



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

# **Genética molecular y biomarcadores de la enfermedad de Wilson**

**Ana Sánchez Monteagudo**

TESIS DOCTORAL

Directores:

Dra. Carmen Espinós

Dr. Vincenzo Lupo

**Valencia Abril 2021**



Dña. Carmen Espinós Armero, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Jefa, y D. Vincenzo Lupo, Doctor en Farmacia, Investigador, en la Unidad de Enfermedades Raras Neurodegenerativas del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF),

## **CERTIFICAN**

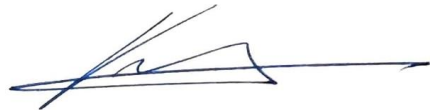
Que Dña. Ana Sánchez Monteagudo, Licenciada en Biotecnología por la Universitat Politècnica de València, ha realizado bajo la codirección de la Dra. Espinós y el Dr. Lupo el trabajo de Tesis Doctoral titulado “Genética molecular y biomarcadores de la enfermedad de Wilson”.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctora.

Valencia, Abril 2021

A handwritten signature in blue ink, consisting of a horizontal line with a stylized, cursive signature above it.

Dra. Carmen Espinós Armero

A handwritten signature in blue ink, consisting of a horizontal line with a stylized, cursive signature above it.

Dr. Vincenzo Lupo



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

Título del proyecto: *“Avanzar en el diagnóstico y la prognosis de la enfermedad de Wilson”*

Duración: 2016-2019

Entidad financiadora: Fundació Per Amor a l'Art (FPAA)

IP: C. Espinós

Título del proyecto: *“Bases genéticas y biomarcadores pronóstico de la enfermedad de Wilson y Wilson-like”*

Duración: 2020-2022

Entidad financiadora: Fundació Per Amor a l'Art (FPAA)

IP: C. Espinós

Título del proyecto: *“Estudios clínicos, bases genéticas y biomarcadores pronóstico en enfermedades raras neurodegenerativas”*

Duración: 2019-2021

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (Expediente: PI18/00147)

IP: C. Espinós

Título del proyecto: *“De genes a terapia en enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares”*

Duración: 2018-2021

Entidad financiadora: Generalitat Valenciana, Programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia (Expediente: PROMETEO/2018/135)

Consortio de investigadores formado por F. V. Pallardó (coordinador), J.M. Millán, I. Galindo, P. Sanz, T. Sevilla y C. Espinós.



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que me acompañaron en esta carrera de fondo. Porque *todos somos contingentes*, pero en concreto, ellos han sido *necesarios* para llegar a la meta.

En primer lugar, querría dar las gracias a mis directores por su paciencia y dedicación, por depositar su confianza en mí desde el inicio para trabajar con ellos, sacar adelante este proyecto y presentar esta Tesis. Por brindarme además la oportunidad de participar en otros, lo que me ha permitido aprender y evolucionar personal y profesionalmente.

A los pacientes y sus familias, por atender y responder positivamente a nuestra llamada y acceder a participar en los estudios realizados. Asimismo, reconocer la labor del personal del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Hospital General D'Elx y Complejo Hospitalario Insular Materno Infantil de Gran Canaria con los que hemos colaborado; su ayuda y apoyo ofrecidos para el reclutamiento de muestras han hecho posible el desarrollo de este proyecto.

A los compañeros que forman o han formado parte del lab I-54, con los que he tenido la suerte de compartir el día a día, nuestras alegrías cuando salían los experimentos y nuestras penas cuando no. En definitiva, muchas horas de trabajo juntos, además de otras vivencias y experiencias fuera de él, que me hacen sentir parte de una familia. Querría dedicar una especial mención a aquellos compañeros del CIPF cuya contribución ha sido esencial en diversos aspectos. A Laura, Virginia y Elo por poder contar con ellas siempre que lo hemos necesitado, he aprendido (y sigo haciéndolo!) mucho con vosotras. De igual forma agradecer a Candela su ayuda y asistencia en el terreno de los Cultivos Celulares, y a Salva Meseguer su enorme paciencia y tesón con los experimentos del Oroboros y su análisis. También dar las gracias al siempre colaborador Paco García, un placer poder contar con tu complicidad como mentor en el apasionante mundo de la Bioinformática.

A mis amigos, aquellos que pertenecen al ámbito científico por compartir momentos de nuestra locura transitoria y desahogo, como a los ajenos a él, que a pesar de no comprenderlo, aun así me animan tanto en los buenos como en los malos momentos. Por último, agradecer a mi familia su apoyo incondicional, por no dejarme caer y creer en mí para llegar hasta aquí cuando ni yo misma lo hacía. En especial a mi madre y mi abuela, todo lo que soy se lo debo a ellas.





## RESUMEN

La enfermedad de Wilson (EW) es un trastorno hereditario del metabolismo del cobre, con una prevalencia estimada de 1/30000, causado por mutaciones en *ATP7B*. Este gen codifica para una proteína transportadora del cobre en el hígado; su mal funcionamiento provoca un fallo en la excreción biliar y la acumulación progresiva de este metal en el organismo, especialmente en hígado y cerebro. La presentación clínica de la EW es diversa: hay individuos que cursan con sintomatología hepática, otros con neurológica o ambos, e incluso pueden ser identificados asintomáticos. Además, se aprecia una amplia variabilidad clínica intra e interfamiliar, por lo que otros factores ambientales y genéticos modificarían el cuadro clínico. Dado que la EW es tratable con quelantes del cobre, es importante lograr un diagnóstico certero y temprano en los pacientes, ya que, en caso de no recibirlos a tiempo, se convierte en un trastorno con mal pronóstico.

### **CAPÍTULO I: ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN GENÉTICA EN PACIENTES CON FENOTIPO CLÍNICO DE EW**

El diagnóstico molecular permite establecer un diagnóstico certero y definitivo en pacientes con sospecha clínica de EW. En primer lugar, se ha abordado el estudio genético de *ATP7B* a diferentes niveles. Se analizó el promotor, regiones codificantes e intrónicas flanqueantes mediante secuenciación directa (Sanger), así como grandes deleciones y duplicaciones por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) en una colección de muestras que comprende 73 casos índice. Con respecto a la serie clínica objeto de estudio en este trabajo, que incluye 34 pacientes pertenecientes a 25 familias evaluados clínicamente con la escala de Leipzig, el estudio se amplió con el análisis en profundidad (incluyendo intrones) de *ATP7B* mediante secuenciación masiva. Se identificaron mutaciones bialélicas en *ATP7B* en 22 casos (88 %) de la serie. De las tres familias restantes, el estudio del exoma reveló que, en una de ellas, ambos hermanos enfermos eran heterocigotos compuestos para c.383T>A (p.G127\*) y c.379G>T (p.I128N) en *CCDC115*, implicado en trastornos congénitos de la glicosilación y asociado a fenotipos *Wilson-like*. Se llevaron a cabo análisis de expresión de variantes en *ATP7B* que alterarían el *splicing* en mRNA procedente de sangre periférica de pacientes portadores así como mediante ensayo de minigenes. De las variantes analizadas, cinco de ellas alterarían el correcto procesado de los transcritos. Adicionalmente, la caracterización de una variante novel en el promotor de *ATP7B* mediante ensayo de luciferasa confirmó una reducción de la actividad del promotor en presencia de dicho cambio.

En las familias fEW-30 y fEW-77, con diagnóstico concluyente de EW que forman parte de la serie clínica estudiada, se registró una clínica dispar en cuanto a gravedad y debut de las manifestaciones clínicas entre hermanos afectados. Por ello, se seleccionaron para el estudio de modificadores genéticos mediante secuenciación de exoma. Centrando el análisis de variantes obtenidas en una selección de genes que participan en el metabolismo del cobre y/o relacionados con *ATP7B*, se identificaron variantes candidatas en heterocigosis en *MYO5B*, *CCDC93* y *COMMD1*. Mediante cribado mutacional de estos

cambios en otros pacientes de la serie, no ha sido posible establecer correlaciones genotipo-fenotipo que expliquen la variabilidad clínica apreciada. En el análisis comparativo de variantes identificadas en la secuenciación del exoma de la familia fEW-30, se detectó en heterocigosis en una de las hermanas el cambio c.1255C>T (p.R419C) en *LMNA*, gen asociado a laminopatías. Se investigó funcionalmente este cambio en fibroblastos de la paciente para conocer si pudiera interferir en el fenotipo EW y ello agravara el cuadro clínico. El análisis de la morfología del núcleo descartó alteraciones de su estructura en presencia de esta mutación, si bien los estudios de la respiración mitocondrial y de inducción de estrés oxidativo mostraron una capacidad limitada de la célula para responder frente a situaciones adversas.

## **CAPÍTULO II: BÚSQUEDA DE miRNAs CIRCULANTES EN PLASMA COMO BIOMARCADORES EN LA EW**

La identificación de marcadores que permitan anticipar la evolución de la enfermedad es crucial para mejorar el tratamiento que reciben los pacientes con EW. Los miRNAs circulantes en plasma correlacionan con su expresión en los tejidos de los que proceden, por lo que son buenos indicadores del estatus de la enfermedad. En este trabajo se ha llevado a cabo la búsqueda de biomarcadores basados en el perfil de miRNAs circulantes en plasma, que sirvan para monitorizar la progresión de la enfermedad en pacientes con EW en tratamiento. El estudio se inició en una primera cohorte de investigación, compuesta por pacientes pareados por edad y sexo con controles sanos, en la que mediante miRNA-seq se identificaron 18 miRNAs sobrerrepresentados en plasma de pacientes. De entre ellos destacan miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p, previamente asociados a distintos aspectos de enfermedad del hígado tales como esteatosis, hepatitis, fibrosis o hepatotoxicidad, además de miR-485-3p, relacionado con el metabolismo del hierro, y miR-340-3p, con el de lípidos e insulina. Para validar los hallazgos obtenidos en el estudio de representación diferencial, se analizó mediante qPCR los niveles en plasma de estos cinco miRNAs en las mismas muestras de la primera cohorte así como en una segunda cohorte independiente de pacientes y controles. En ambas cohortes, se confirmó que miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p estaban incrementados en plasma de pacientes EW y que además correlacionaban con marcadores bioquímicos de función hepática. Sin embargo, el resultado obtenido para miR-485-3p y miR-340-3p fue dispar, al encontrarse disminuidos en plasma de pacientes de la segunda cohorte, por lo que no se pudo concluir su posible implicación en la fisiopatología de la EW. Por último, se exploró la posible utilidad del perfil de miRNAs circulantes compuesto por miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p como biomarcadores de progresión de la enfermedad hepática en pacientes de la primera cohorte aplicando modelos de regresión logística. La evaluación de los modelos obtenidos para cada uno de los tres miRNAs mostró un buen rendimiento para clasificar al grupo de pacientes con factores de evolución desfavorable, por tanto se proponen como candidatos para mejorar el seguimiento clínico o comprobar la efectividad de nuevas terapias en la EW.

## RESUM

La malaltia de Wilson és un trastorn hereditari del metabolisme del coure amb una prevalença de 1/30000, causat per mutacions en *ATP7B*. Aquest gen codifica per a una proteïna transportadora del coure al fetge; el seu mal funcionament produeix alteracions en l'excreció biliar i l'acumulació progressiva de coure, especialment en fetge i cervell. La presentació clínica de la malaltia de Wilson és diversa: alguns individus cursen amb simptomatologia hepàtica, altres són neurològics o presenten les dues formes, o fins i tot poden ser identificats asimptomàtics. A més, s'aprecia una àmplia variabilitat clínica intra e inter-familiar, i per tant, altres factors ambientals i genètics modificarien el quadre clínic. Atès que la malaltia de Wilson és tractable amb quelants del coure, és important tindre un diagnòstic precís com més aviat millor, ja que, en cas de no aconseguir-ho a temps, és converteix en un trastorn amb mal pronòstic.

### **CAPÍTOL I: ESTUDIS DE CARACTERIZACIÓ GENÈTICA EN PACIENTS AMB FENOTIP CLÍNIC DE MALALTIA DE WILSON**

El diagnòstic molecular permet establir un diagnòstic precís i definitiu en pacients amb sospita clínica de malaltia de Wilson. Inicialment, es va abordar l'estudi genètic del gen *ATP7B* a diferents nivells. S'analitzà el promotor, regions codificants e intròniques flanquejants mitjançant seqüenciació directa (Sanger), així com grans delecions i duplicacions per MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) en una col·lecció de mostres que comprèn 73 casos índex. En relació amb la sèrie clínica objecte d'estudi, que inclou 34 pacients pertanyents a 25 famílies avaluats clínicament amb l'escala de Leipzig, l'estudi es va ampliar amb l'anàlisi en profunditat (incloent introns) d'*ATP7B* per seqüenciació massiva. En 22 casos (88 %) de la sèrie, s'identificaren mutacions bial·lèliques en *ATP7B*. De les tres famílies restants, l'estudi de l'exoma va revelar que, en una d'elles, els dos germans malalts eren heterozigots compostos per a c.383T>A (p.G127\*) y c.379G>T (p.I128N) en *CCDC115*, implicat en trastorns congènits de la glicosilació i associat amb fenotips Wilson-like. Es varen dur a terme anàlisis d'expressió de variants en *ATP7B* que alterarien el procés de *splicing* en mRNA de sang perifèrica de pacients portadors i també a través d'assajos de minigens. Addicionalment, la caracterització d'una variant novell en el promotor d'*ATP7B* per mitjà d'assaig de luciferasa va confirmar una reducció de l'activitat del promotor en presència d'aquest canvi.

En les famílies fEW-30 i fEW-77, amb diagnòstic definitiu de malaltia de Wilson que formen part de la sèrie clínica estudiada, es va registrar una clínica dispar quant a gravetat i debut dels símptomes entre germans afectats. És per això que els triaren per a l'estudi de modificadors genètics mitjançant la seqüenciació de l'exoma. Focalitzant l'anàlisi de variants detectades en una selecció de gens que participen en el metabolisme del coure i relacionats amb *ATP7B*, s'identificaren variants candidates en heterozigosi en *MYO5B*, *CCDC93* i *COMMD1*. El cribratge genètic d'aquestes variants en altres pacients de la sèrie no ha fet possible establir correlacions genotip-fenotip que expliquen la variabilitat clínica observada. En l'anàlisi comparatiu de variants identificades en la seqüenciació de l'exoma

de la família fEW-30 es detectà en heterozigosi en una de les germanes el canvi c.1255C>T (p.R419C) en *LMNA*, gen associat a laminopaties. S'investigà funcionalment aquesta mutació en fibroblasts de la pacient per tal de saber si poguera interferir en el fenotip de la malaltia de Wilson agreujant el quadre clínic. L'anàlisi de la morfologia del nucli descartà alteracions en l'estructura en presència d'aquesta mutació, si bé els estudis de respiració mitocondrial i d'inducció d'estrès oxidatiu mostraren una capacitat limitada de la cèl·lula per respondre a situacions adverses.

## **CAPÍTOL II: ANÀLISI DE miRNAs CIRCULANTS EN PLASMA COM A BIOMARCADORS EN LA MALALTIA DE WILSON**

La identificació de marcadors que permeten anticipar l'evolució de la malaltia és crucial per millorar el tractament que reben els pacients amb malaltia de Wilson. Els miRNAs circulants en plasma correlacionen amb la seua expressió en els teixits de procedència, la qual cosa fa que siguin bons indicadors de l'estatus de la malaltia. En aquest treball s'ha dut a terme la determinació d'un perfil de miRNAs circulants en plasma, que puga ser útil per monitoritzar l'evolució de la patologia en pacients amb malaltia de Wilson en tractament. L'estudi es va iniciar en una primera cohort d'investigació, conformada per pacients i controls emparellats per edat i sexe, en la qual per miRNA-seq s'identificaren 18 miRNAs incrementats en plasma de pacients. D'entre ells destaquen miR-122-5p, miR-192-5p i miR-885-5p, prèviament associats a diferents aspectes d'afectació hepàtica com esteatosi, hepatitis, fibrosi o toxicitat, a més de miR-485-3p, relacionat amb el metabolisme del ferro, i miR-340-3p, amb el de lípids i insulina. Per validar el resultat obtingut en l'estudi de representació diferencial, s'analitzaren per qPCR els nivells en plasma d'aquests cinc miRNAs en les mateixes mostres de la primera cohort i en una segona cohort independent de pacients i controls. En ambdues cohorts, es va confirmar l'increment de miR-122-5p, miR-192-5p i miR-885-5p en plasma de pacients, així com que correlacionaven amb marcadors bioquímics de funció hepàtica. No obstant, el resultat obtingut per a miR-485-3p i miR-340-3p va ser diferent al estar disminuïts en plasma de pacients de la segona cohort, de manera que no es pot concloure una possible implicació d'estos miRNAs en la fisiopatologia de la malaltia de Wilson. Per últim, es va explorar la possible utilitat del perfil de miRNAs circulants representat per miR-122-5p, miR-192-5p i miR-885-5p com biomarcadors de progressió de la patologia hepàtica en pacients de la primera cohort aplicant models de regressió logística. L'avaluació dels models obtinguts per a cadascun dels tres miRNAs va mostrar un bon rendiment per a classificar al grup de pacients amb factors d'evolució desfavorable, en conseqüència, es proposen com a candidats per tal de millorar el seguiment clínic o comprovar l'efectivitat de noves teràpies en la malaltia de Wilson.

## **ABSTRACT**

Wilson disease (WD) is an inherited disorder of copper metabolism with a 1 in 30000 prevalence, caused by mutations in *ATP7B*, which encodes for a liver copper-transporting protein. The *ATP7B* dysfunction causes a deficit in biliary copper excretion and a progressive accumulation of this metal in the organism, mainly in liver and brain. There is a great variability in WD's clinical presentation, ranging from hepatic manifestations to neurological or both, and even asymptomatic individuals. Moreover, intra and inter-familial variability is observed, and therefore, genetic and environmental factors could modify clinical phenotype. As WD is a treatable disorder with copper chelators, to achieve an early definitive diagnosis in patients is required; otherwise, it could become in a poor prognosis condition.

