

CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana
Centro Nacional de Genética Médica

Centro Colaborador de la OMS para el desarrollo de enfoques genéticos en la promoción de salud

Análisis molecular del exón 2 del gen *atp7b* en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson**Molecular analysis in the exon 2 of *atp7b* gene in cubans patients with wilson disease****Agradecimientos**

Agradecemos a los pacientes y sus familias por haber aceptado participar en esta investigación. A la técnica Lidice Reyes Navarro por realizar la extracción de ADN.
A Theodor Todorov y Georgios Loudianos por el envío de controles positivos y por sus aclaraciones teóricas.
Antonio Tugores por sus experiencias en la detección de la mutación L708P.
A Yaixa Piloto Roque, Carlos Castañeda y Carlos Maragoto por sus aportes en esta investigación.

Al Ministerio de Salud Pública.

Yulia Clark Feoktistova^I, Teresa Collazo Mesa^{II}, Caridad Ruenes^{III}, Elsa F. García Bacallao^{IV}, Zoe Robaina Jiménez^V, Trini Frago Arbelo^{VI}

^IMaster en Ciencias en Bioquímica. Mención Biología Molecular. Aspirante a Investigador. Calle 146 núm.3102 esquina Ave 31. Marianao. Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 2089991-9, ext.: 1043, 1046, 1047. E-mail: yulia.clark@cngen.sld.cu

^{II}Doctor en Ciencias de La Salud. Investigador Auxiliar. Teléfono: 2089991-9, ext: 1043, 1046, 1047. 1049. E-mail: tcollazo@infomed.sld.cu

^{III}Especialista Primer Grado de Medicina General Integral. Especialista Segundo grado en gastroenterología. Subdirectora de Asistencia Médica. Investigador Agregado. Instructor. E-mail: ruenes@infomed.sld.cu

^{IV}Especialista Segundo Grado en Gastroenterología. Servicio de Pediatría. Auxiliar. Investigador Agregado. E-mail: egarcia@infomed.sld.cu

^VEspecialista Primer Grado de Medicina General Integral. Especialista Segundo Grado en Genética Clínica. E-mail: zoerobaina2009@yahoo.es

^{VI}Especialista Segundo Grado en Gastroenterología. Profesor Consultante Master en Infectología. E-mail: fragoso@infomed.sld.cu

RESUMEN

La enfermedad de Wilson es un trastorno hereditario que se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo. Se caracteriza por la acumulación de cobre fundamentalmente en hígado y cerebro. La causa molecular que la provoca son las mutaciones en el gen *atp7b* y hasta la fecha se han reportado más de 380. El diagnóstico molecular es complejo. En el presente estudio se empleó la técnica de cribaje: Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena para la determinación de cambios conformacionales en el exón 2 en el fragmento a. Se detectó dos cambios conformacionales diferentes denominados: a y b. El cambio conformacional b correspondió a la mutación N41S en estado heterocigótico. La frecuencia alélica de la mutación N41S en 130 pacientes cubanos diagnosticados clínicamente con la enfermedad de Wilson es de un 0.77%.

Palabras clave: Enfermedad de Wilson, mutación N41S, SSCP, gen ATP7B.

ABSTRACT

Wilson disease is an autosomal recessive inherited disorder of copper metabolism. It is clinically characterised by hepatic and neurological manifestations related to the accumulation of copper in the liver and brain. Molecular analysis reveals more than 380 distinct mutations. The molecular diagnosis is complex. In this investigation we use single- strand conformation polymorphism for determine conformationals shift. We identified two different conformationals shifts in the exon 2 of *atp7b* gene in cubans patients, denominated: a and b. The shift b correspond with the mutation N41S. The frequency of this mutation is 0.77% in 130 cubans patients.

Key words: Wilson disease, mutation N41S, SSCP, *atp7b* gene.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Wilson (EW, MIM 27790) es un trastorno hereditario y presenta un patrón de herencia autosómico recesivo. Constituye un problema de salud

