

Detección de cambios conformacionales y mutaciones en el exón 8 del gen *atp7b* en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson

✉ Yulia Clark¹, Teresa Collazo¹, Caridad Ruenes², Elsa García², Zoe Robaina¹, Trini Fragoso³, Gabriel Rodríguez³, Yaixa Piloto¹, Georgina Espinosa⁴, Carlos Maragoto⁵, Héctor Vera⁵, Idalmis García², Lidice Reyes¹, Carlos Castañeda²

¹Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Genética Médica Ave. 31, esquina 146, Cubanacan, Playa, La Habana, Cuba

²Instituto Nacional de Gastroenterología Calle 25 e/ H e I, Vedado, La Habana, Cuba

³Hospital Pediátrico Universitario Pedro Borrás Calzada de Aldabo y E #11117, Alta Habana, Boyeros, La Habana, Cuba

⁴Departamento Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, UH Calle 25 e/ I y J, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba

⁵Centro Internacional de Restauración Neurológica, CIREN Ave. 25 #15805 e/ 158 y 160, CP 11300, Cubanacan, Playa, La Habana, Cuba E-mail: yulia.clark@cngen.sld.cu

RESUMEN

La enfermedad de Wilson es un trastorno hereditario que se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo. Puede provocar lesiones irreversibles en el hígado y el cerebro, que pueden llevar a la muerte. Su causa molecular son las mutaciones en el gen *atp7b* con 379 variantes promotoras de la enfermedad. El diagnóstico molecular es complejo. En este estudio se empleó la técnica de polimorfismo conformacional de simple cadena para la determinación de cambios conformacionales en el exón 8 de ese gen. Se detectaron dos cambios distintos de la variante normal, denominados: b y c, los cuales correspondieron a las mutaciones L708P y 2304DupC en estado heterocigótico, respectivamente. Las frecuencias alélicas de tales mutaciones en 72 pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson son de 2 y 0.7%, respectivamente.

Palabras clave: enfermedad de Wilson, mutación L708P, SSCP

Biotecnología Aplicada 2011;28:83-86

ABSTRACT

Detection of conformational shift and mutation in the exon 8 of the gene *atp7b* in cubans patients with Wilson disease. Wilson's disease is a hereditary disorder of autosomal recessive inheritance that can cause irreversible, potentially lethal lesions to liver and brain. Its molecular cause is the appearance of mutations in the *atp7b* gene. A total of 379 different disease-producing mutations are currently known, turning the molecular diagnosis of this disorder into a formidable challenge. The present study used single-strand conformational polymorphism for the detection of conformational changes in exon 8 of this gene. Two shifts distinct from the normal allele, denominated b and c, were detected and mapped to mutations L708P and 2304DupC in heterozygosis. Allelic frequencies for these mutations in 72 Cuban Wilson's disease patients were 2 and 0.7%, respectively.

Keywords: Wilson's disease, mutation L708P, SSCP

Introducción

La enfermedad de Wilson (EW, MIM 27790) es un trastorno hereditario que se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo. Constituye un problema de salud mundial, cuya sintomatología dificulta su diagnóstico clínico. Se caracteriza por la afectación del hígado: desde una mínima alteración de los niveles séricos de transaminasas, una cirrosis descompensada, o una hepatitis fulminante. Las personas con esta enfermedad pueden padecer daños neurológicos como pérdida de memoria, dificultad de movimientos, temblores, problemas en el lenguaje, entre otros [1, 2].

El diagnóstico clínico se basa en la interpretación de pruebas clínicas y bioquímicas, como la determinación de cobre en la orina de 24 horas, cobre en suero, ceruloplasmina (de 5 a 15% de los pacientes con la enfermedad presenta valores normales), biopsia hepática (falsos positivos: síndromes colestásicos,

y falsos negativos: distribución irregular del cobre), presencia de anillos Kayser-Fleischer, entre otros [1]. Por la sintomatología hepática puede confundirse con hemocromatosis tipo 1 y α -1 antitripsina.

La prevalencia reconocida mundialmente es de 1/30 000; sin embargo, en Cuba aún no se ha determinado. El gen *atp7b* (MIM 606882) se encuentra localizado en el cromosoma 13 en la región q14.3-q21, y se han descrito 518 variantes; de ellas, 379 son mutaciones responsables de la enfermedad [3]. Más de la mitad de las mutaciones identificadas presentan pérdida de sentido dentro de los dominios transmembranales de la proteína ATP7B y en el lazo largo unido de ATP [4-8]. También se han descrito algunas en los sitios de empalme [9].