### **CHAPTER I: GENETIC CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH WD CLINICAL PHENOTYPE**

The molecular diagnosis allows an early and conclusive diagnosis in patients with clinical suspicions of WD. The genetic analysis of *ATP7B* was address at different levels in a collection comprising 73 index cases. First, coding exons, exon/intron boundaries and promoter region were genotyped by direct sequencing (Sanger), and large deletions and duplications by MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) were analysed. Regarding to clinical series of interest in this work, including 34 patients belonging to 25 families clinically evaluated with the Leipzig score system, genetic studies also included the study of the whole *ATP7B* (including introns and regulatory regions) by targeted enrichment and massive sequencing. Biallelic *ATP7B* mutations were detected in 22 probands (88%). The three remaining families were investigated by exome sequencing, and in one of them, both affected siblings resulted to be compound heterozygous for c.383T>A (p.G127\*) and c.379G>T (p.I128N) in *CCDC115*, involved in a congenital disorder of glycosylation and linked to Wilson-like phenotypes. To characterize splicing variants in *ATP7B*, analysis of mRNA isolated from carrier patients peripheral blood sample as well as minigene assays were performed. For five of the studied variants, alterations of proper mRNA splicing were detected. Additionally, luciferase reporter assay showed a reduction of *ATP7B* promoter activity in presence of a novel mutation in this region.

In families fEW-30 and fEW-77, with definitive diagnosis of WD belonging to the characterised clinical series of interest, discordances concerning severity and onset of symptoms between affected siblings were noticed. For this reason, both families were chosen for the study of genetic modifiers and investigated by exome sequencing. Focusing variant analysis on genes involved in copper metabolism and related to *ATP7B*, heterozygous candidate variants in *MYO5B*, *CCDC93* and *COMMD1* were identified. Mutational screening of these variants in selected patients was carried out, but genotype-phenotype correlations which could explain observed clinical variability were not possible. Comparative analysis of variants identified in exome sequencing of family fEW-30 revealed that one of the affected siblings is an heterozygous carrier of *LMNA* c.1255C>T (p.R419C), gene associated to laminopathies. Functional studies on patient's fibroblasts were

performed to explore if this variant could interfere with WD phenotype thus aggravating clinical presentation. In presence of this mutation, nuclear morphology analyses discarded structural alterations; although, studies of mitochondrial respiration and induction of oxidative stress reported cell limitations to cope with adverse situations.

## **CHAPTER II: CIRCULATING miRNAs PROFILING IN PLASMA AS BIOMARKERS IN WD**

Identification of biomarkers to anticipate disease progression is crucial to improve therapies in WD patients. Circulating miRNAs levels in plasma are good indicators of disease status, as they correlate well with its expression in source tissues. In this work, circulating miRNAs profiling in plasma has been accomplished to identify biomarkers that could serve to monitor disease progression in WD patients under chelation therapy. Initially, miRNA-seq was performed in a discovery cohort including patients and healthy controls paired by sex and age, identifying 18 miRNAs increased in plasma from patients. Some of them stood out: miR-122-5p, miR-192-5p and miR-885-5p were previously associated with different aspects of liver disease (steatosis, hepatitis, fibrosis and toxicity), miR-485-3p participates in iron metabolism, and miR-340-3p in lipids and insulin metabolism. To corroborate results obtained in differential representation analysis, plasma levels of these five miRNAs were assessed by qPCR in samples from the discovery cohort as well as in an independent validation cohort. In both studied cohorts, it was confirmed that miR-122-5p, miR-192-5p and miR-885-5p were induced in plasma from WD patients and showed strong correlation with biochemical liver function markers. Nevertheless, uneven outcome was drawn for miR-485-3p and miR-340-3p because of being decreased in patient's plasma samples from the validation cohort, hence its implication in WD pathophysiology could not be established. Finally, value of circulating miR-122-5p, miR-192-5p and miR-885-5p profile as disease progression biomarkers was estimated in discovery cohort patients by means of logistic regression models. Developed models for each miRNA exhibited good performance classifying patients with poor outcome factors, consequently, these three miRNAs are proposed as candidates to improve clinical follow-up or to support efficacy of novel therapies in WD.

..

## ÍNDICE

<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1. La enfermedad de Wilson (EW) .....	11
1.1 Aspectos clínicos .....	12
1.1.1 Enfermedad hepática .....	12
1.1.2 Enfermedad neurológica y psiquiátrica .....	12
1.1.3 Otras manifestaciones clínicas.....	13
1.2 Métodos diagnósticos.....	14
1.3 Tratamiento y pronosis .....	19
2. <i>ATP7B</i> , gen implicado en la enfermedad de Wilson .....	21
2.1 Genética de <i>ATP7B</i> .....	22
2.2 Papel de <i>ATP7B</i> en la homeostasis del cobre en los hepatocitos .....	24
2.3 Efecto de mutaciones en <i>ATP7B</i> sobre su función.....	26
2.4 Patogénesis de la toxicidad por cobre .....	27
3. Epidemiología clínica y genética .....	28
4. Factores modificadores de la enfermedad de Wilson .....	30
5. Biomarcadores .....	33
5.1 Biomarcadores en la enfermedad de Wilson y fenotipos relacionados .....	33
5.2 Potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores .....	37
<b>CAPÍTULO I: ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN GENÉTICA EN PACIENTES CON FENOTIPO CLÍNICO DE EW . 41</b>	
Hipótesis y Objetivos del Capítulo I .....	43
Resultados .....	45
1. Cribado mutacional de <i>ATP7B</i> y otros genes implicados en enfermedades hepáticas relacionadas .....	45
1.1 Serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’ Elx.....	46
1.1.1 Variantes identificadas en <i>ATP7B</i> mediante secuenciación directa y MLPA .....	47
1.1.2 Estudio completo del gen <i>ATP7B</i> mediante enriquecimiento dirigido y secuenciación masiva .	49
1.1.3 Secuenciación de exoma .....	53
1.1.4 Resultados globales de la serie .....	55
1.2 Cribado mutacional en pacientes de diferentes series.....	56
2. Estudios funcionales de expresión y regulación de variantes en <i>ATP7B</i> .....	60
2.1 Caracterización de variantes de <i>splicing</i> en mRNA de sangre periférica y mediante ensayo de minígenos .....	60
2.2 Análisis de expresión de variantes en la región promotora.....	64
3. Análisis de modificadores genéticos.....	65
3.1 Cribado mutacional en genes implicados en el metabolismo del cobre .....	66
3.1.1 Correlación genotipo-fenotipo .....	67
3.2 Cribado mutacional en otros genes asociados a patología .....	69
3.2.1 Caracterización funcional de LMNA p.R419C en fibroblastos .....	70
Discusión .....	79
Conclusiones.....	97

<b>CAPÍTULO II: BÚSQUEDA DE miRNAs CIRCULANTES EN PLASMA COMO BIOMARCADORES EN LA EW .....</b>	<b>99</b>
Hipótesis y Objetivos del Capítulo II .....	101
Resultados.....	103
1. Características de las poblaciones de estudio .....	103
2. Determinación de miRNAs circulantes en plasma mediante miRNA-seq .....	105
2.1 Análisis primario .....	105
2.2 Análisis de representación diferencial.....	106
2.3 Caracterización mediante enriquecimiento funcional .....	108
3. Perfil de miRNAs circulantes candidatos en plasma como biomarcadores .....	109
3.1 Primera cohorte de investigación.....	110
3.2 Segunda cohorte de validación .....	115
Discusión .....	119
Conclusiones .....	131
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>133</b>
1. Sujetos del estudio .....	135
1.1 Serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d'Elx .....	135
1.2 Otros pacientes estudiados .....	135
1.3 Obtención de DNA genómico desde muestra biológica .....	136
2. Análisis mutacional del gen <i>ATP7B</i> y otros genes implicados en enfermedades hepáticas relacionadas	137
2.1 Estudios genéticos basados en secuenciación directa (Sanger) y MLPA .....	137
2.1.1 Diseño de <i>primers</i> para amplificación por PCR y secuenciación directa .....	137
2.1.2 Estudio de la dosis génica mediante MLPA .....	138
2.2 Estudios genéticos basados en técnicas NGS .....	138
2.2.1 Análisis de <i>ATP7B</i> mediante enriquecimiento dirigido y secuenciación masiva .....	138
2.2.2 Secuenciación de exoma .....	139
2.3 Análisis bioinformáticos .....	140
2.3.1 Análisis de las secuencias obtenidas mediante secuenciación directa (Sanger) .....	140
2.3.2 Identificación de variantes en número de copia (CNVs) mediante análisis de fragmentos .....	140
2.3.3 <i>Pipeline</i> para análisis primario de datos de secuenciación masiva de <i>ATP7B</i> .....	141
2.3.4 <i>Pipeline</i> para anotación de variantes identificadas en secuenciación masiva .....	142
2.3.5 Filtrado, priorización e interpretación de variantes.....	143
3. Caracterización funcional de variantes en <i>ATP7B</i> .....	145
3.1 Cultivos celulares.....	145
3.2 Análisis de la expresión de variantes de <i>splicing</i> en mRNA de pacientes .....	146
3.3 Análisis de la expresión de variantes de <i>splicing</i> mediante ensayo de minigenes .....	146
3.4 Ensayo de la actividad luciferasa de variantes en la región promotora .....	147
4. Análisis de modificadores genéticos .....	148
4.1 Secuenciación de exoma y análisis bioinformáticos.....	148
4.2 Cribado mutacional de genes y variantes candidatas mediante secuenciación directa .....	148
4.3 Estudios funcionales para la caracterización de LMNA p.R419C .....	149
4.3.1 Cultivos celulares.....	149
4.3.2 Inmunofluorescencia.....	149
4.3.3 Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y ensayo de viabilidad .....	150
4.3.4 Estudio de la respiración y producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitocondrial .....	150
4.3.5 Análisis de expresión de genes con función antioxidante mediante PCR cuantitativa (qPCR) ..	152



5. Estudio de miRNAs circulantes en plasma .....	153
5.1 Población de estudio.....	153
5.2 Extracción de RNA total circulante .....	154
5.3 Preparación de librerías de small-RNA y secuenciación masiva .....	154
5.4 Análisis bioinformáticos .....	156
5.4.1 Análisis primario .....	156
5.4.2 Análisis de representación diferencial y enriquecimiento funcional .....	157
5.5 Validación de miRNAs circulantes en plasma mediante qPCR.....	157
5.6 Análisis estadísticos .....	159
<b>ANEXOS .....</b>	<b>161</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>183</b>

## LISTADO DE FIGURAS

Figura I1: Cronología de contribuciones clave en el conocimiento de la EW .....	11
Figura I2: Anillo de Kayser-Fleischer (K-F).....	13
Figura I3: Histología en muestra de biopsia de hígado en pacientes con la EW. ....	17
Figura I4: Resonancia Magnética Nuclear (RMN) cerebral en pacientes con la EW. ....	18
Figura I5: Representación esquemática de los dominios de ATP7B. ....	21
Figura I6: Ciclo catalítico de ATP7B. ....	22
Figura I7: Distribución del cobre en el hepatocito. ....	25
Figura I8: Distribución geográfica de mutaciones prevalentes en <i>ATP7B</i> .....	30
Figura I9: Esquema de la biogénesis de los miRNAs en la célula. ....	38
Figura R1.1: Colección de muestras para estudio genético de la EW y su distribución según el lugar de procedencia de la muestra.....	45
Figura R1.2: Perfil al diagnóstico de los pacientes reclutados en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’ Elx.....	46
Figura R1.3: Variantes patológicas (P) y probablemente patológicas (PP) caracterizadas en <i>ATP7B</i> mediante secuenciación directa y MLPA en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’ Elx.....	48
Figura R1.4: Familias con tres variantes detectadas en <i>ATP7B</i> .....	48
Figura R1.5: Caracterización de la delección en el cromosoma 13 detectada en EW24 mediante secuenciación masiva. ....	51
Figura R1.6: Variantes identificadas en fEW-12 mediante diferentes estrategias de análisis genético de <i>ATP7B</i> (secuenciación directa y masiva). ....	52
Figura R1.7: Familias investigadas mediante secuenciación de exoma. ....	53
Figura R1.8: Análisis de las variantes identificadas en <i>CCDC115</i> . ....	55
Figura R1.9: Resumen del análisis genético de <i>ATP7B</i> en los 25 casos índice de la serie clínica H. U. Insular Materno-Infantil – H. U. de Gran Canaria Dr. Negrín.....	56
Figura R1.10: Resumen del estudio genético de <i>ATP7B</i> realizado en 27 casos índice procedentes de diferentes centros hospitalarios.....	58
Figura R1.11: Casos singulares con diagnóstico genético de la EW. ....	59
Figura R1.12: Análisis de transcritos de variantes de <i>splicing</i> .....	61
Figura R1.13: Análisis del cambio c.2447+1G>T.....	62
Figura R1.14: Análisis de c.2865+467A>G. ....	63
Figura R1.15: Análisis <i>in vitro</i> de la variante c.-447C>T .....	65
Figura R1.16: Familias con mutaciones patológicas en <i>ATP7B</i> estudiadas mediante secuenciación de exoma para el análisis de modificadores genéticos .....	65
Figura R1.17: Distribución de variantes identificadas en 65 genes relacionados en el metabolismo del cobre .....	66
Figura R1.18: Análisis de la variante p.R419C identificada en LMNA. ....	70
Figura R1.19: Análisis de la morfología nuclear en fibroblastos portadores de LMNA p.R419C .....	71
Figura R1.20: Evaluación del efecto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la viabilidad celular de fibroblastos portadores de LMNA p.R419C.....	72
Figura R1.21: Análisis del perfil de consumo de O <sub>2</sub> (OCR) y producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de fibroblastos LMNA p.R419C en célula intacta.....	74

Figura R1.22: Análisis del perfil de consumo de O <sub>2</sub> (OCR) y producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de fibroblastos LMNA p.R419C en célula permeabilizada.....	76
Figura R1.23: Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo en fibroblastos LMNA p.R419C mediante PCR cuantitativa (qPCR).....	77
Figura R2.1: Control del procesamiento de lecturas obtenidas mediante miRNA-seq en las 40 muestras de la primera cohorte de investigación. ....	106
Figura R2.2: Concordancia de miRNAs maduros detectados en muestras de plasma de pacientes entre las cuatro estrategias de análisis de representación diferencial.....	107
Figura R2.3: Validación del perfil de miRNAs circulantes en plasma mediante PCR cuantitativa (qPCR) en muestras de la primera cohorte de investigación.....	111
Figura R2.4: Evaluación del rendimiento de los modelos de regresión logística simple para predecir el riesgo de progresión hepática.....	114
Figura R2.5: Validación del perfil de miRNAs circulantes en plasma mediante PCR cuantitativa (qPCR) en muestras de la segunda cohorte de validación.....	117
Figura M1: Esquema del protocolo de NEBNext para preparación de librerías de small-RNA.....	155

## LISTADO DE TABLAS

Tabla I1: Escala diagnóstica desarrollada en la 8ª Reunión Internacional sobre la EW.....	19
Tabla I2: Tipos de variantes descritas en <i>ATP7B</i> y su frecuencia.....	23
Tabla R1.1: Evaluación de la cobertura, enriquecimiento y <i>variant calling</i> de la herramienta NGS.....	49
Tabla R1.2: Regiones con cobertura <20x en <i>ATP7B</i> .....	50
Tabla R1.3: Haplotipo del locus <i>ATP7B</i> construido con los SNPs detectados en el cribado mutacional de los pacientes de la familia fEW-60.....	53
Tabla R1.4: Predicción <i>in silico</i> de <i>ATP7B</i> c.-447C>T.....	64
Tabla R1.5: Variantes candidatas en genes del metabolismo del cobre relacionados con <i>ATP7B</i> .....	67
Tabla R1.6: Resultado del cribado mutacional en 12 pacientes seleccionados y su descripción clínica.....	68
Tabla R1.7: Otras variantes detectadas en la ampliación del cribado mutacional en genes implicados en el metabolismo del cobre relacionados con <i>ATP7B</i> .....	69
Tabla R2.1: Características clínicas y demográficas de los grupos de pacientes.....	103
Tabla R2.2: Características demográficas de los grupos de individuos control.....	105
Tabla R2.3: miRNAs maduros significativamente desregulados en plasma de pacientes mediante el método QLF en los diseños 1 y 2.....	108
Tabla R2.4: Rutas de señalización y otros procesos biológicos de interés significativamente desregulados por los 18 miRNAs sobrerrepresentados en el grupo de pacientes de la primera cohorte de investigación.....	109
Tabla R2.5: Parámetros de los modelos de regresión logística para predecir el riesgo de progresión hepática.....	113
Tabla M1: Filtros de calidad aplicados a variantes de tipo SNPs y a pequeñas inserciones/deleciones ( <i>indels</i> ).....	142
Tabla M2: Parámetros utilizados para el alineamiento con Bowtie de lecturas de 16-28 pb frente a miRNAs precursores.....	156
Tabla M3: Sondas <i>TaqMan Advanced</i> utilizadas para la validación de miRNAs circulantes mediante qPCR	158



## ABREVIATURAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADP	Adenosín difosfato
AIC	Criterio de informacion de Akaike ( <i>Akaike information criterion</i> )
ALT	Alanino aminotransferasa
Apo-Cp	Apoceruloplasmina
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	Área bajo la curva ( <i>Area under the curve</i> )
BAM	<i>Binary alignment map</i>
BED	<i>Browser extensible data</i>
BT	Bilirrubina total
CCCC	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
CNV	Variantes en número de copias ( <i>Copy number variant</i> )
Cp	Ceruloplasmina
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cu	Cobre
CuEXC	Cobre intercambiable ( <i>Exchangeable copper</i> )
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato
ESE	Elemento activador de <i>splicing</i> ( <i>Exonic splicing enhancer</i> )
ESS	Elemento silenciador de <i>splicing</i> ( <i>Exonic splicing silencer</i> )
ETS	Cadena de transporte de electrones ( <i>Electron transfer system</i> )
FA	Fosfatasa alcalina
FBS	Suero fetal bovino ( <i>Fetal bovine serum</i> )
FC	<i>Fold change</i>
FDR	Probabilidad error tipo I ( <i>False discovery rate</i> )
FFE	Secuencia gradiente de eco ( <i>Fast field echo</i> )
FHA	Fallo hepático fulminante
FLAIR	Recuperación de la inversión atenuada de fluido ( <i>Fluid-attenuated inversion recovery</i> )
FPN	Ferroportina
GATK	<i>Genome analysis toolkit</i>
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GRCh37/hg19	Genoma humano de referencia versión 37 ( <i>Human genome reference consortium version 37</i> )
GRCh38/hg38	Genoma humano de referencia versión 38 ( <i>Human genome reference consortium version 38</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HDL	Lipoproteína de alta densidad ( <i>High-density lipoprotein</i> )
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
Holo-Cp	Holoceruloplasmina
HSC	Células hepáticas estrelladas ( <i>Hepatic stellate cells</i> )
LDL	Lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low-density lipoprotein</i> )
LEC	Long-Evans Cinnamon (modelo de rata proveniente de mutación espontánea en <i>Atp7b</i> )