mundial. La sintomatología es muy diversa, por lo que el diagnóstico clínico de la enfermedad es complejo. Se caracteriza daños en el hígado, que puede ser desde la alteración de los niveles séricos de transaminasas hasta la cirrosis descompensada, incluyendo la hepatitis fulminante. Además, los pacientes con esta enfermedad pueden presentar daños neurológicos, tales como: pérdida de memoria, dificultad de movimientos, temblores, parkinson, entre otros. Además trastornos psiquiátricos tales como: cambios en la personalidad. Dentro de las enfermedades genéticas raras es tratable, sin embargo, de no atenderse de forma adecuada, puede provocar lesiones irreversibles en el hígado y el cerebro que pueden llevar a la muerte. La incidencia es de 1/5 000 a 1/100 000 y es diferente en las diversas poblaciones estudiadas, en Cuba aún no se ha determinado. La causa molecular que la provoca son las mutaciones en el gen ATP7B (MIM 606882), el cual presenta 21 exones, y hasta la fecha se han reportado más de 380¹. Más de la mitad de las mutaciones son con pérdida de sentido dentro de los dominios transmembranales de la proteína ATP7B y en el lazo largo unidor de ATP, el resto está constituido por inserciones y deleciones pequeñas.²⁻¹⁰

Existen pocos reportes en América Latina de estudios moleculares, por ejemplo: Brasil y Colombia. La mutación más frecuente en Brasil es la deleción 3402delC localizada en el exón 15 del gen *atp7b* con frecuencia de 30.8%, seguida de la mutación L708P en el exón 8 con 16.7%. Estos investigadores informaron una mutación nueva: la N41S, en un paciente en estado heterocigótico.¹¹

El diagnóstico molecular de los pacientes con la enfermedad de Wilson es complejo, pues el gen *atp7b* presenta 21 exones. Han sido informadas pocas mutaciones frecuentes. El número e incidencia de las mutaciones varía de acuerdo con el origen étnico y la localización geográfica de cada población. Por la gran heterogeneidad mutacional generalmente no se puede hacer una correlación genotipo-fenotipo.

Para la determinación del espectro mutacional en el gen *atp7b* es necesario una adecuada tecnología de cribaje. Una de las técnicas más utilizadas para este propósito es el Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena, SSCP (del inglés *single-strand conformation polymorphism*).⁵

Considerando que en Cuba no ha sido establecido el diagnóstico molecular de la enfermedad de Wilson, nos proponemos la búsqueda de cambios conformacionales y mutaciones en el exón 2 del gen *atp7b* en pacientes con diagnóstico clínico de esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo. El universo se conformó por 130 pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. La evaluación fue realizada por un equipo multidisciplinario (un genetista, cuatro gastroenterólogos, dos neurólogos y un bioquímico), siguiendo los criterios de diagnóstico de la enfermedad. Los pacientes dieron su consentimiento por escrito de participar en la investigación, mediante un documento elaborado para tal fin, de acuerdo con los principios éticos de la declaración de Helsinki.

Se seleccionó el exón 2 del gen *atp7b* para la detección de cambios conformacionales y mutaciones.

La extracción de ADN se realizó por el método de precipitación salina ¹² a partir de 10 ml de sangre periférica con EDTA (56 mg/ml) como anticoagulante.

Las condiciones para la amplificación para el exón 2 (el fragmento a) mediante la técnica de PCR fue: 100ng de ADN, 10 pmoles/ml de cada oligonucleótido del exón correspondiente (Tabla 1), 1mM de dNTPs (Boehringer), 10X Tampón PCR, 15mM de MgCl₂, 1u de Taq polimerasa (Amplicen), en un volumen final de 25 ml. La técnica se desarrolló en el termociclador MJ Research. Se realizó una desnaturalización inicial del ADN a 94°C por 4 min. La amplificación incluyó 35 ciclos de desnaturalización/ hibridación/ extensión: 20 seg a 94°C, 30 seg a 58°C, 25 seg a 72°C respectivamente.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación del exón 2a del gen ATP7B

Exones	Oligonucleótidos	TH (°C)	Talla del fragmento amplificado (pb)
2a	5´ AGA AGC TGG GAT GTT GTA GAA AAT ATT AGG 3´ 5´ GAA ATC CTG TCC TCA ATG GAC 3´	58	275

TH: Temperatura de hibridación, pb: pares de bases.

Posteriormente se realizó la electroforesis SSCP. Se comprobó el producto de la reacción de amplificación (PCR), se mezcló 3,5ml con una solución de parada de bromofenol azul (0,05% BFA, 10mM NaOH, 95% formamida, 20mM EDTA) y 1ml del producto amplificado, en un volumen final de 7ml. Se desnaturalizó 5 min a 96°C y se colocó rápidamente en hielo. Se aplicó en un gel de acrilamida comercial (*GeneGel Excel 12.5/24 Kit*) y el equipo utilizado fue el Genephyor. Las condiciones de corrida fueron: 350V de Voltaje, 15W de Potencia, 15 °C de temperatura y 2 h de tiempo de corrida. La visualización del ADN se realizó por el método de tinción con plata siguiendo las instrucciones del juego comercial: *kit Plus One DNA Silver Staining* (Amersham Biosciences, 2002).