Por la gran heterogeneidad mutacional y que la mayoría de los pacientes diagnosticados molecular-

1. Roberts EA, Schilsky ML; American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*. 2008;47(6):2089-111.

2. Durand F. Wilson's disease: an old disease keeps its old secrets. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19(2):97-9.

3. Kenney SM, Cox DW. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat*. 2007;28(12):1171-7.

4. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralto R, et al. 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(1):61-8.

mente son heterocigóticos compuestos, generalmente no se puede hacer una correlación genotipo-fenotipo [4-6]. Se ha observado que individuos homocigóticos para la mutación H1069Q presentan diferencias en las manifestaciones clínicas, por lo que pueden estar involucrados otros factores genéticos (ATOX1, Apo E) y factores ambientales (incluyendo la variabilidad nutricional)[10].

El diagnóstico molecular de los pacientes con la enfermedad de Wilson es complejo, pues el gen *atp7b* presenta 21 exones y se han informado pocas mutaciones frecuentes. Su número e incidencia varía de acuerdo con el origen étnico y la localización geográfica de cada población. El exón 8 es polimórfico: se han identificado 50 mutaciones que provocan la enfermedad [3]. La mutación L708P afecta el transporte de cobre y se ha detectado con una frecuencia de 60% en Islas Canarias, en Brasil 16.7%, y en Estados Unidos menor de 1% [11-13]. La mutación 2304DupC provoca un corrimiento del marco de lectura, con una frecuencia de 2.6% en Norteamérica [13], ambas se localizan en el exón 8 del gen *atp7b*.

El diagnóstico molecular de esta enfermedad posibilita la identificación de sus causas genéticas, la confirmación del diagnóstico clínico, la detección de portadores y la identificación de los síntomas previos, que con un tratamiento temprano pueden mejorar la calidad de vida.

Para la determinación del espectro mutacional en el gen *atp7b* es necesario una adecuada tecnología de pesquisa [4, 14]. Una de las técnicas para este propósito es el polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP).

Considerando que en Cuba no se ha abordado el diagnóstico molecular de la enfermedad de Wilson, nos propusimos la búsqueda de cambios conformacionales y mutaciones en el exón 8 (exón polimórfico) del gen *atp7b* en pacientes con este diagnóstico clínico.

Materiales y métodos

Universo de estudio

El estudio fue descriptivo. El universo se conformó por 72 pacientes no relacionados con el diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. La evaluación la cometió un equipo multidisciplinario (un genetista, cuatro gastroenterólogos, dos neurólogos y un bioquímico), siguiendo los criterios de inclusión para el diagnóstico. Los pacientes dieron su consentimiento escrito de participar en la investigación, mediante un documento elaborado para tal fin, de acuerdo con los principios éticos de la declaración de Helsinki. El consentimiento de los pacientes menores de edad, lo ofreció el tutor legal, así la autorización para la selección de esta muestra. El estudio no implicó ningún riesgo para los pacientes, más bien beneficios de asesoramiento genético. Se les explicó el carácter confidencial de la investigación. Esta fue aprobada por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

Para la búsqueda de cambios conformacionales, se seleccionó el exón 8 del gen *atp7b*, por la cantidad y la frecuencia de mutaciones detectadas en él en otras poblaciones [3].

La extracción de ADN fue por el método de precipitación salina [15] a partir de 10 mL de sangre periférica con EDTA (56 mg/mL) como anticoagulante.

Técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Las condiciones para la amplificación del exón 8 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron: 100 ng de ADN, 10 pmoles/ μ L de cada oligonucleótido informado por Loudianos y colaboradores: E8 1: 5' CTA CTT CTT GGC AGC CTT CAC TG 3', E8 2: 5' GGA GCA GCT CTT TTC TGA ACC TG 3' [16], dNTPs 1 mM (Boehringer), tampón PCR al 10X, $MgCl_2$ 15 mM, 1 u de Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen final de 25 μ L. La técnica se desarrolló en el termociclador MJ Research. Se efectuó una desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante 4 min. La amplificación incluyó 35 ciclos de desnaturalización/ hibridación/ extensión: 20 s a 94 °C, 30 s a 62 °C, 25 s a 72 °C, respectivamente.

Técnica de polimorfismo conformacional de simple cadena

Posteriormente se realizó la electroforesis por polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP). En esta técnica, la doble cadena del ADN se desnaturaliza, y el producto se separa por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. El tamaño de los fragmentos debe estar entre 150 y 300 pb. Se basa en la relación que existe entre la movilidad electroforética de la simple cadena del ADN y su estructura conformacional.