LMNA	Lamina A/C
LRT	<i>Likelihood ratio test</i>
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
miRNA	microRNA
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mRNA	RNA mensajero
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTs	Metalotioneínas
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico ( <i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> )
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica ( <i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> )
NCC	Cobre no unido a ceruloplasmina ( <i>Non-bound ceruloplasmin copper</i> )
NCR	Contorno del núcleo ( <i>Nuclear contour ratio</i> )
NGS	Secuenciación de nueva generación ( <i>Next-generation sequencing</i> )
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OCR	Perfil de consumo de oxígeno ( <i>Oxygen consumption rate</i> )
OD	Densidad óptica ( <i>Optical density</i> )
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehído
QLF	<i>Quasi-likelihood F test</i>
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplásmico
REC	Cobre intercambiable relativo ( <i>Relative exchangeable copper</i> )
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA ( <i>RNA-induced silencing complex</i> )
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )
rpm	revoluciones por minuto
R <sub>s</sub>	Coefficiente de correlación ( <i>rho</i> ) de Spearman
SNP	Polimorfismos de una sola base ( <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
SNV	Variante de una sola base ( <i>Single nucleotide variant</i> )
SOD	Superóxido dismutasa
T <sub>a</sub>	Temperatura de anillamiento ( <i>Annealing temperature</i> )
TAE	Tris-acetato-EDTA
TGN	Red trans-golgi ( <i>Trans-golgi network</i> )
THO	Trasplante hepático ortotópico
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión ( <i>Melting temperature</i> )
TTM	Tetratiomolibdato
VCF	<i>Variant call format</i>
VUS	Variante de significado incierto ( <i>Variant of unknown significance</i> )
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>Very low-density lipoprotein</i> )
XPO5	Exportina 5

# INTRODUCCIÓN



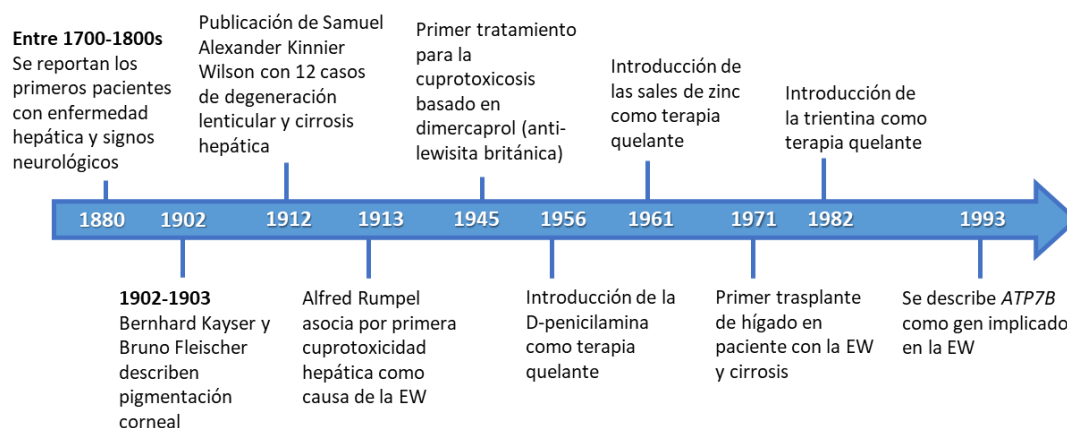


## 1. La enfermedad de Wilson (EW)

La enfermedad de Wilson (EW; MIM: 277900) es un trastorno autosómico recesivo que afecta al metabolismo del cobre, metal que se acumula en los tejidos, principalmente en hígado y cerebro. Esta enfermedad está causada por mutaciones en el gen *ATP7B*, que codifica para un transportador de cobre que se encarga de la excreción biliar de éste y de su incorporación en la ceruloplasmina, que es la principal proteína transportadora de cobre en la sangre.

La EW debe su nombre al neurólogo británico Samuel Alexander Kinnier Wilson, quien la describió en detalle por primera vez en su tesis doctoral como “degeneración lenticular progresiva acompañada de cirrosis en el hígado” (Wilson, 1912). En el manuscrito se recogen cuatro casos supervisados por él, dos casos que obtuvo de los registros del *National Hospital* (Queen Square, Londres) y otros seis previamente publicados (Homén, 1890; Ormerod, 1890; Gowers, 1906). En todos ellos se observaron movimientos involuntarios, espasticidad, disartria y problemas mentales transitorios, junto con cirrosis avanzada en el hígado.

En la primera mitad del siglo XX, diferentes investigadores realizaron importantes contribuciones al conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad (Figura I1). Destacan las aportaciones de Rumpel, quien por primera vez reportó exceso de cobre en el hígado de un paciente con EW, resultado ratificado posteriormente por Cumings, estableciendo que la acumulación de cobre en hígado y ganglio basal son la base etiológica de la enfermedad, lo que aceleró el desarrollo de terapias quelantes (Rumpel, 1913; Cumings, 1948). En menos de 50 años desde su descubrimiento, la EW se convirtió en la primera enfermedad hereditaria crónica del hígado que disponía de un tratamiento específico, que permite frenar el avance de los síntomas y por tanto, disminuir la letalidad (Kerkar and Roberts, 2019a).



**Figura I1: Cronología de contribuciones clave en el conocimiento de la EW** (Adaptada de Mohr et al., 2019)

## 1.1 Aspectos clínicos

La EW es un trastorno multisistémico con sintomatología muy variable, en el que predomina la afectación hepática y neurológica. Aunque puede ser diagnosticada a cualquier edad, la mayoría de casos se concentran entre los 5 y 35 años, existiendo mayor prevalencia de enfermedad hepática en edad infantil y adolescencia, mientras que en edad adulta es más frecuente el debut con manifestaciones neurológicas (Rosencrantz and Schilsky, 2011).

### 1.1.1 Enfermedad hepática

Cualquier tipo de alteración relacionada con el hígado puede ser identificada en pacientes con la EW antes de que aparezcan signos neurológicos. Existe un amplio espectro de formas de presentación hepáticas, desde estadios presintomáticos en los que únicamente se observan alteraciones bioquímicas relacionadas con daño hepático, hasta estadios más avanzados de hepatitis no vírica, cirrosis, o fallo hepático agudo (FHA) (Patil *et al.*, 2013).

Los primeros síntomas de enfermedad hepática aparecen frecuentemente en la primera década de vida y la adolescencia, siendo los más comunes elevación persistente de transaminasas, ictericia, fatiga y náuseas, seguidos de ascitis, esplenomegalia y hepatomegalia (Boga and Ala, 2017). Los pacientes también pueden presentar anemia hemolítica no inmunitaria, asociada a enfermedad hepática avanzada, como resultado de la liberación al torrente sanguíneo del cobre almacenado en los hepatocitos por muerte celular (Pfeiffer, 2007). Una de las formas de presentación más grave es el FHA, descrito en algunas series de EW hasta en el 12% de los casos, con una mayor incidencia en mujeres que en hombres (4:1) (Rosencrantz and Schilsky, 2011). En estos casos, el trasplante hepático es prioritario para la supervivencia del paciente, ya que pueden desarrollar encefalopatía acompañada de edema cerebral (Vierling and Sussman, 2019). Muchos pacientes en edad adulta presentan signos de cirrosis, compensada o descompensada, con hipertensión portal, e incluso el cuadro clínico observado es compatible con hepatitis autoinmune, sobre todo en niños y adolescentes (Milkiewicz *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Enfermedad neurológica y psiquiátrica

La EW neurológica comprende todo el espectro de trastornos del movimiento como resultado de la degeneración de los ganglios basales. Las manifestaciones neurológicas de la EW en edad infantil son menos frecuentes, sin embargo, pueden comenzar a observarse en adolescentes con baja adherencia al tratamiento (Kerkar and Roberts, 2019b). En adultos con presentación neurológica inicial, se asume una enfermedad hepática subyacente que ha cursado asintomática, y en ocasiones, puede ocurrir que ambos tipos

de afectación aparezcan simultáneamente (Patil *et al.*, 2013). Los signos neurológicos más frecuentes son temblor, distonía, parkinsonismo y disartria, que pueden ir acompañados de alteraciones de la marcha y disfagia, entre otros. La afectación neurológica puede evolucionar de forma lenta y progresiva durante años, o puede desarrollarse rápidamente hasta llegar a incapacitar al paciente en pocos meses.

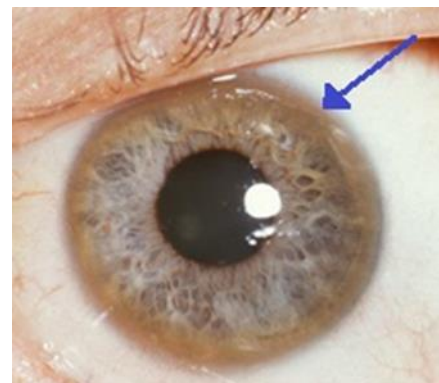
Otras alteraciones neurológicas descritas en pacientes con la EW con menor frecuencia, por lo que se desconoce su frecuencia y relevancia, son: epilepsia, neuropatía (como consecuencia del fallo hepático o de la deficiencia de cobre inducida por el tratamiento), síndrome de piernas inquietas, alteraciones del sueño, mioclonías, síndrome piramidal o pérdida del olfato y del gusto (Członkowska *et al.*, 2018).

Los síntomas psiquiátricos secundarios al deterioro neurológico son frecuentes en pacientes con la EW. Suelen pasar desapercibidos en los estadios iniciales de la enfermedad, razón por la cual el diagnóstico se retrasa (Aggarwal and Bhatt, 2019). En adolescentes se observan cambios de conducta (irritabilidad, desinhibición), desestabilidad emocional y bajo rendimiento académico, mientras que pacientes adultos pueden mostrar trastornos de personalidad, depresión, ansiedad, psicosis y esquizofrenia (Rosencrantz and Schilsky, 2011).

### 1.1.3 Otras manifestaciones clínicas

Cuando la concentración de cobre en el hígado es excesiva, este metal es liberado al torrente sanguíneo en su forma libre, no unido a ceruloplasmina (NCC; *non ceruloplasmin bound copper*). Por esta razón, el cobre se deposita en otros órganos, principalmente cerebro, riñón, córnea y huesos, lo que origina la aparición de otros síntomas, algunos poco frecuentes, que pueden facilitar el diagnóstico de la EW.

El anillo de Kayser-Fleischer (K-F) es un signo característico de la EW (Figura 12). Aparece como consecuencia de la formación de depósitos de cobre en la membrana de Descemet, una de las seis capas que forman la córnea. Es un signo que se detecta en más del 90% de pacientes con presentación neurológica y/o psiquiátrica, pero sólo en el 50% de enfermos con sintomatología hepática, y raramente en asintomáticos. El anillo de K-F no es considerado por algunos autores como un signo patognomónico de la EW, ya que también puede estar presente en otras enfermedades colestáticas como la cirrosis biliar primaria (Rosencrantz and Schilsky, 2011).



**Figura 12: Anillo de Kayser-Fleischer (K-F).** Imagen de Herbert L. Fred, MD y Hendrik A. van Dijk. Licencia Creative Commons BY 3.0

El cobre no unido a ceruloplasmina circulante en suero es filtrado en los riñones y se excreta en la orina. Sin embargo, este metal se acumula en el parénquima renal causando problemas renales, como acidosis, aminoaciduria e incluso, cálculos renales (Zhuang *et al.*, 2008). Los pacientes con la EW también pueden presentar problemas óseos como osteoporosis, fracturas espontáneas y osteoartritis; esto último a causa de la formación de depósitos de cobre en el cartílago y la membrana sinovial en las articulaciones. La acumulación de este metal en el miocardio puede causar arritmias y otras cardiomiopatías. Por último, otras manifestaciones clínicas poco frecuentes incluyen hipoparatiroidismo (por depósito de cobre en las glándulas paratiroides), pancreatitis, amenorrea y abortos recurrentes (Członkowska *et al.*, 2018; Dzieżyc-Jaworska *et al.*, 2019).

### 1.2 Métodos diagnósticos

Como se ha mencionado anteriormente, la presentación clínica de la EW es muy variable, por lo que en muchas ocasiones, es necesaria la combinación de hallazgos clínicos y determinaciones bioquímicas para establecer un diagnóstico. A continuación se describen los test diagnósticos que, de rutina, se utilizan para evaluar a los pacientes.

#### ***Ceruloplasmina***

La ceruloplasmina se encarga de transportar entre el 75-90% del cobre circulante en la sangre. Esta proteína, sintetizada por los hepatocitos, se denomina apoceruloplasmina (Apo-Cp) en su forma inactiva, y es capaz de unir entre seis y ocho átomos de cobre, convirtiéndose a su forma activa denominada holoceruloplasmina (Holo-Cp). La Holo-Cp tiene actividad ferroxidasa, permitiendo que la transferrina transporte el hierro en su forma férrica en la sangre. ATP7B se encarga de transferir el cobre a la Apo-Cp, y si este evento no tiene lugar, será rápidamente degradada debido a su baja estabilidad.

Para medir los niveles de ceruloplasmina circulantes, los métodos inmunológicos son los más extendidos en los laboratorios de diagnóstico clínico con respecto a los enzimáticos, a pesar de que podrían sobrestimar la medición al no tener capacidad de distinguir entre Apo-Cp y Holo-Cp. El valor de referencia establecido para el ensayo enzimático oscila entre 0,15 y 0,20 g/L; mediciones por debajo de 0,20 g/L son sugestivos de EW (Mak, 2019).

El nivel de ceruloplasmina puede verse alterado por diversos motivos. Éste tiende a aumentar en caso de inflamación o infección, durante el embarazo y como consecuencia de tratamiento con estrógenos. Por otra parte, individuos portadores de una única mutación deletérea en *ATP7B*, ocasionalmente pueden presentar un nivel de ceruloplasmina por debajo del valor de referencia. Otros motivos relacionados con nivel bajo de ceruloplasmina son problemas de malabsorción, hepatitis fulminante o aceruloplasminemia causada por mutaciones en *CP*. Por todo ello, se cuestiona el valor

predictivo de la ceruloplasmina por sí sola para el diagnóstico de la EW. En pacientes neurológicos se encuentra significativamente disminuida en todos los casos, mientras que en pacientes hepáticos, pueden presentar niveles normales hasta en el 50% de los casos (Patil *et al.*, 2013).

### **Cobre sérico**

Se considera como cobre sérico total tanto el unido a ceruloplasmina como el no unido (NCC). El nivel de cobre sérico total es proporcional a la cantidad de Holo-Cp; por tanto, en la EW es esperable una disminución de éste. Sin embargo, en el diagnóstico inicial se detecta un nivel aumentado como consecuencia de la liberación al torrente sanguíneo del cobre acumulado en los hepatocitos. Un cobre sérico normal o alto junto con ceruloplasmina baja indica un incremento en la fracción de cobre sérico del tipo NCC y es un hallazgo sugestivo de EW. Si bien un nivel elevado de NCC también se registra en casos de FHA, colestasis, y toxicidad por cobre.

El NCC se obtiene de la diferencia entre el cobre sérico total y el unido a ceruloplasmina, por tanto depende de la correcta determinación de Holo-Cp en la misma muestra. Por ello, si la medición de ceruloplasmina se realiza mediante métodos inmunológicos, las guías de práctica clínica desaconsejan el cálculo de NCC para el diagnóstico de EW (Patil *et al.*, 2013; Mak, 2019, Mohr and Weiss, 2019a).

### **Cobre en orina**

En pacientes no tratados, los niveles de cobre excretados en la orina son altos, y reflejan los niveles de NCC en suero. Por ello, la medición del cobre en orina recogida durante 24 horas es una prueba habitual para el diagnóstico de la EW. En enfermos sintomáticos, habitualmente se registran niveles superiores a 100 µg/24h, pero en asintomáticos y casos pediátricos, el límite inferior se establece en 40 µg/24h. En individuos heterocigotos se puede llegar a registrar valores intermedios. Dado que la D-penicilamina promueve la excreción del cobre en la orina, para el diagnóstico en casos pediátricos se ha estandarizado la medición de cobre en orina de 24 horas tras la toma de 500 mg del medicamento al comienzo y a mitad de la jornada. En esta prueba, el valor de referencia se establece en 1600 µg/24h (Mohr and Weiss, 2019a).