Una vez detectado el cambio conformacional en el exón 2a, se procedió a la búsqueda de la mutación N41S. Se digirió el ADN con la enzima de restricción Bsr I a 65 °C, durante 3 h. Se realizó la digestión en un volumen final de 30µl, 15µl del producto amplificado y 15u de la enzima Bsr I. Luego se visualizó en un gel de agarosa al 2% a un voltaje constante de 250V.

RESULTADOS

Se detectaron dos pacientes cubanos heterocigóticos para la mutación N41S, la cual fue reportada por primera vez en Brasil. La frecuencia de esta mutación en Brasil es de 1.1%.⁴

La mutación N41S es resultado de un cambio del aminoácido Asparagina en la posición 41 por Serina, lo cual afecta uno de los sitios de unión al Cobre de la proteína transportadora de Cobre ATP7B y se dificulta el transporte de Cobre. La frecuencia de la misma en los 130 pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson es de 0.77%, similar a la de Brasil.

DISCUSIÓN

En la actualidad se han descrito más de 380 mutaciones en el gen *atp7b*.⁷ En Cuba se comienza a realizar la detección de mutaciones del gen *atp7b* en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson en el año 2008. Un paso previo a la búsqueda de la causa molecular de esta enfermedad fue la detección de cambios conformacionales. En el exón 2 se observaron dos cambios conformacionales diferentes: a (128 pacientes) y b (dos pacientes). El por ciento que representan de los 130 pacientes es aproximadamente de 98.5%, y 1.5% respectivamente.

Por primera vez en Cuba se establece la frecuencia alélica de una mutación en el gen *atp7b* en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. La frecuencia para la mutación N41S es de 0.77 %, similar a la de Brasil.

Para concluir el diagnóstico molecular en los dos pacientes que se detectó la mutación N41S en estado heterocigótico hay que determinar la otra mutación causante de la enfermedad, por lo que hay que estudiar otros exones del gen *atp7b*.

CONCLUSIONES

Se estandarizó por primera vez en Cuba las técnicas: PCR y SSCP para el estudio molecular del exón 2 del fragmento a del gen *atp7b*. Se detectó por digestión enzimática la mutación N41S. Se determinó la frecuencia de la mutación N41S en 130 pacientes cubanos. Se cuenta con una herramienta molecular para la introducción del diagnóstico molecular en pacientes con la enfermedad de Wilson en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kenney S M and Cox D W. Sequence Variation Database for the Wilson Disease Copper Transporter, ATP7B. *Human Mutation* 2007; 28 (12): 1171-77.
2. Forbes JR and Cox DW. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Molec Genet* 2000; 9: 1927-1935.
3. Perri RE, Hahn SH, Ferber MJ, Kamath PS. Wilson disease-keeping the bar for diagnosis raised. *Hepatology* 2005; 42: 974.
4. Petrukhin KE, Lutsenko S, Chernov I. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1647-1656.
5. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, Ballesta, F. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet* 2005; 68: 6168.

6. Prat L, Macintyre G and Cox D. New Mutations in the Wilson Disease Gene, ATP7B: Implications for Molecular Testing. *Genetic Testing* 2008; 12 (1): 139-146.
7. Kenney SM, Cox DW. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat.* 2007; 28 (12):1171-7.
8. Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, Bochow B, Buttner J, Schmidt H. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *J Hum Genet* 2008; 53: 68187.
9. Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B et al. A Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin Genet* 2005; 68: 52432.
10. Khaliq A, Majeed A and Asifa S. Spectrum of ATP7B Gene Mutations in Pakistani Wilson Disease Patients: A Novel Mutation Is Associated with Severe Hepatic and Neurological Complication. *International Journal of Biology* 2010, 2 (1): 117-122.
11. Deguti M, Genschel J, Cancado L.R, 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.
12. Miller SA. Salting out procedure for extracting. *DNA nucleic acids reserch* 1988; 16 (3):1215.

Recibido: 6 de junio de 2011.

Aprobado: 29 de junio de 2011.