Para realizar la técnica de SSCP, se comprobó el producto de la reacción de amplificación, se mezcló 3.5 μ L con una solución de parada de bromofenol azul (0.05% de BFA, NaOH 10 mM, formamida 95%, EDTA 20 mM) y 1 μ L del producto amplificado, en un volumen final de 7 μ L. Se desnaturalizó durante 5 min a 96 °C, y rápidamente se colocó en hielo. Se aplicó en un gel de acrilamida comercial (GeneGel Excel 12.5/24 Kit) y se utilizó el equipo Genephor. Las condiciones de corrida fueron: 500 V, 15 W, 15 °C durante 2 h. Mediante el método de tinción con plata, se visualizó el ADN, siguiendo las instrucciones del juego comercial kit Plus One DNA Silver Staining (Amersham Biosciences, 2002). Se utilizó un control positivo heterocigótico para las mutaciones: L708P y 2304DupC.

Detección de la mutación L708P

Una vez detectados los cambios conformacionales en el exón 8, se procedió a la búsqueda de la mutación L708P, en los pacientes del control positivo que presenten ese cambio conformacional. Se digirió el producto de PCR con la enzima de restricción *Alu I* a 37 °C, durante 3 h. La digestión ocurrió en un volumen final de 30 μ L, 15 μ L del producto amplificado y 15 U de la enzima *Alu I*. Luego se visualizó en un gel de agarosa al 2% a un voltaje constante de 250 V.

Detección de la mutación 2304DupC

Mediante secuenciación se comprobó la mutación 2304DupC. El equipo utilizado fue ALF-Express II, de Amersham Pharmacia Biotech. La purificación del producto de PCR se realizó utilizando el juego comer-

5. Davies LP, Macintyre G, Cox DW. New mutations in the Wilson disease gene, ATP7B: implications for molecular testing. *Genet Test*. 2008;12(1):139-45.

6. Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, Bochow B, Büttner J, Schmidt H. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *J Hum Genet*. 2008;53(8):681-7.

7. Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, et al. 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(6):524-32.

8. Khaliq A, Majeed A, Asifa S. Spectrum of ATP7B gene mutations in Pakistani Wilson disease patients: A novel mutation is associated with severe hepatic and neurological complication. *Int J Biol*. 2010; 2(1):117-22.

9. Lovicu M, Lepori MB, Incollu S, Dessi V, Zappu A, Iorio R, et al. RNA analysis of consensus sequence splicing mutations: implications for the diagnosis of Wilson disease. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009; 13(2):185-91.

10. Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2(9): 482-93.

11. García-Villarreal L, Daniels S, Shaw SH, Cotton D, Galvin M, Geskes J, et al. High prevalence of the very rare Wilson disease gene mutation Leu708Pro in the Island of Gran Canaria (Canary Islands, Spain): a genetic and clinical study. *Hepatology*. 2000;32(6):1329-36.

12. Deguti MM, Genschel J, Cancado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, et al. Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat*. 2004; 23(4):398.

13. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, et al. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet*. 1997;61:317-28.

14. Lepori MB, Lovicu M, Dessi V, Zappu A, Incollu S, Zancan L, et al. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly Italian origin. *Genet Test*. 2007;11(3):328-32.

cial QIAquick Kit (Quiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias se analizaron con el software ALFwin Sequence Analyser 2.11 y Blast (programa de alineamiento de secuencia).

Resultados y discusión

En el año 2008 comenzaron en Cuba los estudios para la detección de mutaciones del gen *atp7b* en pacientes nativos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. Antes de la búsqueda de la causa molecular de esta enfermedad, se detectaron los cambios conformacionales.

En esta investigación se detectaron tres cambios conformacionales en el exón 8 del gen *atp7b* en 72 pacientes cubanos diagnosticados clínicamente con la enfermedad de Wilson. Las variantes identificadas se denominaron: a, b y c.

La figura 1 es la corrida electroforética de un gel de acrilamida al 12.5% (SSCP) del exón 8 del gen *atp7b* en 23 pacientes de los 72 analizados y un control positivo. Se observa el cambio conformacional a, que corresponde a la variante normal, y el cambio conformacional b, correspondiente a la mutación L708P en estado heterocigótico de una muestra control. Este cambio conformacional b se detectó en tres pacientes de los 72 analizados con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson, que no presentan ningún grado de parentesco. Mediante la técnica de SSCP, un cambio en la secuencia del gen que modifique la conformación tridimensional del ADN, provoca un cambio detectable en la electroforesis, por lo que la presencia de la mutación L708P en el exón 8 produce un cambio conformacional en la secuencia y un cambio detectable en la electroforesis, tal como muestra la figura 1.