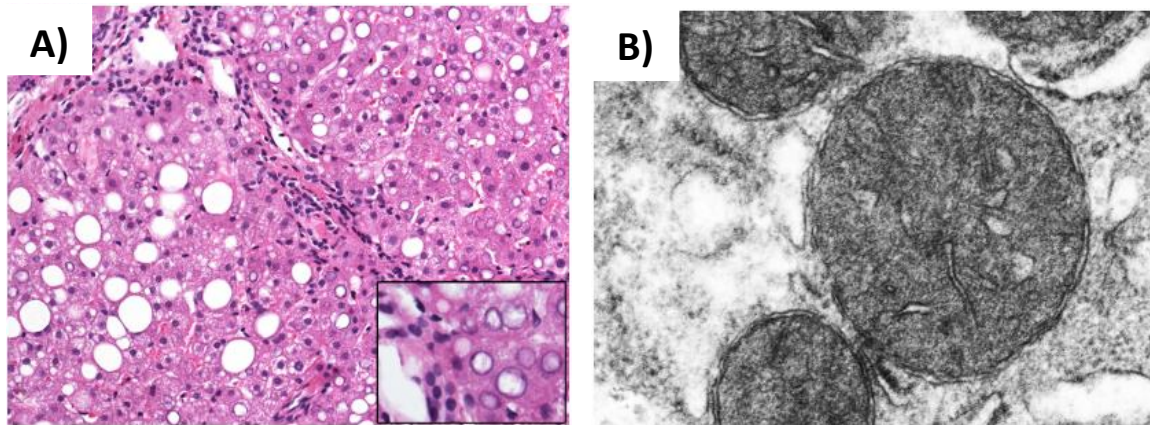
Otras condiciones clínicas como la hepatitis autoinmune, síndromes colestáticos y fallo hepático crónico o agudo también presentan niveles de cobre en orina altos como mecanismo de compensación por la alteración de la excreción biliar. Por tanto, esta prueba diagnóstica también puede arrojar falsos positivos (Roberts and Schilsky, 2008).

### ***Biopsia hepática***

Puesto que la biopsia hepática es un método invasivo, las guías de práctica clínica sólo recomiendan la medición del cobre intrahepático si el resto de pruebas diagnósticas no invasivas son insuficientes para establecer un diagnóstico, o si se sospecha de alguna otra patología hepática además de EW (European Association for the Study of the Liver, 2012). Una concentración de cobre intrahepático superior a 250 µg/g de tejido hepático seco se considera diagnóstico de EW siempre que se hayan descartado otras patologías colestáticas. Otros estudios sugieren que este umbral puede establecerse en 75 µg/g de tejido hepático seco obteniéndose una mayor sensibilidad (Rosencrantz and Schilsky, 2011).

Dependiendo del estadio de la enfermedad, el patrón de deposición de cobre en el hígado es variable. Ello hace que en fases avanzadas de cirrosis en las que el cobre no se deposita de forma homogénea, la concentración puede ser subestimada debido a una toma de muestra no representativa. Histológicamente, en un inicio el cobre se concentra en el citosol de los hepatocitos unido a metalotioneínas (MTs), mientras que en estadios más avanzados, se deposita en lisosomas, que sí son detectables mediante tinción con rodamina u orceína (Roberts and Schilsky, 2008).

Las alteraciones histológicas en etapas tempranas de la EW se asemejan a lo observado en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD; *non-alcoholic fatty liver disease*) y en la esteatohepatitis no alcohólica (NASH; *non-alcoholic steatohepatitis*), lo que incluye esteatosis leve, núcleos glucogenados en los hepatocitos y necrosis hepatocelular focal (Figura I3A). El análisis ultraestructural en un proceso incipiente de esteatosis revela anomalías mitocondriales características de la EW, como el aumento del espacio entre crestas con dilatación de las puntas, lo que resulta en una apariencia quística (Figura I3B) (Patil *et al.*, 2013). Conforme la enfermedad avanza, las anomalías mitocondriales desaparecen, debido a que el cobre pasa de estar concentrado en el citosol a ser depositado en los lisosomas (Lackner and Denk, 2019).

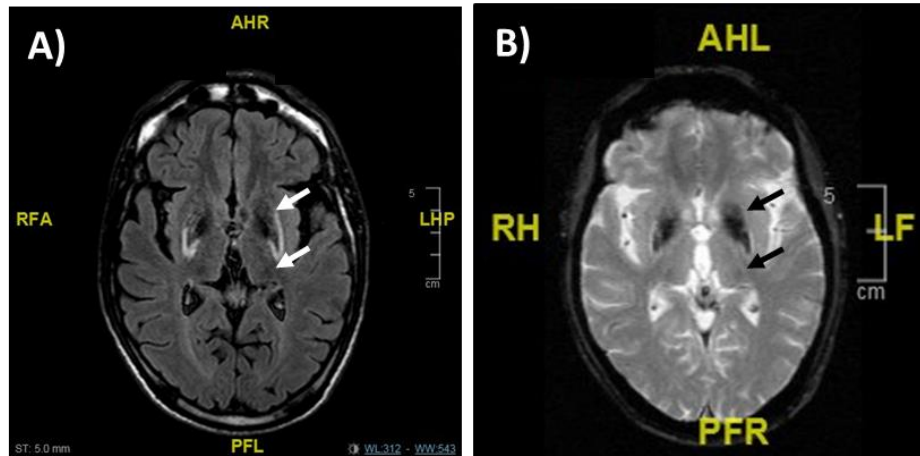


**Figura 13: Histología en muestra de biopsia de hígado en pacientes con la EW. A)** En tinción con hematoxilina-eosina, en estadios iniciales se observa la presencia de esteatosis (círculos vacíos) y núcleos glucogenados (en la región aumentada). **B)** Alteraciones mitocondriales detectadas mediante microscopía electrónica. En la imagen se observan mitocondrias con ensanchamiento del espacio entre las crestas y microquistes en sus puntas. Recuperado de Lackner y Denk (2019) con permiso de Elsevier.

### ***Evaluación neurológica y radiológica***

Además de en pacientes con predominancia de sintomatología neurológica, la evaluación por parte de un neurólogo y/o especialista en trastornos del movimiento debe realizarse en todos los casos. Puesto que concurren un amplio espectro de síntomas neurológicos en pacientes con la EW, existen dos escalas clínicas validadas que ayudan a establecer el grado de deterioro neurológico: *Unified Wilson's Disease Rating Scale* (UWDRS) y *Global Assessment Scale for Wilson's Disease* (GAS for WD) (Aggarwal and Bhatt, 2019).

La resonancia magnética nuclear (RMN) del cerebro es la prueba de imagen más utilizada para la valoración de daños en los ganglios basales (Figura 14). El hallazgo más habitual es la detección de hiperintensidades en la secuencia T2, principalmente en putamen y núcleo caudado. Un signo característico de las imágenes de RMN que se observa en una minoría de pacientes es "la cara del panda gigante". Alteraciones en la RMN cerebral en el momento del diagnóstico se observan en todos los pacientes neurológicos, entre el 40-75% de pacientes hepáticos y en el 20-30% de pacientes asintomáticos (Członkowska *et al.*, 2018, Mohr and Weiss, 2019a).



**Figura 14: Resonancia Magnética Nuclear (RMN) cerebral en pacientes con la EW.** **A)** Secuencia FLAIR en T2 de un paciente con EW en la que se observa alteración (hiperintensidad bilateral) en ganglios basales. **B)** Secuencia FFE del mismo paciente en la que se observa hipointensidad bilateral en las mismas regiones, que se traduce en depósitos de cobre. Imágenes cedidas por la Dra. María Álvarez Sauco.

### **Diagnóstico genético**

El estudio genético de *ATP7B* es la prueba no invasiva de preferencia para alcanzar un diagnóstico concluyente cuando hay sospecha clínica de EW. El diagnóstico de la enfermedad se confirma con la identificación de dos mutaciones patológicas en heterocigosis compuesta o una en homocigosis. Una vez se alcanza el diagnóstico genético, el estudio se extiende al resto de familiares, lo que permite el diagnóstico de familiares afectados, y también, de personas asintomáticas, de modo que éstas comienzan a ser evaluadas clínicamente con regularidad anticipándose a la progresión de la patología. Aunque la EW es monogénica, existe solapamiento con otras entidades clínicas. Por ello, es habitual que *ATP7B* esté incluido en paneles de genes dirigidos para el diagnóstico de trastornos del movimiento, síndromes colestáticos y otras enfermedades hepáticas hereditarias con inicio en la infancia (Montaut *et al.*, 2018; Stalke *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2019a).

No existe un test de laboratorio o clínico que sea infalible para el diagnóstico de la EW, incluyendo el análisis genético de *ATP7B*, ya que en alrededor del 1-27% de casos sólo se detecta una mutación en un único alelo (Espinós and Ferenci, 2020). A esta dificultad hay que añadir que en muchas ocasiones los pacientes no presentan todos los síntomas descritos y el solapamiento clínico con otras condiciones. Para facilitar el diagnóstico de la EW, el grupo de trabajo de la 8ª Reunión Internacional de la EW celebrada en Leipzig (2001) elaboró una escala diagnóstica (Tabla I1), que actualmente es la recomendada por las guías de práctica clínica (European Association for the Study of the Liver, 2012).



Tabla I1: Escala diagnóstica desarrollada en la 8ª Reunión Internacional sobre la EW (Leipzig 2001)

Síntomas y signos clínicos típicos	Otros test	
<b>Anillos de Kayser-Fleischer</b>	<b>Cobre hepático</b>	
Presente	2	>5x LSN (>4 µmol/g) 2
Ausente	0	0,8-4 umol/g 1
<b>Síntomas neurológicos**</b>	Normal (<0,8µmol/g) -1	
Severos	2	Gránulos rodamina positivos* 1
Moderados	1	<b>Cobre en orina 24h (sin hepatitis aguda)</b>
Ausentes	0	Normal 0
<b>Ceruloplasmina sérica</b>	1-2x LSN 1	
Normal (> 0,2 g/L)	0	>2x LSN 2
0,1-0,2 g/L	1	Normal, pero >5x LSN con D-penicilamina 2
<0,1 g/L	2	<b>Estudio genético ATP7B</b>
<b>Anemia hemolítica Coombs negativa</b>	2 mutaciones en <i>trans</i> 4	
Presente	1	1 mutación 1
Ausente	0	Negativo 0
<b>PUNTUACIÓN TOTAL</b>	<b>Resultado evaluación:</b>	
4 puntos o más	Diagnóstico confirmado	
3 puntos	Diagnóstico posible, se necesitan más tests	
<2 puntos	Diagnóstico poco probable	

LSN: límite superior de la normalidad; \*\*Alternativamente, anomalías típicas en RMN cerebral

\*Si no hay cuantificación de cobre intrahepático disponible

### 1.3 Tratamiento y pronosis

Una vez confirmado el diagnóstico de la EW en el paciente, debe establecerse lo antes posible una pauta terapéutica para conseguir un balance de cobre negativo. Según el mecanismo de acción, existen dos tipos de medicamentos: la D-penicilamina y la trientina, que promueven la excreción del cobre en la orina; el zinc, que bloquea la absorción intestinal de cobre. En las fases tempranas se prefiere el uso de D-penicilamina o de trientina (ésta presenta una mejor tolerancia y menor tasa de empeoramiento neurológico) al conseguirse un efecto terapéutico más rápido que con el zinc, éste último habitual como terapia de mantenimiento así como preventiva en pacientes asintomáticos (Patil *et al.*, 2013, Mohr and Weiss, 2019b).

El tratamiento con quelantes en pacientes con la EW es de por vida, por lo que la adherencia es la clave del éxito a largo plazo, sobre todo en asintomáticos, consiguiendo que apenas desarrollen complicaciones derivadas de la acumulación de cobre en el organismo. Para su control, se recomienda evaluar en los pacientes, al menos dos veces al año, test bioquímicos de función hepática, cobre en orina 24h y cobre sérico. En enfermos

## Introducción

en terapia con quelantes de mantenimiento, niveles altos de cobre en orina 24h sugieren baja adherencia y mayor probabilidad de fallo hepático. Valores bajos de cobre en orina 24h acompañados de niveles de cobre sérico inferiores a 50 µg/L (5 µg/dL) pueden indicar un déficit de cobre inducido por dosis elevadas de quelantes o como resultado de un tratamiento prolongado. Otros signos de déficit de cobre son presencia de neutropenia, anemia e hiperferritinemia (Członkowska *et al.*, 2018; Mak, 2019).

En las guías de práctica clínica, el trasplante hepático ortotópico (THO) sólo se contempla en casos de FHA o cirrosis que no responden al tratamiento con quelantes (European Association for the Study of the Liver, 2012). Sin embargo, se debate si esta opción terapéutica es conveniente en pacientes con cuadro neurológico severo sin FHA que tampoco responden a la terapia convencional. Esto se debe a que no existe el suficiente conocimiento sobre el seguimiento post-THO en este tipo de casos para poner en valor las posibilidades de recuperación con respecto a los riesgos que suponen estas intervenciones (Schiano and Rosenthal, 2019). No obstante, en un estudio reciente de seguimiento en pacientes neurológicos con THO, se apreció una mejoría notable en el 85% de los casos (Poujois *et al.*, 2020).

Las nuevas investigaciones en terapias quelantes están dirigidas a aumentar la efectividad, y especialmente en pacientes neurológicos, reducir el posible empeoramiento del cuadro clínico en las primeras fases de tratamiento. En este sentido, el tetratiomolibdato de amonio (ATTM) ha sido probado con éxito como tratamiento inicial en pacientes neurológicos (Brewer *et al.*, 2006; De Fabregues *et al.*, 2020). Existe una nueva fórmula, más estable que el ATTM, basada en tetratiomolibdato de bis-colina (Bis-colina TTM), conocida como “WTX101”, que se encuentra en fase III de ensayo clínico, en la que se compara su eficacia frente a la terapia habitual (Ref. NCT03403205). A diferencia de los quelantes convencionales, el TTM presenta mayor afinidad por el cobre, siendo capaz de movilizar el cobre fijado por las MTs en los hepatocitos. Este fármaco forma una partícula inerte junto con el NCC, promoviendo su excreción en la bilis, de modo que sea posible observar una mejoría en los pacientes en un tiempo reducido (Weiss *et al.*, 2018).

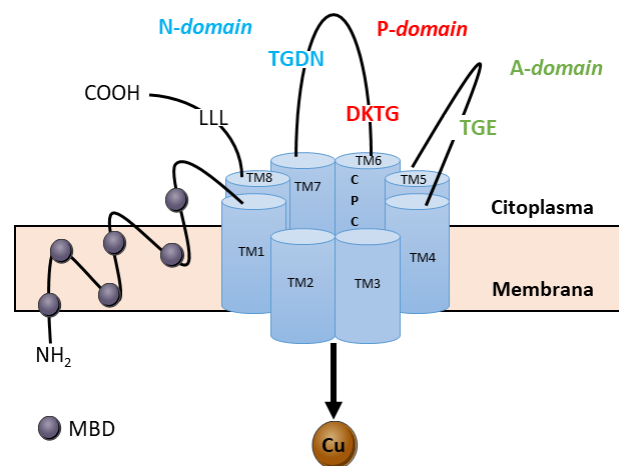
La terapia génica se presenta como la opción para curar la EW, ya que la introducción de una copia funcional de *ATP7B* permitiría restablecer el metabolismo del cobre en el hígado. Para que la terapia génica sea efectiva, es necesario que la expresión del gen transferido sea estable y duradera en el tiempo. En el modelo de ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup>, se ha llevado a cabo con éxito una estrategia basada en la utilización de virus adeno-asociados (AAV) para la transferencia de *ATP7B* bajo la expresión de un promotor específico de hígado. Mediante esta aproximación, los investigadores de este estudio consiguen una expresión estable del gen, suficiente para restablecer el correcto funcionamiento del

metabolismo del cobre durante al menos seis semanas desde la primera y única dosis (Murillo *et al.*, 2015). Tras conseguir también un buen efecto terapéutico en el ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup> con versiones reducidas del gen (Murillo *et al.*, 2019), actualmente se están realizando los primeros ensayos clínicos para comprobar la seguridad y eficacia de esta estrategia (Ref. NCT04537377).

## 2. *ATP7B*, gen implicado en la enfermedad de Wilson

En 1993, de forma simultánea varios grupos describieron por primera vez mutaciones en homocigosis o en heterocigosis compuesta en el gen *ATP7B* como causantes de la EW (Bull and Cox, 1993; Tanzi *et al.*, 1993). El gen *ATP7B* abarca 80 kb en el brazo corto del cromosoma 13. El transcrito más largo de *ATP7B* (NM\_000053) detectado en hígado, de entre 7,5 y 8,5 kb, comprende 20 intrones y 21 exones. Además, se han descrito transcritos alternativos más cortos en cerebro, que principalmente carecen de los exones 6, 7, 8 o 12; se desconoce si son codificantes o simplemente tienen una función reguladora. La región promotora de *ATP7B* se extiende alrededor de 1,3 kb *upstream* desde el codón de inicio, y se caracteriza por presentar cuatro motivos de unión de respuesta a metales (MREs, *metal response elements*) y seis motivos de tipo MRE-like que guardan homología con elementos de los promotores de las MTs (Petrukhin *et al.*, 1993). Ello sugiere que la expresión de *ATP7B* está fuertemente regulada por la actividad de factores de transcripción específicos de unión a metales. *ATP7B* se expresa principalmente en hígado y cerebro, aunque también se han detectado niveles significativos de expresión en riñón, placenta o pulmón (Chang and Hahn, 2017; Kirk, 2019).

*ATP7B* codifica para una ATPasa tipo P transmembrana del mismo nombre. Esta proteína consta de 1465 aminoácidos organizados en seis dominios de unión a cobre (MBD, *metal binding domains*) en el extremo N-terminal; ocho dominios transmembrana (TMs) formando una estructura de canal para el paso de cobre; y tres elementos conservados en la familia de las ATPasas: dominio fosfatasa (*A-domain*), de fosforilación (*P-domain*) y de unión a ATP (*N-domain*) (Figura 15).

