina la sintomatología a nivel hepático, tanto en el debut como en la evolución clínica, para el análisis se pretende establecer una clasificación basada en el seguimiento de la clínica y/o el tratamiento prescrito a los pacientes. Se ha planteado un diseño experimental dos grupos, pacientes frente a controles, emparejando las muestras de pacientes por edad y sexo con muestras de plasma de controles sanos, que ya han sido solicitadas y obtenidas del Biobanco para la Investigación Biomédica y en Salud Pública de la Comunidad Valenciana (IBSP-CV).

Se ha comenzado con la extracción y purificación de miRNAs a partir de las muestras de plasma obtenidas. En concreto, nos encontramos en una fase inicial del proceso, determinando si la calidad y cantidad de material obtenido tras la purificación son suficientes para la tecnología de análisis escogida, basada en secuenciación masiva (miRNA-seq).

## **(3) MODIFICADORES GENÉTICOS**

Para este objetivo, fueron seleccionadas tres familias con 2 hermanos afectados cada una de ellas (en dos se trata de hermanos gemelos) con una clínica dispar en cuanto a gravedad y debut de las manifestaciones clínicas, supervisados por las unidades de Medicina Digestiva y Neurología del H. U. i P. La Fe.

Una vez obtenidas las muestras de ADN de los individuos objeto de estudio, éstas fueron enviadas para secuenciación de exoma al Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) el pasado mes de abril, disponiéndose ya de los ficheros generados en dicho proceso para su análisis.

## **PLAN DE TRABAJO EN LOS PRÓXIMOS MESES**

### **(1) DIAGNÓSTICO GENÉTICO**

En cuanto tengamos el resultado de la evaluación clínica de los pacientes mediante RMN de precisión preparemos el manuscrito correspondiente que incluirá los estudios genéticos realizados en la serie de pacientes Wilson del H. U. i P. La Fe de Valencia y del H. General U. d'Elx, junto con su descripción clínica detallada. Este trabajo presentará por primera vez abordajes genéticos tales como la secuenciación completa del gen *ATP7B* mediante tecnología NGS, además de la realización de RMNs de precisión.

En relación a los 4 pacientes con resultados negativos, esperamos en breve iniciar los estudios genómicos y transcriptómicos comentados en el apartado anterior.



Recientemente hemos contactado con el grupo liderado por el Dr. Antonio Tugores (Complejo H. U. Insular de Canarias). En su serie de pacientes Wilson cuenta con algunos pacientes con ninguna mutación o sólo una en el gen *ATP7B*. En nuestro laboratorio, procederemos al estudio completo del gen *ATP7B* en estos pacientes mediante tecnología NGS con el fin de profundizar en el estudio genético.

## **(2) BIOMARCADORES**

Tras conocer el resultado de los análisis llevados a cabo por el equipo de radiólogos de la RMN de precisión en aquellos pacientes con sospecha de signos neurológicos, se incluirá esta información para su clasificación dentro de este estudio, junto con el seguimiento de la clínica y tratamiento que siguen.

Mientras, se continuará con la extracción y purificación de miRNAs a partir de las muestras de plasma obtenidas, la determinación de su calidad para secuenciación masiva y la puesta a punto del protocolo de obtención de librerías para miRNA-seq antes de realizar dicho procedimiento en muestra de pacientes y controles.

## **(3) MODIFICADORES GENÉTICOS**

En colaboración con el Dr. Ignacio Sandoval hemos seleccionado 60 genes implicados en metabolismo del cobre y que por tanto, podrían modular el resultado clínico de mutaciones patológicas en *ATP7B*. Se ha comenzado con el filtrado de estos genes en los seis individuos. De momento, el análisis informático está en sus etapas iniciales.

## **DIFICULTADES DETECTADAS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO**

- El estudio de las RMNs de precisión ha requerido mucho tiempo debido a que los pacientes tenían que ser citados de nuevo. Una vez finalizada esta primera fase, el segundo escollo es el análisis y la interpretación de las mismas de acuerdo con el fenotipo clínico de cada uno de los casos, que no se ha realizado todavía.
- La extracción de los miRNAs resulta extremadamente complicada experimentalmente. Afortunadamente, se ha logrado finalmente resolver los problemas técnicos detectados y entendemos que la extracción de los mismos debe ser más fluida y eficaz con el fin de comenzar con la generación de librerías y su secuenciación posterior en los primeros meses de este próximo año.