De las muestras que presentaron el cambio conformacional b, se confirmó la presencia de la mutación L708P por digestión enzimática con la enzima de restricción *Alu I*. Su presencia hace que desaparezca el sitio de restricción de la enzima. Los pacientes homocigóticos para esta mutación presentan un fragmento de 230 pb y los heterocigóticos muestran tres fragmentos: 230 pb, 180 pb y 50 pb. En la figura 2 se observa la mutación L708P en tres pacientes heterocigóticos.

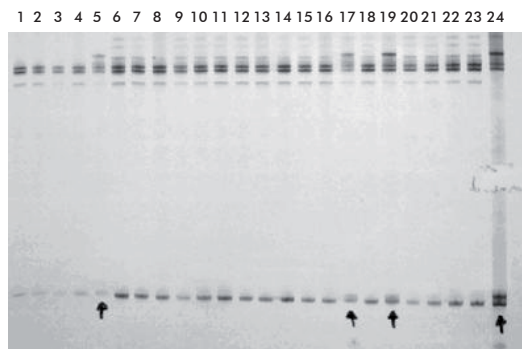


Figura 1. Corrida electroforética por la técnica de polimorfismo conformacional de simple cadena del exón 8 del gen *atp7b* en 23 pacientes cubanos de los 72 estudiados con la enfermedad de Wilson y un control positivo. Visualizado en un gel acrilamida al 12,5%. Carrileras 1-4, 6-18 y 20-23 presentaron el cambio a. Carrileras 5, 17 y 24, el cambio conformacional b. Carrilera 19, control positivo heterocigótico para la mutación L708P para el cambio conformacional b. La flecha indica la presencia de cambios conformacionales.

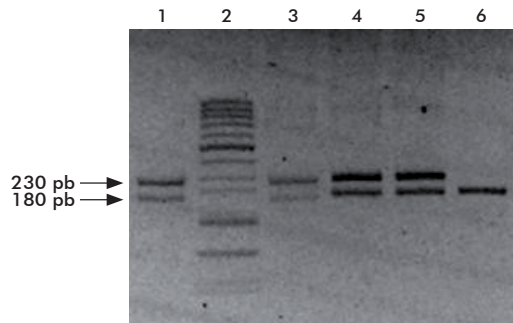


Figura 2. Detección de la mutación L708P, localizada en el exón 8 del gen *atp7b*. Digestión a 37 °C con la enzima *Alu I*, 10 U/μL, visualizado en un gel de agarosa al 2%. Carrileras 1, 3, 4: muestras de pacientes cubanos con el cambio conformacional b, son heterocigóticas para la mutación L708P. Carrilera 2: marcador de peso molecular 50 pb, Invitrogen, número de catálogo: 10416-014. Carrilera 5: control positivo heterocigótico para la mutación L708P. Carrilera 6: paciente que presenta el cambio conformacional a.

Esta mutación resulta de una sustitución de timina por citocina en el gen *atp7b* en la posición 2123, lo cual provoca un cambio del aminoácido de leucina por prolina en la posición 708 de la proteína ATP7B. En Islas Canarias se ha detectado con una frecuencia de 60%, por lo que es la mutación más frecuente en 24 pacientes estudiados [11]. Sin embargo, no ha sido identificada en estudios en otras regiones de España [4, 17]. En Brasil es de 16.7%, por lo que es la segunda mutación más frecuente en 60 pacientes analizados [12]. Es menor que el 1% en 109 pacientes de 13 estados de EE.UU. y Puerto Rico [13]. En los 72 pacientes cubanos estudiados, la frecuencia fue del 2%.

Para concluir el diagnóstico molecular en los tres pacientes en los que se detectó la mutación L708P en estado heterocigótico, hay que determinar la otra mutación heterocigótica causante de la enfermedad de Wilson. Por esta razón se van analizar los otros exones del gen *atp7b*.

En Cuba se dispone una tecnología rápida para el diagnóstico molecular y la determinación de la mutación L708P en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad.