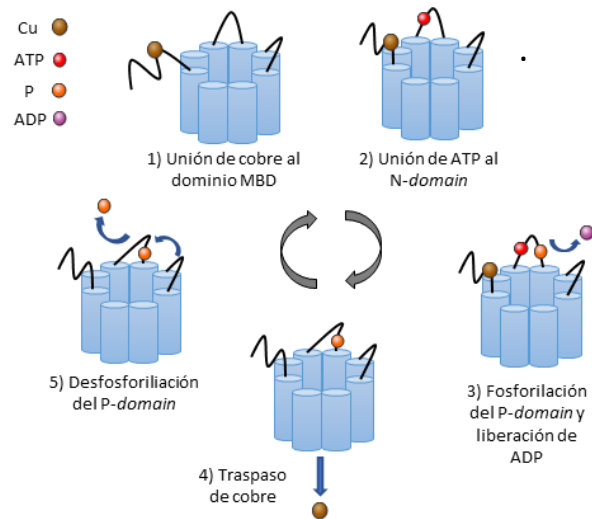


**Figura 15: Representación esquemática de los dominios de *ATP7B*.** Adaptada de Polishchuk (2019).

A lo largo de la secuencia aminoacídica se han identificado motivos conservados asociados a cada uno de los dominios funcionales, como el motivo TGE en el *A-domain*, DKTG en el *P-domain* y TGDN en el *N-domain*. Los seis dominios MBD, que contienen el

motivo CXXC, participan en la captación del cobre transferido por la chaperona ATOX1. En el TM6 se identifica el motivo CPC, importante para el traspaso de cobre a través de la membrana, y en el extremo C-terminal el motivo LLL, necesario para el tráfico intracelular de ATP7B (Lutsenko *et al.*, 2019).

ATP7B utiliza la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para el transporte de cobre a través de las membranas. En la Figura 16 se muestra el modelo que explica el ciclo catalítico de ATP7B: (1) unión de cobre a los dominios MBD y traspaso al motivo CPC del TM6; (2) unión de ATP al *N-domain*; (3) hidrólisis de ATP y fosforilación del residuo D1027 del motivo DKTG en el *P-domain*; (4) cambio conformacional que permite la translocación de cobre a través de la



**Figura 16: Ciclo catalítico de ATP7B.** Cu: cobre, P: fosfato. Adaptada de Bie *et al.* (2007a).

estructura de canal; y (5) desfosforilación del *P-domain* por parte del *A-domain*. Este ciclo catalítico está fuertemente regulado por la presencia de cobre, de forma que en su ausencia, los dominios MBD interactúan con el *N-domain* impidiendo la unión a ATP (de Bie *et al.*, 2007a).

## 2.1 Genética de ATP7B

Hasta la fecha, se han descrito más de 900 variantes en *ATP7B* (HGMD Professional versión 2020.3), localizándose el 96,2 % en secuencias codificantes e intrónicas flanqueantes a lo largo de todo el gen (Tabla 12). Los tipos de mutaciones identificadas son muy diversas, siendo las más frecuentes (más del 60 %) aquellas que dan lugar a un cambio de aminoácido o la generación de un codón de parada en la proteína.

Para conseguir un buen rendimiento diagnóstico, se recomienda una estrategia de análisis genético que, en diferentes fases, permita abarcar el estudio completo de *ATP7B*. En primer lugar, es recomendable realizar el análisis de los 21 exones codificantes y secuencias intrónicas flanqueantes, dado que albergan la mayoría de mutaciones clínicas. Este tipo de análisis es abordable mediante secuenciación directa (Sanger). En poblaciones en las que predominan un reducido número de mutaciones patológicas, se puede priorizar el estudio de éstas. Para ello, se han desarrollado diferentes aproximaciones, que se pueden combinar con la secuenciación directa, efectivas y a bajo coste como son las técnicas de HRM (*High Resolution Melting*), o el empleo de sondas de hibridación específica

de alelo y *microarray* customizado de SNPs que permiten el análisis simultáneo de múltiples variantes conocidas (Gojová *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017).

**Tabla 12: Tipos de variantes descritas en *ATP7B* y su frecuencia. (\*)**

Tipos de variantes	Número	Frecuencia
Regulatorias	12	1,31 %
Sitio de <i>splicing</i> 5'/3'	71	7,77 %
Cambio de aminoácido o generación de codón de parada	568	62,14 %
Pequeñas deleciones	154	16,85 %
Pequeñas inserciones	74	8,10 %
<i>Indels</i>	12	1,31 %
Grandes deleciones	23	2,52 %

(\*)Datos obtenidos de HGMD Professional versión 2020.3.

Tanto la secuenciación directa como las diferentes técnicas de genotipado permiten la identificación de cambios puntuales así como de pequeñas deleciones e inserciones. Si mediante secuenciación directa y/o genotipado de regiones codificantes e intrónicas flanqueantes sólo se detecta una mutación en heterocigosis o ninguna, otros estudios a tener en cuenta son el análisis de grandes deleciones y duplicaciones mediante MLPA (*Multiplex-Ligation Probe Amplification*) y el análisis de la región promotora de *ATP7B*. Si bien este tipo de mutaciones son poco frecuentes, representando sólo el 3,83 % del total de variantes descritas en *ATP7B* (Tabla 12), en varios trabajos se ha demostrado que permite resolver el diagnóstico genético de casos con un cuadro clínico compatible con la EW (Coffey *et al.*, 2013; Todorov *et al.*, 2016). La región promotora de *ATP7B* comprende 1,3 kb, por lo que son necesarios varios amplicones de PCR para cubrirla en el estudio mediante secuenciación directa. No en todos los estudios se incluye su análisis ni tampoco siempre igual. En ocasiones, el estudio se limita a investigar las primeras 500 pb de la región promotora, en donde se localiza la deleción de 15 pb (c.-441\_-427del), efecto fundador en la isla de Cerdeña (Poon *et al.*, 2020). Sin embargo, también se han descrito mutaciones patológicas en regiones más lejanas (Chen *et al.*, 2018), lo que sugiere la conveniencia del análisis completo de la región promotora al menos en casos con una o ninguna mutación en *ATP7B* y clínica sugestiva de EW.

Si el número de muestras a estudiar es elevado, el análisis de los 21 exones de *ATP7B* mediante secuenciación directa consume mucho tiempo y recursos. En este aspecto, los avances en tecnologías de secuenciación masiva o de nueva generación, comúnmente conocidas como NGS (*Next-Generation Sequencing*) y su abaratamiento, posibilitan el desarrollo de herramientas diagnósticas coste-efectivas para el análisis de *ATP7B*. El diseño de herramientas de PCR *multiplex* (basado en la amplificación de varias regiones de interés o exones en una única reacción de PCR) así como de paneles de genes dirigidos al

diagnóstico de fenotipos solapantes que incluyen *ATP7B*, han facilitado la implementación de la NGS para el diagnóstico genético de esta enfermedad. Mediante la técnica de enriquecimiento por sistema de captura, es posible el análisis de regiones de interés tanto codificantes y no codificantes del genoma, algunas estudiadas con menor frecuencia por su tamaño y en las que también podrían localizarse mutaciones causantes de la enfermedad, como el promotor, 5' y 3' UTRs junto con secuencias intrónicas profundas. Además, con estas herramientas es también posible realizar un análisis de la cobertura de las regiones genómicas capturadas, que nos permite investigar la presencia de alteraciones en el número de copias (CNVs; *Copy Number Variants*).

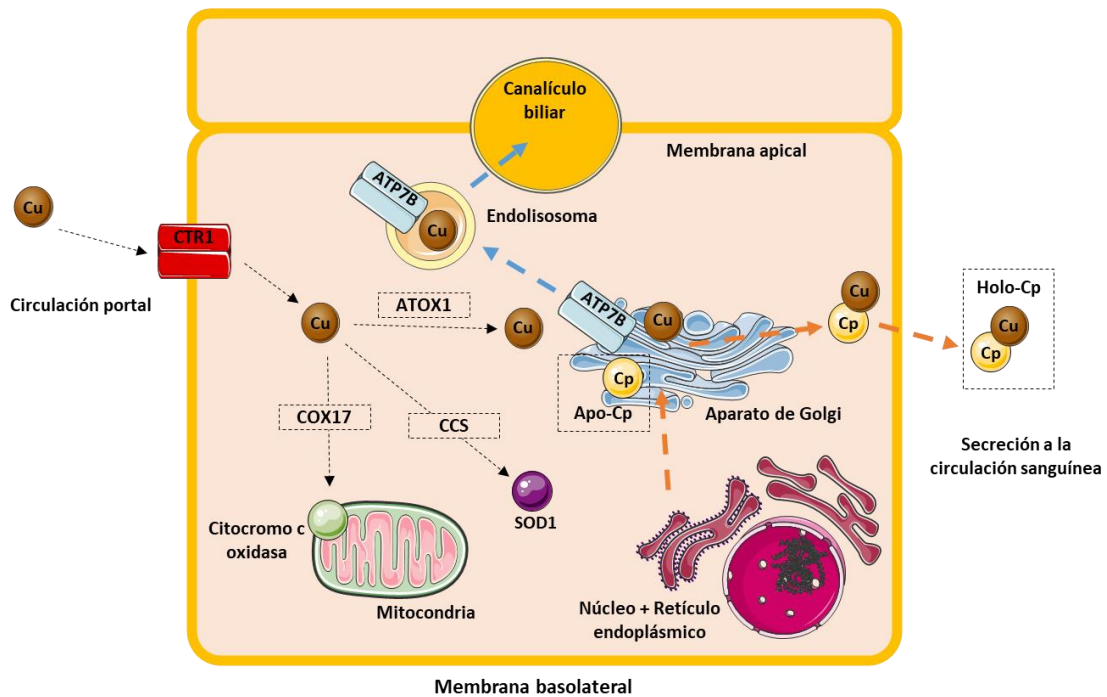
La detección de mutaciones en secuencias intrónicas profundas de *ATP7B* supone un reto, ya que este gen presenta intrones de un tamaño considerable (por ejemplo, el intrón 1 abarca alrededor de 36 kb) y ricos en elementos repetitivos (Todorov *et al.*, 2016), por lo que el estudio de dichas regiones mediante secuenciación directa es inviable. Recientemente, en una serie de 442 pacientes EW, mediante secuenciación masiva del gen completo, identificaron un cambio intrónico novel en cinco casos, c.2866-1521G>A, que presumiblemente alteraría la expresión del transcrito de *ATP7B* (Woimant *et al.*, 2020). Se trataba de casos en los que se había detectado sólo una mutación patológica o probablemente patológica en heterocigosis. Conjuntamente con este resultado, los autores consiguen resolver el diagnóstico genético en más del 98 % de los casos estudiados.

### **2.2 Papel de ATP7B en la homeostasis del cobre en los hepatocitos**

El cobre es un elemento traza esencial, que participa como cofactor o componente estructural en un gran número de enzimas implicadas en procesos metabólicos como la respiración celular (citocromo c oxidasa), síntesis de neurotransmisores (DβM), metabolismo del hierro (ceruloplasmina y hefaestina), defensa antioxidante (SOD1) y formación del tejido conectivo (LOX), entre otros (Scheiber *et al.*, 2013). La cantidad diaria recomendada (CDR) de cobre es de 1 mg (García Gabarra *et al.*, 2017), y se estima que lo aportado por la dieta es superior (entre 2-4 mg/día) (Latorre *et al.*, 2019). Entre los alimentos ricos en cobre se encuentra el marisco, frutos secos, legumbres, el chocolate y las patatas (Mohr and Weiss, 2019a). Dado que la excreción biliar es la principal vía de eliminación del exceso de cobre, el hígado juega un papel esencial en el metabolismo del cobre.

La absorción del cobre tiene lugar en el intestino delgado, en donde ATP7A, transportador de cobre homólogo de ATP7B, lo introduce en los enterocitos. El cobre pasa a la circulación portal, y unido a la albúmina o la transcurreína es conducido hasta el hígado. El transportador de metales CTR1 se encarga de introducir el cobre en el hepatocito. Allí es captado por una serie de chaperonas específicas que lo trasladan a las

enzimas que lo requieren para su actividad: CCS (*carbon capture and storage*) transfiere cobre a SOD1 en el citosol; ATOX1 a ATP7B en el aparato de Golgi; y COX17 a SCO1/SCO2 en la mitocondria, para que en última instancia sea aportado a la citocromo c oxidasa (Figura I7). La acumulación de cobre en el citosol causa daños por estrés oxidativo, por lo que la célula cuenta con mecanismos de protección. El exceso de cobre es fijado por moléculas pequeñas como glutatión (GSH) y las MTs, que lo almacenan (Lutsenko, 2014).



**Figura I7: Distribución del cobre en el hepatocito.** La línea naranja discontinua indica la vía sintética de la Cp en la que, tras recibir cobre por parte de ATP7B en el aparato de Golgi, pasa a la circulación sanguínea. Con la línea discontinua azul, se muestra la vía de excreción de cobre, en la cual ATP7B se desplaza al compartimento endolisosomal para la liberación de cobre al canalículo biliar mediante exocitosis. Cp: ceruloplasmina; Cu: cobre; Apo-Cp: apoceruloplasmina; Holo-Cp: holoceruloplasmina. Adaptada de Polishchuk (2019).

En el metabolismo del cobre, ATP7B tiene funciones biosintéticas y homeostáticas. En condiciones fisiológicas, ATP7B se sintetiza en el retículo endoplásmico (RE) y posteriormente se traslada al *trans-golgi network* (TGN). En el TGN se encarga de transferir el cobre a la ceruloplasmina recién sintetizada (Apo-Cp), que en su forma activa (Holo-Cp) se secreta a la circulación sanguínea. Si los niveles de cobre en la célula aumentan, ATP7B se desplaza a compartimentos endolisomales para bombear hacia el interior de estos orgánulos el exceso de cobre citoplasmático. A continuación, los endosomas se dirigirán hacia la membrana apical, que comunica con el canalículo biliar, para la liberación del cobre en la bilis mediante exocitosis (Figura I7). Se ha demostrado que altos niveles de cobre en la célula promueven la interacción de los dominios MBD4-6 de ATP7B con la subunidad

p62/DNCT4 del complejo motor dinactina/dineína, lo que propicia el transporte de los endolisosomas a través de los microtúbulos hacia el canalículo biliar (Lim *et al.*, 2006). Hay discrepancias en cuanto a si, además, ATP7B se localiza junto a estos orgánulos en la membrana apical en el momento de la exocitosis (Cater *et al.*, 2006; Hubbard and Braiterman, 2008). Es posible que, en caso de que la saturación de cobre en la célula persista, ATP7B se traslade junto a los endosomas al canalículo biliar para contribuir conjuntamente en el traspaso directo del cobre desde el citoplasma a la bilis (Polishchuk, 2019).

Cuando los niveles de cobre en la célula descienden, ATP7B retorna al TGN mediante vías endocíticas. Para ello, es necesario un cambio conformacional en la proteína motivado por la desfosforilación del motivo DKTG. Esto permite que el motivo LLL del extremo C-terminal sea reconocido por proteínas adaptadoras de clatrina (también denominadas adaptinas) como AP1, que se encargan de la endocitosis de proteínas de membrana. (Polishchuk and Polishchuk, 2019). Por otra parte, COMMD1 participa en la regulación del tráfico vesicular de ATP7B. En el estudio de Miyayama y colaboradores (Miyayama *et al.*, 2010), en el que trabajan con una línea celular hepática de ratón *knockdown* para *Comm1*, muestran deficiencias en el tráfico retrógrado de ATP7B cuando los niveles de cobre descienden. Adicionalmente, se postula que COMMD1 estaría implicado en la regulación proteolítica de ATP7B (de Bie *et al.*, 2007b).

### **2.3 Efecto de mutaciones en ATP7B sobre su función**

Son numerosos los estudios realizados para caracterizar los mecanismos y eventos regulatorios que determinan la función de ATP7B en el metabolismo del cobre. Mutaciones que afecten a la unión de cobre, actividad ATPasa, tráfico intracelular e interacción con otras proteínas van a interferir negativamente sobre las funciones biosintéticas y homeostáticas de ATP7B. El conocimiento del efecto que causarían las mutaciones sobre la función de la proteína ayuda a establecer correlaciones genotipo-fenotipo. A su vez, también aporta información para investigar cómo podrían ser corregidas para recuperar la función de la proteína.

Mutaciones que resultarían en la ausencia de ATP7B se asocian a un inicio temprano de la enfermedad hepática, con una mayor probabilidad de desarrollar FHA (Okada *et al.*, 2010). En este sentido, en pacientes portadores de mutaciones que propician la generación de un codón de parada temprano, se ha determinado que la síntesis de Holo-Cp es casi nula (Merle *et al.*, 2010). Un número considerable de mutaciones en ATP7B dan lugar a una proteína inestable y/o mal plegada que queda retenida en el RE y es degradada por la maquinaria proteosomal. Entre las mutaciones que causarían estos defectos se encuentran p.H1069Q y p.R778L, que son los cambios más frecuentes en población europea y asiática



(Van Den Berghe *et al.*, 2009). En concreto, p.H1069Q se localiza en el *N-domain*, por lo que afecta a la unión a ATP y fosforilación del *P-domain*, mientras que p.R778L se sitúa en el TM4. Otras mutaciones que también resultan en una retención en RE son p.G85V y p.G591D, localizadas en los dominios MBD, para las que se ha reportado una mayor interacción con la chaperona COMMD1, promoviendo su degradación (de Bie *et al.*, 2007b). Curiosamente, para el cambio p.G875R, se ha observado que pequeños aumentos en los niveles de cobre son suficientes para que la proteína sea estable y capaz de desplazarse del RE al TGN para participar en el transporte del cobre (Gupta *et al.*, 2011).

Mutaciones que bloquean la conformación del intermediario catalítico fosforilado de ATP7B, es decir, que impiden la fosforilación del residuo D1027 en el motivo DKTG del *P-domain*, retienen la proteína en el TGN. En cambio, alteraciones en el motivo TGE del dominio fosfatasa (*A-domain*), dificultan la desfosforilación del motivo DKTG, lo que inhibe el tráfico retrógrado de ATP7B al TGN cuando los niveles de cobre descienden (Petris *et al.*, 2002). Para las mutaciones p.S653Y, p.G710S y p.G943S, situadas en los dominios TM1, TM2 y TM5 respectivamente, se ha descrito que la proteína se acumularía de forma aberrante en el TGN; el tráfico intracelular para la excreción de cobre sería interrumpido, sin embargo la proteína participaría en la síntesis de Holo-Cp. Consecuentemente, en los pacientes se registran niveles variables de ceruloplasmina en sangre, incluso pudiéndose normalizar ocasionalmente (Braiterman *et al.*, 2014). Por último, estudios en detalle de la implicación en el tráfico intracelular de los dominios MBD, en el extremo N-terminal, han mostrado que los residuos 1-63 son necesarios para la localización apical de ATP7B para la excreción de cobre en el canalículo biliar (Guo *et al.*, 2005; Braiterman *et al.*, 2009). Una muestra de ello es que en presencia de la mutación p.N41S, se observa deslocalización de la proteína del TGN así como de las membranas basolaterales, independientemente de los niveles de cobre en la célula (Braiterman *et al.*, 2009).

## 2.4 Patogénesis de la toxicidad por cobre

El origen primario del fenotipo clínico observado en pacientes con la EW son las alteraciones causadas por los efectos tóxicos del exceso de cobre en los tejidos. ATP7B se expresa principalmente en el hígado, que regula la homeostasis sistémica del cobre, y deficiencias en la excreción biliar causan la acumulación de cobre en este órgano. Por tanto, el daño hepático es el primer signo habitual de la EW. El cobre no unido a GSH o MTs resulta altamente tóxico en la célula, afectando en primer lugar a la integridad y función de la mitocondria (Zischka and Lichtmannegger, 2014). La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive Oxygen Species*) o la interacción del cobre con la síntesis de lípidos alterarían el metabolismo energético y la desregulación de la síntesis de colesterol, promoviendo la aparición de esteatosis (Huster, 2014). En última instancia, la acumulación

de cobre causa apoptosis y muerte celular de hepatocitos, provocada por la liberación de la citocromo c oxidasa de las mitocondrias dañadas o a través de la activación de la esfingomielinasa ácida para la síntesis de ceramida (Lang *et al.*, 2007). Estos mecanismos contribuyen a la aparición en el hígado de inflamación (hepatitis) y fibrosis (Huster, 2014).

Si no se establece un tratamiento con quelantes, la enfermedad avanza. Progresivamente, la capacidad de almacenamiento de cobre por parte del hígado es sobrepasada y éste no puede continuar asimilando su ingesta o absorción. El cobre aportado por la dieta y el liberado por la muerte celular de los hepatocitos pasa a la circulación sanguínea y gradualmente se acumula en otros órganos, entre ellos el cerebro. El efecto tóxico del exceso de cobre en el cerebro es inicialmente amortiguado por los astrocitos, que aumentan en número e incrementan la síntesis de MTs para almacenarlo (Scheiber and Dringen, 2011). Los astrocitos son una parte importante de la barrera hematoencefálica, y su exposición a largo plazo a altas concentraciones de cobre resulta en cambios morfológicos y en su disfunción, afectando también a neuronas y oligodendrocitos (Pal and Prasad, 2014). Los ganglios basales son los que presentan mayor sensibilidad al daño celular inducido por el cobre. El putamen es una región frecuentemente dañada en los pacientes, cuyas lesiones se relacionan con distonía y parkinsonismo (Svetel *et al.*, 2001). Además de las lesiones causada por la toxicidad por cobre, la encefalopatía hepática resultante de un FHA contribuye a la aparición de síntomas psiquiátricos (Scheiber *et al.*, 2017). *ATP7B* se expresa en el cerebro, pero se desconoce su función exacta en él, y los síntomas neurológicos registrados en los pacientes serían consecuencia de la formación de depósitos de cobre cerebrales (Davies *et al.*, 2013). Sin embargo, en el ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup> se han observado daños en los ganglios basales en ausencia de depósitos de cobre, lo que indica que otros factores, aparte de la toxicidad por cobre, contribuirían a la afectación del sistema nervioso central en la EW (Dong *et al.*, 2015).

### 3. Epidemiología clínica y genética

La prevalencia de la EW que globalmente se toma como referencia es la estimada en 1984 por Scheinberg y Sternlieb, 1:30000/3,33:100000 (Scheinberg and Sternlieb, 1984). La frecuencia de portadores (individuos con una mutación causal en heterocigosis en *ATP7B*) calculada según equilibrio de Hardy-Weinberg y penetrancia completa sería de 1:90 (Sandahl *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta factores poblacionales, la prevalencia es mayor en países como China (1:17000) (Wang and Abuduxikuer, 2019), y en poblaciones aisladas debido a su mayor tasa de consanguinidad, como es el caso de la isla de Cerdeña (1:2702) (Gialluisi *et al.*, 2013). En las últimas décadas, se han realizado numerosos estudios epidemiológicos para calcular la prevalencia de la EW en diversas poblaciones. En algunos países, basándose en la revisión de registros de los sistemas públicos de salud, han

estimado, una prevalencia de 1,81 en Taiwán (Tai *et al.*, 2018), 1,50 en Francia (Poujois *et al.*, 2018) o 1,64 en España (Moreno-Marro *et al.*, 2020), por cada 100000 habitantes. Atendiendo a estudios poblacionales consistentes en el cribado mutacional de *ATP7B*, la frecuencia estimada en Reino Unido de la enfermedad es de 1:7000 (Coffey *et al.*, 2013), 1:7561 en Corea del Sur (Jang *et al.*, 2017) y 1:4000 en Francia (Collet *et al.*, 2018; Sandahl *et al.*, 2019). Por último, en el meta-análisis llevado a cabo por Gao y colaboradores (2018), se estima una prevalencia clínica de 1,38 y genética de 12,7 por cada 100000 habitantes.

La evidente disparidad entre la prevalencia clínica y genética de la EW estimada en diferentes poblaciones, pone de manifiesto que el número de portadores de mutaciones patológicas en *ATP7B* es alto y que por tanto, se trataría de una enfermedad infradiagnosticada (Coffey *et al.*, 2013; Collet *et al.*, 2018). Otros factores a tener en cuenta que podrían explicar estas diferencias son el retraso del diagnóstico clínico y la penetrancia incompleta de algunas mutaciones, lo que da lugar a fenotipos leves (Gao *et al.*, 2019). Por todo ello, preocupa la cantidad de pacientes con la EW sin diagnóstico, y por tanto sin tratamiento, en parte debido a la ausencia de manifestaciones clínicas hasta edades avanzadas. Una dificultad añadida al diagnóstico son los casos que presentan una posible herencia autosómica dominante (pseudodominancia) causados por una frecuencia significativa de portadores en la población (Lo and Bandmann, 2017).

En vista de la alta prevalencia en determinadas regiones y las posibilidades terapéuticas que existen, la EW debería incluirse en el listado de enfermedades a riesgo del cribado neonatal. El principal inconveniente es que métodos basados en la determinación de los niveles de Holo-Cp, cobre sérico y cobre en orina 24h presentan un valor predictivo limitado en población infantil por la dificultad de establecer valores de referencia útiles (Chang *et al.*, 2019). Una alternativa a las pruebas bioquímicas de rutina podría ser la cuantificación de la proteína *ATP7B* en gotas de sangre seca (DBS; *dried blood spots*) mediante inmunoensayo. Esta aproximación ha sido puesta a punto en un ensayo piloto que incluye 13 pacientes con diagnóstico genético de EW y 12 controles sanos, pero son necesarios estudios a gran escala para conocer la sensibilidad de la técnica (Jung *et al.*, 2017). El abaratamiento de los costes de las técnicas de secuenciación masiva permite que el cribado genético pueda ser una opción a plantear para estudios poblacionales de la EW. El amplio espectro de variantes asociadas a la EW descritas a lo largo de todo el gen *ATP7B* obliga a estudiar todos los exones, pero el conocimiento de mutaciones frecuentes en determinadas poblaciones o regiones (Figura 18) y su priorización en el análisis podría resultar muy eficaz.



por ello se ha investigado la implicación de genes que desempeñan un papel clave en el metabolismo de lípidos. *PNPLA3* codifica para una lipasa que hidroliza triglicéridos, y el polimorfismo c.444C>G (p.I148M; rs738409) ha sido asociado a mayor riesgo de desarrollar esteatosis en múltiples condiciones, desde NAFLD a hepatitis B y C (Stättermayer *et al.*, 2015). En un estudio de la prevalencia de esta variante en 98 pacientes, se identificó este polimorfismo y la edad de inicio temprana como factores predictores de esteatosis avanzada, mientras que la concentración hepática de cobre no resultó ser relevante (Stättermayer *et al.*, 2015). La proteína APOE, implicada en el metabolismo de lípidos, se encarga de regular los niveles de lípidos en plasma al funcionar como transportador entre diferentes tejidos y órganos (Huang and Mahley, 2014). Existen tres isoformas de APOE, denominadas  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ , que se diferencian entre sí por la presencia o no de cambios aminoacídicos concretos en los residuos 112 y 158, por tanto corresponden a tres genotipos distintos (Huang and Mahley, 2014). La proteína APOE es abundante en cerebro ya que es el principal transportador de lípidos en líquido cefalorraquídeo. En comparación con el alelo  $\epsilon 4$ , el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  resultaría más efectivo como neuroprotector frente a estrés oxidativo (Schiefermeier *et al.*, 2000). En base a que diferentes genotipos en *APOE* podrían ejercer un efecto sobre la evolución de la enfermedad hepática y neurológica en EW, el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  podría estar asociado a un retraso en la aparición de síntomas tanto hepáticos como neurológicos (Schiefermeier *et al.*, 2000), mientras que el genotipo  $\epsilon 4$  conferiría mayor susceptibilidad en mujeres a una manifestación temprana de los mismos (Litwin *et al.*, 2012b), sin embargo los resultados obtenidos por otros autores no confirman estos hallazgos (Medici and Weiss, 2017).

En la célula, la exposición a altos niveles de cobre produce acumulación de ROS, lo que desencadena estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. La baja concentración de ROS tiene una función de señalización. A altas concentraciones, puede inducir oxidación de DNA, lípidos y proteínas, así como destrucción de membranas y degradación de DNA mitocondrial (Medici and Kieffer, 2019). La acumulación de ROS también causaría un efecto perjudicial sobre los mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica, como la metilación y acetilación de histonas, además de la metilación de DNA (Medici and LaSalle, 2019). En el gen *MTHFR* se analizaron los polimorfismos c.677C>T (rs1801133) y c.1298A>C (rs1801131) en una cohorte de 245 sujetos con la EW, estableciéndose una asociación entre estos dos cambios con la edad de inicio y modo de presentación (Gromadzka *et al.*, 2011). *MTHFR* codifica para la metilentetrahidrofolato reductasa, enzima que cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, cosustrato necesario para la remetilación de homocisteína a metionina. Ambos polimorfismos se asocian a mayores niveles de homocisteína en sangre (Sibani *et al.*, 2000), pudiendo atravesar la barrera hematoencefálica y causar efectos neurotóxicos que aumentarían en

presencia de altos niveles de cobre (Medici and Weiss, 2017). Alteraciones de la función hepática conllevan defectos en el metabolismo de la metionina y homocisteína, cuya acumulación genera estrés oxidativo (Ruiz García-Trevijano *et al.*, 2001). Dado que el metabolismo de la metionina está estrechamente relacionado con la metilación de DNA e histonas, este fenómeno podría repercutir sobre la regulación de la expresión génica.

Se ha observado tanto en pacientes como en modelos animales de la EW que la acumulación de hierro contribuye al agravamiento del cuadro clínico, puesto que el metabolismo de ambos elementos está íntimamente relacionado (Manto, 2014). Son varios los estudios en los que se ha tratado de relacionar polimorfismos en *HFE*, gen asociado a hemocromatosis, con alteraciones en la homeostasis del hierro en pacientes. *HFE* regula en enterocitos la captación de hierro por endocitosis al competir con la transferrina (Tf), transportador de hierro en plasma, por unirse a su propio receptor (TfR). Los polimorfismos p.H63D y p.C282Y en *HFE* causarían una pérdida de la capacidad de unión a TfR, lo que resultaría en una mayor entrada de hierro en la célula (Gromadzka *et al.*, 2020b). Inicialmente se describieron dos casos de concomitancia entre variantes en *HFE*, *ATP7B* y acumulación de hierro y cobre en hígado (Hafkemeyer *et al.*, 1994; Walshe and Cox, 1998). En un estudio de 32 pacientes en Cerdeña, portadores de *HFE* p.H63D se vio que presentaban una peor respuesta a la terapia con quelantes y mayores niveles de hierro en hígado (Sorbello *et al.*, 2010). Sin embargo, en otros estudios no ha sido posible establecer una correlación entre variantes en *HFE* y la EW (Erhardt *et al.*, 2002; Pfeiffenberger *et al.*, 2012). El hierro libre en plasma, no unido a transferrina, es introducido en la célula en su forma reducida ( $Fe^{2+}$ ) por el transportador *DMT1*. En el estudio de una cohorte de la EW con 108 pacientes, se investigó si variantes en *DMT1* (también conocido como *SLC11A2*) podrían modificar negativamente la homeostasis del hierro y ello influir en un empeoramiento del cuadro clínico (Przybyłkowski *et al.*, 2014). Los autores detectaron una mayor frecuencia del polimorfismo c.396+44A>C (rs224589) en *DMT1* en el grupo de pacientes, pero no consiguieron establecer diferencias fenotípicas entre portadores y no portadores.

*COMMD1* y *ATOX1* son los principales interactores de *ATP7B* en el metabolismo del cobre, por ello han sido ampliamente estudiados como posibles modificadores genéticos de la EW. Además, *COMMD1* es el gen responsable de la cuprotoxicosis canina en Bedlington terriers (van de Sluis, 2019). Sin embargo, las correlaciones genotipo-fenotipo de variantes en estos dos genes en pacientes con la EW con el cuadro clínico observado no concuerdan entre los diferentes estudios (Stuehler *et al.*, 2004; Heinz Weiss *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2010; Bost *et al.*, 2012). En la serie de 109 probandos estudiada por Gupta y colaboradores (2010), se identificó un único caso con el cambio c.521C>T (p.T174M) en *COMMD1*. El residuo alterado por esta mutación se localizaría en

el segundo de los dos motivos de localización en núcleo (NES; *nuclear export signal*) caracterizados en *COMMD1* (Muller *et al.*, 2009), y p.T174M se relaciona con una mayor acumulación de cobre en el paciente, que además es portador de dos mutaciones de pérdida de función en *ATP7B*. En cuanto a *ATOX1*, sólo en un estudio que incluye 50 pacientes y 60 controles, los autores identifican un cambio exónico, c.40G>A (p.G14S), en dos familias (Kumari *et al.*, 2019). En ambos casos, los enfermos portan distintas mutaciones en *ATP7B*, c.3305T>C (p.I1102T) y c.3903+6T>C en homocigosis. Mediante estudios *in silico* determinan que *ATOX1* p.G14S se situaría en un motivo de unión a cobre, y que ello podría interferir negativamente en la unión de *ATOX1* al dominio MBD4 de *ATP7B* para la transferencia de cobre.

Los dos estudios mencionados son los únicos en los que detectan cambios con frecuencia poblacional inferior al 1 %, en *COMMD1* y *ATOX1*. Ello destaca la importancia funcional de estas dos proteínas en el metabolismo del cobre. Por último, *XIAP* (inhibidor de apoptosis asociado al cromosoma X) ha sido propuesto como posible modificador genético de *ATP7B* en base a su implicación en la regulación del daño celular inducido por cuprotoxicidad. Se ha descrito que niveles altos de cobre promueven la degradación de *XIAP*, lo que resulta en la activación de apoptosis mediada por caspasa-3 (Mufti *et al.*, 2006). Por otra parte, *XIAP* podría participar en el mantenimiento de la homeostasis del cobre por su interacción con *COMMD1* para regular su expresión (Burstein *et al.*, 2004; Maine *et al.*, 2009). En el trabajo realizado por Weiss y colaboradores (2010) llevaron a cabo estudios de asociación de SNPs conocidos en *XIAP* sin conseguir determinar una correlación significativa entre éstos, la edad de inicio y la presentación clínica en una serie de 98 pacientes. En este mismo estudio, también detectan dos mutaciones exónicas, c.1408A>T (p.T470S) y c.1019A>G (p.N340S) de forma independiente en dos heterocigotos de *ATP7B* p.H1069Q, las cuales relacionan con inicio temprano de síntomas.

## 5. Biomarcadores

### 5.1 Biomarcadores en la enfermedad de Wilson y fenotipos relacionados

En la EW, el diagnóstico y tratamiento tempranos son cruciales para poder establecer un programa de monitorización y pronóstico de la enfermedad más racional en los pacientes. A largo plazo, el objetivo del tratamiento es evitar la acumulación de cobre así como conseguir una mejora o estabilidad clínica y bioquímica. Las pruebas basadas en la medición de Cp, cobre en orina de 24 horas y suero, y actividades enzimáticas en hígado, no son del todo convincentes, dado que en muchas ocasiones resultan insuficientes para establecer el diagnóstico (Woimant *et al.*, 2019). De la misma forma, dichas pruebas se usan para la monitorización del tratamiento en pacientes, presentando por tanto

limitaciones para asegurar la adherencia y cumplimentación terapéuticas (Mohr and Weiss, 2019a). El grado de deterioro neurológico y/o la evolución de la enfermedad hepática determinan si la pauta terapéutica es adecuada y suficiente. Para su valoración, las pruebas bioquímicas se complementan con pruebas de imagen como la RMN cerebral o la elastografía hepática (Fibroscan), siendo en última instancia la biopsia hepática la prueba *gold standard* invasiva para determinar la presencia de fibrosis e inflamación (Calvopina *et al.*, 2016; Dusek *et al.*, 2018). Por todo ello, existe la necesidad de identificar biomarcadores no invasivos, que permitan mejorar el diagnóstico y anticipar la evolución de la enfermedad, pudiendo ser útiles para mejorar la terapia y/o monitorización de nuevos tratamientos así como para la identificación de potenciales dianas terapéuticas. De hecho, las agencias de medicamentos como la *European Medicines Agency* (EMA) y la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos han expresado la necesidad de que el descubrimiento de biomarcadores y el desarrollo de nuevos tratamientos se realicen de una forma integrada. Así, los biomarcadores serían útiles para monitorizar el efecto de los fármacos en cada individuo (medicina de precisión) contribuyendo a una reducción en tiempo y costes del desarrollo de terapias (Sistare and DeGeorge, 2007; Sheinerman and Umansky, 2013). De hecho, está descrito que el diagnóstico mejora notablemente cuando se dispone de biomarcadores (Yubero *et al.*, 2016).