De las 72 muestras estudiadas se detectó una con el cambio conformacional c, que corresponde al mismo patrón electroforético que el control positivo para la mutación 2304DupC en estado heterocigótico (Figura 3). Un paciente que presente esta mutación tiene una inserción de la base nitrogenada (citocina) en la posición 2304 en el gen *atp7b* (lo cual provoca un corrimiento del marco de lectura). La presencia de esta mutación provoca un cambio conformacional en la secuencia que es detectable en la electroforesis por SSCP (Figura 3). La confirmación de este resultado fue mediante la secuenciación (Figura 4), con una frecuencia de 3.3% en Brasil en 60 pacientes estudiados [12] y de 2.6% en Norteamérica [13]. La frecuencia en los 72 pacientes cubanos estudiados es 0.7%.

Por primera vez en Cuba se informan las frecuencias alélicas de dos mutaciones en el gen *atp7b* en 72 pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson.

En este estudio se identificaron tres cambios conformacionales en el exón 8 del gen *atp7b* en los 72

15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

16. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturmiolo GC, et al. Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the Mediterranean population. *Hum Mutat.* 1998;12(2):89-94.

17. Brage A, Tomé S, García A, Carracedo A, Salas A. Clinical and molecular characterization of Wilson disease in Spanish patients. *Hepatol Res.* 2007;37(1):18-26.

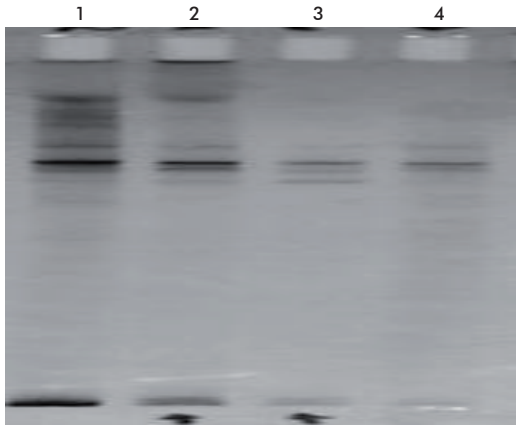


Figura 3. Técnica de polimorfismo conformacional de simple cadena del exón 8 del gen ATP7B en dos pacientes con enfermedad de Wilson. Visualizado en un gel acrilamida al 12,5%. Carrilera 1: control positivo (C-2), homocigótico para la mutación 2304DupC, cambio conformacional d. Carrilera 2: cambio conformacional c. Carrilera 3: control positivo (C-6) heterocigótico para la mutación 2304DupC, cambio conformacional c. Carrilera 4: variante normal, cambio conformacional a. La flecha indica la presencia de cambios conformacionales.

pacientes analizados. De ellos, 67 pacientes presentan la variante normal, tres el cambio conformacional b correspondiente a la mutación L708P en estado heterocigótico, y uno con el cambio conformacional c, correspondiente a la mutación 2304 DupC.

Para concluir el diagnóstico molecular de los pacientes diagnosticados clínicamente, se identificarán mutaciones y polimorfismos, en el resto de los exones

Recibido en enero de 2010. Aprobado en abril de 2011.

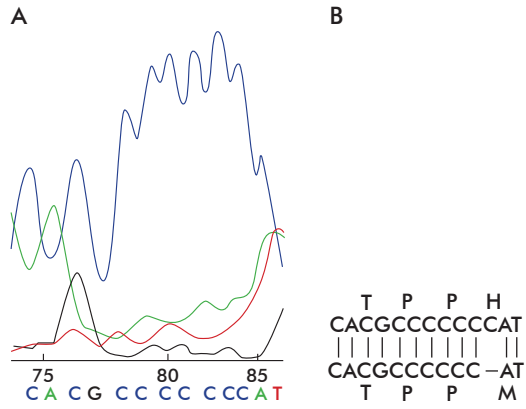


Figura 4. Detección de la mutación 2304 DupC. A) Electroforegrama de la muestra que presenta el cambio conformacional c. Se observa la inserción de una citosina en la posición 2304. B) Fragmento de análisis del programa de alineamiento de secuencia Blast. Se comprueba la inserción de una citosina en la secuencia analizada en la posición 2304.

del gen *atp7b*, sobre todo en aquellos de las diferentes poblaciones estudiadas, con mutaciones más frecuentes.

Agradecimientos

Agradecemos a los pacientes y a sus familias por haber aceptado participar en esta investigación. A Theodor Todorov y Georgios Loudianos por el envío de los controles positivos y por sus aclaraciones teóricas. Agradecemos a Antonio Tugores por sus experiencias en la detección de la mutación L708P. Al Ministerio de Salud Pública.