Algunos autores postulan que la gravedad del cuadro clínico observado en pacientes con EW podría estar asociado con niveles elevados de cobre intercambiable (CuEXC). Este concepto hace referencia al cobre circulante unido con baja afinidad a albúmina o aminoácidos como la histidina. La ventaja que presenta el CuEXC como marcador con respecto a la de NCC es que no depende de la medición de Cp, por lo que representa una estimación más exacta del exceso de cobre circulante en sangre tóxica para el organismo. Se ha observado tanto en el modelo de rata LEC (proveniente de una mutación espontánea en *Atp7b*) como en el ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup>, que los niveles de CuEXC se correlacionan con el grado de daño hepático, y que el ratio entre éste y el cobre sérico total es un buen marcador para distinguirlos del grupo de sanos, independientemente del estadio de enfermedad hepática (Woimant *et al.*, 2019). Varios trabajos han valorado la medición de CuEXC y cobre sérico total para el diagnóstico y la monitorización de la terapia quelante en pacientes con EW. En una serie de 48 pacientes con evaluación clínica inicial en el momento del diagnóstico, Poujois y colaboradores (2017a) describieron niveles significativamente elevados de CuEXC en pacientes con afectación neurológica que correlacionaban con la gravedad de la misma según la escala UWDRS, mientras que en aquéllos que presentaban sintomatología hepática sin signos de posible FHA, detectaron niveles normales. Por tanto, en este estudio se concluye que el CuEXC sólo sería útil para evaluar el grado de afectación extra-hepática. Guillaud y colaboradores (2018) evaluaron la medición de CuEXC y cobre sérico total para



la monitorización del tratamiento con quelantes, observándose mayores niveles en pacientes con problemas de cumplimentación terapéutica, de los cuales en la mitad también detectaron elevación de AST y ALT comparable a la de pacientes recién diagnosticados. Además, comprobaron la utilidad del cobre sérico total en el diagnóstico diferencial para discriminar pacientes con EW de otros con cuadro clínico solapante como los síndromes colestáticos. Por el momento, la medición de CuEXC y cobre sérico total no se aplica en la práctica clínica, debido a que el procedimiento se basa en técnicas de ultrafiltración como la espectroscopía de absorción atómica (AAS) o la espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), de alto coste aún no estandarizadas entre laboratorios (Woimant *et al.*, 2019).

La liberación de cobre de los hepatocitos a la circulación y su acumulación en tejidos induce estrés oxidativo que activa la respuesta inflamatoria, lo que contribuye a la patogénesis de la EW. Por ello, diferentes autores han investigado marcadores de estrés oxidativo e inflamación para evaluar el grado de deterioro neurológico y/o la gravedad de la enfermedad hepática. En relación a ello, en pacientes neurológicos se ha descrito mayores niveles en suero de marcadores de peroxidación de lípidos como el malondialdehído (MDA), y de excitotoxicidad como el glutamato, acompañado de elevación de citoquinas (IL6, IL8, IL10 y TNF- $\alpha$ ). Esto se traduce en mayor presencia de daño celular, por lo que estos analitos se podrían utilizar para monitorizar el posible empeoramiento del cuadro clínico al comienzo de la terapia quelante en estos pacientes (Kalita *et al.*, 2014).

Desde la premisa de que la activación de macrófagos contribuye al desarrollo de inflamación, fibrosis e hipertensión portal en el hígado, recientemente se ha estudiado la asociación de sCD163 (marcador específico de macrófago) con la gravedad de la enfermedad hepática aguda. El análisis de este marcador mostró una mayor presencia y alta correlación con parámetros bioquímicos de función hepática (ALT, AST y GGT) en pacientes con EW en estadio de FHA o cirrosis, resultado que aún requiere de validación como marcador de daño hepático en un grupo de pacientes más amplio (Glavind *et al.*, 2020). Mediante aproximaciones basadas en el estudio de perfiles proteómicos en biofluidos, también se han identificado marcadores de inflamación en pacientes con EW. El análisis del perfil proteómico en plasma reveló mayor abundancia de fibrinógeno en pacientes con EW en comparación con el de pacientes con otras patologías que también conducen a fibrosis hepática. El fibrinógeno es un factor de la coagulación sintetizado por el hígado que aumenta en respuesta a inflamación, por lo que se presenta como un buen predictor de evolución de la cirrosis (Wang *et al.*, 2019).

## Introducción

El estudio del microbioma es un área de investigación dinámica que ha demostrado su implicación en la homeostasis del hígado (Mazagova *et al.*, 2015) y en el efecto del cobre ingerido sobre la actividad microbiana (Song *et al.*, 2018). Por ello, modificaciones del microbioma podrían tener un impacto significativo en el metabolismo del cobre en pacientes con la EW. Este hecho apoya la idoneidad de estudios del microbioma para la caracterización de biomarcadores en la EW. La microbiota intestinal influye en numerosos procesos biológicos del organismo, tales como respuesta inmunológica, digestión y metabolismo a través de sus interacciones simbióticas con el huésped (Baquero and Nombela, 2012). Si su homeostasis se ve alterada, componentes y metabolitos derivados de ésta se trasladan al hígado y otros órganos, produciendo inflamación (Ohtani and Kawada, 2019). Sabemos que la composición y la función de la microbiota puede cambiar rápidamente por acción de los hábitos alimentarios y por tanto, una dieta con prebióticos adecuados puede proporcionar beneficios saludables al huésped (Zmora *et al.*, 2019). De hecho, cada vez más se defiende que *one-size-fits-all-diet* no es realista y que se debe tender hacia una nutrición personalizada (Kolodziejczyk *et al.*, 2019). Mediante secuenciación del RNA ribosomal 16S (16S rRNA), en un estudio de microbiomas fecales en niños enfermos de NAFLD o NASH, los autores concluyeron que ambas entidades están asociadas con una disbiosis intestinal y que su gravedad estaría ligada a la abundancia de genes que codifican productos bacterianos inflamatorios (Schwimmer *et al.*, 2019). Loomba y colaboradores (2017) llevaron a cabo un estudio integrativo de la microbiota intestinal y el perfil metabólico en suero en pacientes con NAFLD, que les permitió seleccionar 37 especies bacterianas diferencialmente representadas entre cada uno de los estadios de la enfermedad que permitirían predecir la presencia de fibrosis avanzada. En pacientes con EW se observó una disminución de la flora intestinal que podría estar relacionada con una respuesta inmune deficiente (Geng *et al.*, 2018). Así, se sabe que pacientes con EW presentan desregulación de citoquinas que parece estar asociada con la gravedad de los signos clínicos, tanto neurológicos como hepáticos (Wu *et al.*, 2019). De hecho, análisis proteómicos de pacientes con EW asintomáticos comparados con individuos control mostraron que el complemento C3, el factor B y la  $\alpha$ 2-macroglobulina, que forman parte del sistema de inmunidad innata y están relacionados con estrés oxidativo e inflamación, son buenos candidatos como biomarcadores para estadios tempranos de la EW (Park *et al.*, 2009). Más recientemente, la disbiosis intestinal detectada en pacientes con EW se ha concretado en una disminución del ecosistema microbiano con pérdida de diversidad bacteriana, relacionada con factores de transcripción y transportadores dependientes de ATP (ABC; *ATP-binding cassette*) (Cai *et al.*, 2020)

Indudablemente, las aproximaciones centradas en el análisis del microbioma se complementan con el metaboloma. Ésta es una estrategia en auge que ha llevado al

desarrollo de un sistema de análisis integrador para pacientes con carcinoma hepatocelular y cirrosis hepática para la detección de rutas compartidas entre ambos procesos patológicos (Kim *et al.*, 2020). Los autores concluyeron que el carcinoma hepatocelular está más relacionado con metabolismo de lípidos y aminoácidos que el desarrollo de cirrosis hepática. Para la EW se ha descrito un perfil metabolómico característico que incluye metabolitos implicados en el metabolismo de aminoácidos y de la colina, del ciclo de Krebs, así como relacionados con estrés oxidativo (Sarode *et al.*, 2019). En su conjunto, en relación a la EW, es un área apasionante en un marco combinado de microbioma y metaboloma, en busca de una mayor especificidad, de metabolitos que actúen de mensajeros entre la microbiota y el sistema inmune (Levy *et al.*, 2016; Vernocchi *et al.*, 2016).

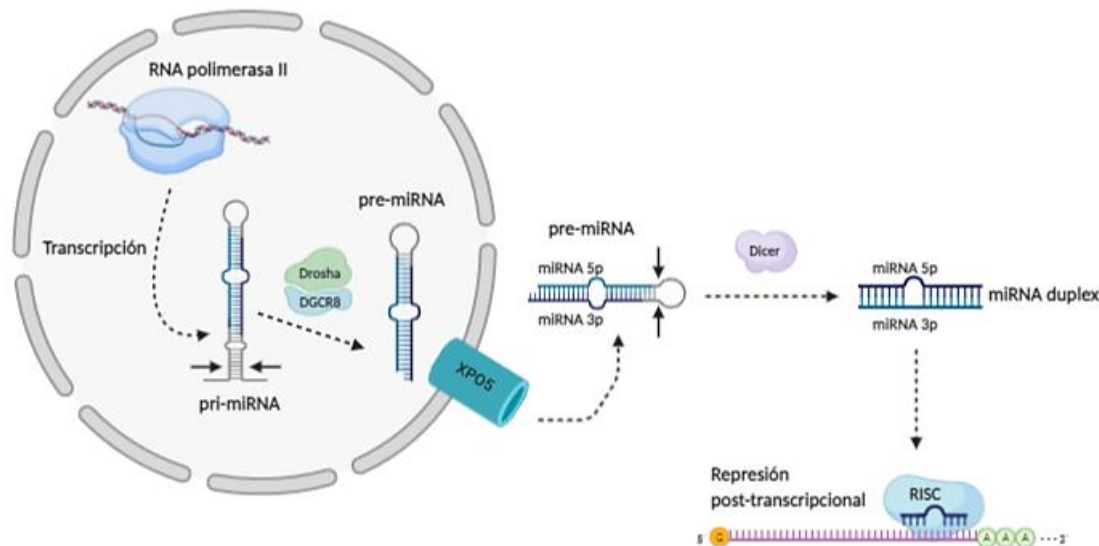
Todo ello pone de manifiesto que aproximaciones equivalentes, combinadas con otros test no invasivos en suero o plasma así como pruebas de imagen, podrían ser de utilidad para mejorar el seguimiento y anticiparse a la evolución de la enfermedad en los pacientes con EW, e incluso podrían resultar útiles para la monitorización de nuevos fármacos hacia una medicina de precisión.

## 5.2 Potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores

Los microRNAs (miRNAs) circulantes en biofluidos son ampliamente investigados como marcadores no invasivos para el diagnóstico y pronóstico de un gran número de patologías, entre ellas neoplasias, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, hepáticas, autoinmunes e incluso en infecciones virales (Calvopina *et al.*, 2016). Los miRNAs son moléculas de RNA no codificantes de cadena corta (entre 16-28 nucleótidos) conservados evolutivamente que regulan la expresión de genes diana mediante unión por complementariedad de bases con regiones intrónicas o 3' UTR en los mRNA correspondientes. La biogénesis de los miRNAs en la célula consta de varios pasos de procesamiento, que incluyen su transcripción en el núcleo, fragmentación y maduración final en el citoplasma (Figura I9). Inicialmente, se transcriben como miRNAs primarios (pri-miRNA) en el núcleo, en donde sus extremos 5' y 3' son procesados por el complejo formado por la enzima Drosha y la proteína de unión a RNA de doble cadena DGCR8, para dar lugar al miRNA precursor (pre-miRNA). Ambas conformaciones se caracterizan por presentar una estructura secundaria en forma de horquilla (*hairpin*). A continuación, la exportina-5 (XPO5) se encarga de transportar el pre-miRNA al citoplasma, lugar en el que es cortado por la enzima Dicer. En este paso se genera un dúplex de RNA, con dos hebras que se corresponden cada una con los dos brazos del pre-miRNA, 5p y 3p, ambas hebras se consideran miRNAs maduros. Uno de los dos miRNAs maduros, 5p o 3p, será retenido por la proteína AGO para pasar a ser incorporado al complejo de silenciamiento RISC, y así modular la expresión de genes diana. La hebra del que deriva el miRNA maduro reclutado

## Introducción

por la maquinaria de silenciamiento se le denomina “hebra guía”, quedando descartada la hebra opuesta, denominada “hebra pasajera”, que pasa a ser degradada (Matsuyama and Suzuki, 2020). Los ratios de miRNA maduro 5p o 3p derivados de cada duplex de RNA varían según el tipo celular, tejido, el estadio de desarrollo o de enfermedad, incluso llegando a ser en algunos casos ambos funcionales al mismo nivel (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014; Desvignes *et al.*, 2015).



**Figura 19: Esquema de la biogénesis de los miRNAs en la célula.** Adaptada de Matsuyama and Suzuki (2020).

Los miRNAs maduros también pueden ser liberados por las células a los fluidos circulantes del organismo, como consecuencia de eventos de daño tisular, apoptosis y necrosis, o mediante secreción, como parte de un mecanismo de comunicación con otras células, tejidos u órganos. Estudios previos han mostrado que en torno al 10 % de miRNAs circulantes son embebidos y secretados en exosomas, mientras que el 90 % restante se encuentra formando complejos con proteínas de la familia argonauta como AGO2 y lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High-Density Lipoprotein*), lo que les confiere mayor estabilidad y protección frente a degradación por RNAasas, cambios de pH o temperatura. Los miRNAs circulantes son fácilmente accesibles al estar presentes en fluidos que, de rutina, son ya objeto de otros análisis clínicos como sangre, orina, suero y plasma. Por otra parte, son específicos del tejido o tipo celular del que provienen, y los niveles de detección correlacionan con la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad, siendo ya detectables en los primeros estadios (Condrat *et al.*, 2020). Estas características hacen de los miRNAs circulantes buenos candidatos a ser biomarcadores pronóstico y diagnóstico de una enfermedad.

Hasta la fecha, se han anotado más de 2000 miRNAs localizados en regiones exónicas y otras no codificantes (intergénicas e intrónicas) que modularían la expresión de hasta el 60% de los genes que codifican para proteínas que participan en el control del ciclo celular, procesos de diferenciación, proliferación, apoptosis y metabolismo (Szelenberger *et al.*, 2019). El hígado es uno de los órganos con mayor capacidad regenerativa, implicado en procesos metabólicos esenciales para la vida, por lo que los miRNAs son fundamentales para su regulación. Alteraciones en los patrones de expresión de miRNAs en hígado, y variaciones de su presencia en biofluidos, principalmente suero y plasma, han sido asociadas a distintos rasgos clínicos de enfermedad hepática, entre ellos esteatosis, hepatitis, cirrosis y hepatocarcinoma. El miRNA miR-122 es el más abundante con expresión específica en hígado adulto, representando más del 70 % del conjunto de miRNAs detectables en este órgano, aunque no es el único. El miR-122 desempeña un papel clave en funciones metabólicas así como de desarrollo, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis de hepatocitos (Bandiera *et al.*, 2015). De hecho, niveles altos de miR-122 se han relacionado con hígado graso y metabolismo de lípidos (Pirola *et al.*, 2015; Raitoharju *et al.*, 2016). Por ello, niveles altos de expresión/presencia de miR-122 pueden estar asociados a enfermedades crónicas del hígado, de modo que se le considera un marcador general de daño hepático. En líneas generales, el empleo de miRNAs como biomarcadores va a más dada la facilidad para su obtención al no tener que utilizar métodos invasivos. Así, tanto para NAFLD como para hepatitis B se han validado miRNAs que pudieran ser útiles como biomarcadores pronóstico (Tan *et al.*, 2015; López-Riera *et al.*, 2018).

En lo que respecta a la EW, Siaj y colaboradores (2012) monitorizaron durante 12 semanas en el modelo de rata LEC, niveles de miR-122 circulantes y parámetros bioquímicos de función hepática (ALT, AST y bilirrubina) en suero mientras se les suministraba una dieta rica en cobre para inducir daño hepático. Comprobaron que, progresivamente, los niveles de miR-122 aumentaban significativamente y que dicho incremento se comenzaba a detectar incluso dos semanas antes que en los análisis bioquímicos, alcanzándose el máximo en el estadio de hepatitis fulminante. A continuación, se sometieron a un trasplante de hepatocitos, y de la misma forma monitorizaron la respuesta, observándose la normalización de los niveles circulantes de este marcador en las ratas supervivientes. Esta prueba de concepto demuestra el potencial de miR-122 y posiblemente otros miRNAs circulantes para la detección precoz de eventos adversos en el seguimiento clínico de los pacientes con EW.



**CAPÍTULO I:  
ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN GENÉTICA EN  
PACIENTES CON FENOTIPO CLÍNICO DE EW**





## Hipótesis y Objetivos del Capítulo I

1. El **diagnóstico molecular** establece un diagnóstico certero y definitivo. En una enfermedad como la EW que cuenta con tratamiento específico, el diagnóstico temprano es esencial para evitar el avance de la enfermedad y con ello, daños irreversibles. El estudio genético de *ATP7B* en profundidad (exones, intrones, promotor y regiones reguladoras) permitiría alcanzar un diagnóstico definitivo en pacientes con sospecha clínica de EW. En aquellos casos en los que el estudio resulte negativo, se podría descartar con certeza que la enfermedad no está causada por mutaciones en *ATP7B*, y por tanto, se debiera investigar la posibilidad de que se tratara de un caso con fenotipo *Wilson-like* con estudios genéticos más amplios (secuenciación de exoma/genoma).
2. El factor predictivo más realista de una enfermedad monogénica es la naturaleza de la mutación responsable. La correlación genotipo-fenotipo es difícil debido entre otras causas, a factores ambientales, epigenéticos y genéticos que modulan el cuadro clínico. En la EW existe una expresividad variable con individuos que presentan daño hepático o síntomas neurológicos, mientras que otros manifiestan ambos, o incluso permanecen asintomáticos. Postulamos que se podrían identificar **modificadores genéticos** mediante el estudio del fondo genético de familiares que padezcan la enfermedad y muestren diferencias en la edad de debut y/o el cuadro clínico, y también mediante el análisis de genes relacionados con el gen *ATP7B* responsable de la EW y el metabolismo del cobre.

### Objetivos específicos del Capítulo I

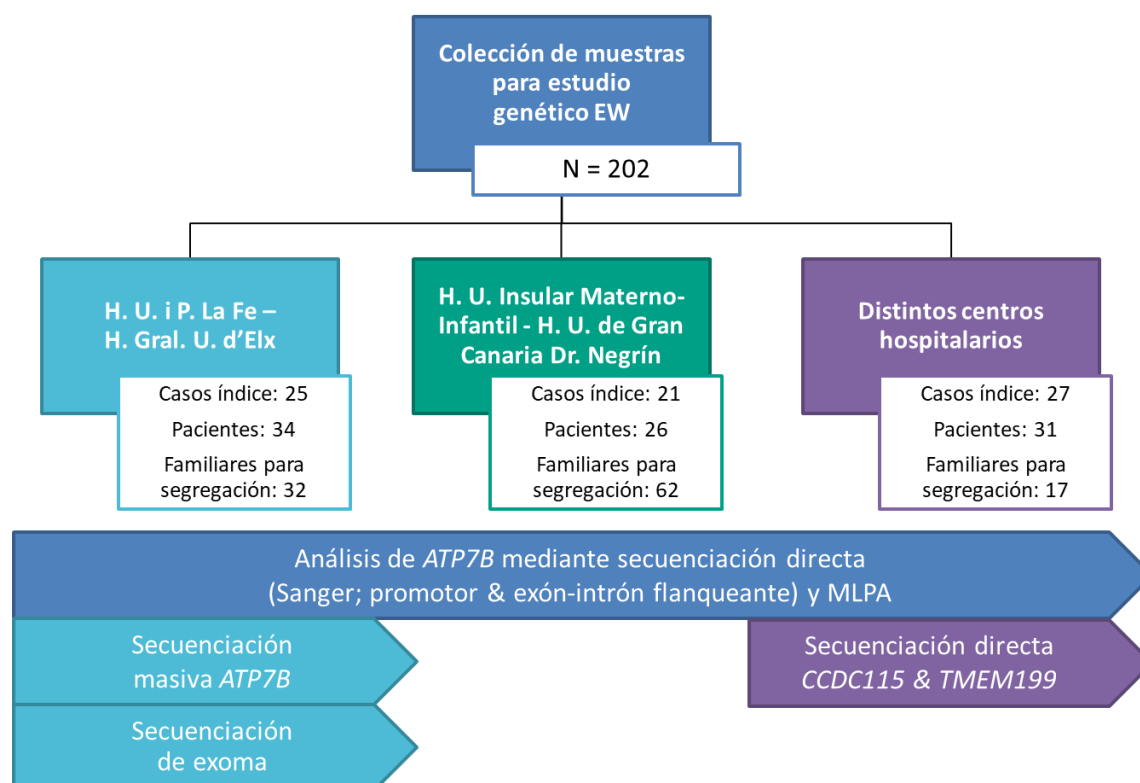
1. Análisis mutacional de *ATP7B* y otros genes implicados en enfermedades hepáticas relacionadas, así como el estudio del exoma para el diagnóstico molecular de pacientes con cuadro clínico compatible con la EW.
2. Investigación funcional del efecto sobre la expresión y regulación de variantes en *ATP7B*.
3. Estudio del exoma en familias con EW y un cuadro clínico singular para la identificación de variantes en genes que puedan modular el fenotipo clínico. Análisis funcional de cambios candidatos.
4. Cribado de variantes candidatas en genes relacionados con *ATP7B* y/o el metabolismo del cobre en pacientes seleccionados con EW.



## Resultados

### 1. Cribado mutacional de *ATP7B* y otros genes implicados en enfermedades hepáticas relacionadas

El flujo de trabajo establecido para el estudio genético de muestras de pacientes con la enfermedad de Wilson (EW) se muestra en la Figura R1.1.



**Figura R1.1:** Colección de muestras para estudio genético de la EW y su distribución según el lugar de procedencia de la muestra. Flujo de análisis genético seguido para todas las muestras.

En primer lugar, en las 73 muestras de casos índice se llevó a cabo el análisis genético de *ATP7B* mediante secuenciación directa (Sanger) de sus regiones codificantes e intrónicas flanqueantes. En los casos con una única variante patológica (P) o probablemente patológica (PP) detectada en heterocigosis o en los que no se identificaba ningún cambio, se procedía al análisis de la región promotora, y en un segundo lugar de la dosis génica de *ATP7B* mediante MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). En el Anexo II se incluye una tabla que recoge las variantes detectadas en *ATP7B* siguiendo esta metodología, así como su clasificación según criterios de la ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*).

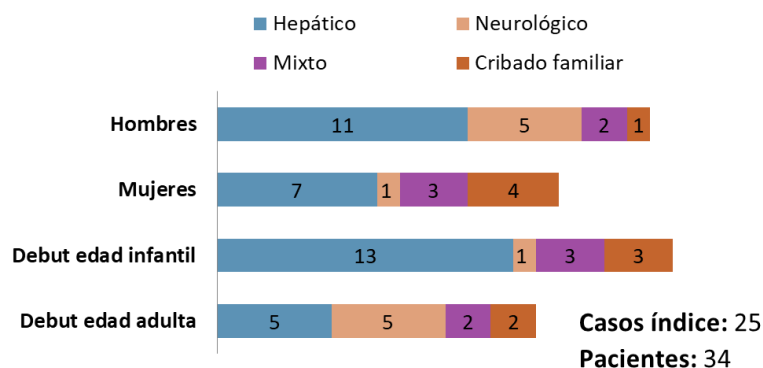
En caso de no obtener un diagnóstico concluyente, se investigó la secuencia completa del gen *ATP7B*, incluyendo regiones intrónicas y reguladoras, mediante secuenciación

masiva. Una vez descartado el gen *ATP7B* en su totalidad, se procedió a la secuenciación del exoma.

### 1.1 Serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx

Esta serie clínica comprende 34 pacientes pertenecientes a 25 familias. Los pacientes pertenecientes a la misma familia eran hermanos en todos los casos, tratándose de gemelos monocigóticos en dos casos (fEW-44 y fEW-17). En las Tablas 1 y 2 del Anexo I se muestran los principales hallazgos clínicos recogidos en las evaluaciones llevadas a cabo por los especialistas que los supervisan, así como el resultado del estudio genético en cada caso. Los resultados obtenidos en esta serie han sido publicados en Sánchez-Monteaquedo *et al.* (2020).

En la Figura R1.2 se muestra el perfil de los pacientes al diagnóstico. La forma de presentación de la enfermedad más frecuente fue la hepática (18 casos), seguida de la neurológica (seis casos) y mixta (cinco casos), siendo diagnosticada en asintomáticos mediante cribado familiar en otros cinco casos. La distribución de los pacientes por género fue: 14 (44,1 %) mujeres y 19 (55,9 %) hombres. La edad media de debut de la enfermedad fue de 13 (3-45) y 14,25 (3-48) años para pacientes hepáticos; 25,80 (13-39) y 27 (14-40) años para neurológicos; y 15 (3-25) y 16,3 (4-27) años para pacientes con fenotipo mixto.



**Figura R1.2: Perfil al diagnóstico de los pacientes reclutados en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx.**

El examen neurológico reveló que siete de los 18 pacientes hepáticos también presentaban signos neurológicos: temblor postural (100 %), distonía de la mano (42,8 %), tartamudeo (14,3 %), parestesia disminuida (14,3 %) y depresión (14,3 %).

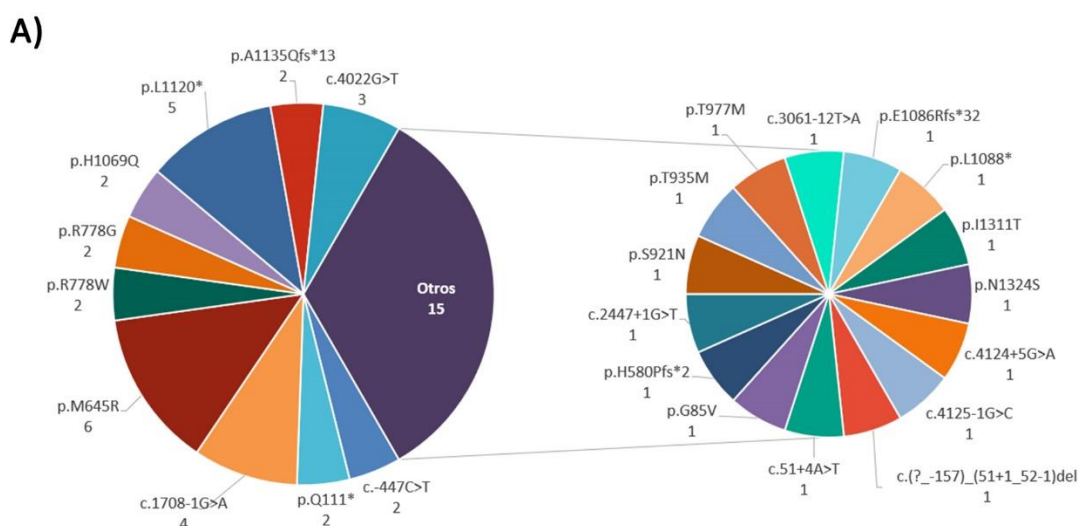
Los 34 pacientes contaban con diagnóstico clínico de EW en base a la puntuación establecida por la escala de Leipzig ( $\geq 4$ ). Sólo la paciente EW111 tuvo una puntuación menor en la escala Leipzig (=2), aunque su diagnóstico fue de EW. El motivo fue que su hermano EW110 presentaba un cuadro clínico grave con una puntuación en la escala de Leipzig de 5, por lo que se concluyó que su hermana EW111 debía padecer también EW.

Por último, en dos casos, EW08 y EW193, la evaluación con la escala Leipzig no se realizó al disponer de una historia clínica parcial.

### 1.1.1 Variantes identificadas en *ATP7B* mediante secuenciación directa y MLPA

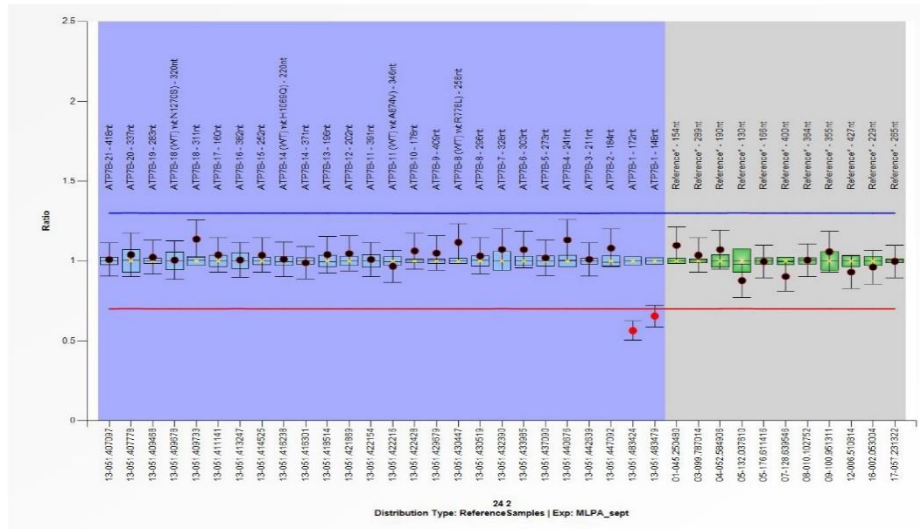
En el análisis de regiones codificantes e intrónicas flanquantes mediante secuenciación directa de *ATP7B*, en 20 de 25 casos se identificaron dos mutaciones P/PP y en un caso una única mutación, detectándose la segunda mutación, una delección en heterocigosis del exón 1, mediante MLPA (EW24) (Figura R1.3B). En otro caso adicional, se detectó una mutación novel en homocigosis, c.-447C>T, al analizarse la región promotora mediante secuenciación directa (EW182). Además de ésta, en los 20 casos anteriormente mencionados, otras dos mutaciones noveles fueron detectadas: una variante de cambio de pauta de lectura, p.E1086Rfs\*32, y una variante de *splicing*, c.4125-1G>C (Figura R1.3A y Anexo II). En su conjunto, con esta aproximación metodológica, se logró el diagnóstico genético en 22 de 25 casos.

Se detectaron un total de 25 variantes P/PP distintas, siendo p.M645R la más frecuente, identificada en heterocigosis compuesta en seis casos, seguida de p.L1120\*, detectada en cinco casos. En cambio, c.1708-1G>A sólo se detectó en homocigosis en dos familias de etnia romaní (fEW-33 y fEW-37), por lo que se sospecha la existencia de un posible efecto fundador para esta variante. Se detectaron un total de 15 variantes en un único alelo (Figura R1.3A).



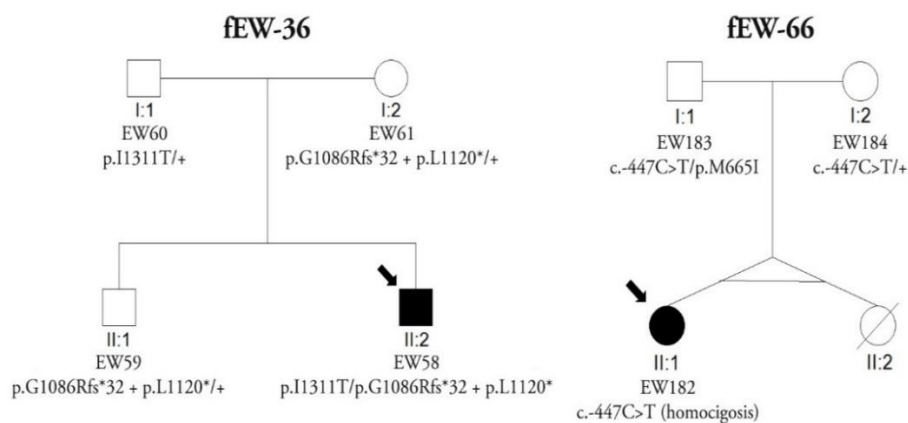
(continúa en la siguiente página)

B)



**Figura R1.3: Variantes patológicas (P) y probablemente patológicas (PP) caracterizadas en *ATP7B* mediante secuenciación directa y MLPA en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’ Elx. A) Distribución de las variantes identificadas. Bajo cada mutación se indica el número de alelos identificados portadores del cambio en los casos índice estudiados. B) Deleción del exón 1 detectada en la muestra EW24 mediante MLPA. En la gráfica se representa el ratio de señal de hibridación de sonda esperada frente a la observada para cada exón, detectándose una disminución de la señal para las sondas del exón 1 (ratio <0,65).**

En dos familias, fEW-36 y fEW-66, se detectaron tres mutaciones en heterocigosis en *ATP7B* en cada una de ellas (Figura R1.4). En el probando de la familia fEW-36, se identificó p.I1311T heredado de su padre, y los cambios p.E1086Rfs\*32 y p.L1120\* heredados ambos en *cis* de su madre. Con respecto a la familia fEW-66, en la probando se detectó la variante novel c.-447C>T en homocigosis. Ambos progenitores eran portadores del citado cambio en heterocigosis, pero además en el padre se identificó la sustitución p.M665I. Tras evaluar clínicamente al padre y comprobar que no cursaba con la EW, se descartó que se tratara de una variante patológica.



**Figura R1.4: Familias con tres variantes detectadas en *ATP7B*.**

### 1.1.2 Estudio completo del gen *ATP7B* mediante enriquecimiento dirigido y secuenciación masiva

En los casos índice EW13 y EW27, en los que sólo una o ninguna variante P/PP se identificó en *ATP7B* tras el estudio mediante secuenciación directa y MLPA, se amplió el estudio con el análisis de regiones no codificantes del gen. Para ello, se desarrolló una estrategia basada en la captura por hibridación y secuenciación masiva de la secuencia completa de *ATP7B*, esto es, todos los exones, intrones, regiones 5' y 3'-UTR y promotor. Es importante destacar que esta aproximación hizo posible determinar el alcance de la delección del exón 1 identificada en heterocigosis en EW24 mediante MLPA.

#### **Validación de la herramienta diagnóstica: evaluación de la cobertura y detección de controles positivos**

En primer lugar, al tratarse de una nueva herramienta diagnóstica NGS, se evaluó el rendimiento de la captura y de la cobertura en las tres muestras estudiadas (Tabla R1.1).

**Tabla R1.1: Evaluación de la cobertura, enriquecimiento y *variant calling* de la herramienta NGS.**

	EW13	EW27	EW24*
<i>Fold Enrichment</i>	1648,2	2119,5	1807,94
% lecturas que cubren regiones de interés ( <i>on-target</i> )	27,41	32,54	26,96
% lecturas que cubren regiones inespecíficas ( <i>off-target</i> )	72,59	67,46	73,04
% lecturas duplicadas	15,33	15,63	13,28
Cobertura media panel	343,90	383,01	339,78
<i>ATP7B</i>			
Cobertura media	363,06	411,99	351,86
% bases >1	100	100	100
% bases >10	99,5	99,5	99,6
% bases >20	98,9	98,7	98,8
% bases >100	91,4	91,5	91
% bases >200	86,2	86,9	84
SNVs & <i>Indels</i> identificados	67	19	117

(\*control positivo heterocigoto para una delección que abarca el exón 1)

En las tres muestras, se alcanzó una cobertura media >300x del panel diseñado para la captura completa de cuatro genes (incluido *ATP7B*). En particular, la cobertura media de *ATP7B* en las tres muestras de interés fue superior a 350x. Si bien en este gen el 99 % de las bases fueron cubiertas por al menos 10 lecturas o *reads*, para una cobertura superior a 20x este valor fue del 98 %. Posteriormente, se examinó en detalle qué regiones habían sido cubiertas <20x. Se determinó que se localizaban todas en el intrón 1, que es el más

largo (~37 kb), y que se correspondían parcialmente con elementos repetitivos anotados en RepeatMasker (Tabla R1.2).

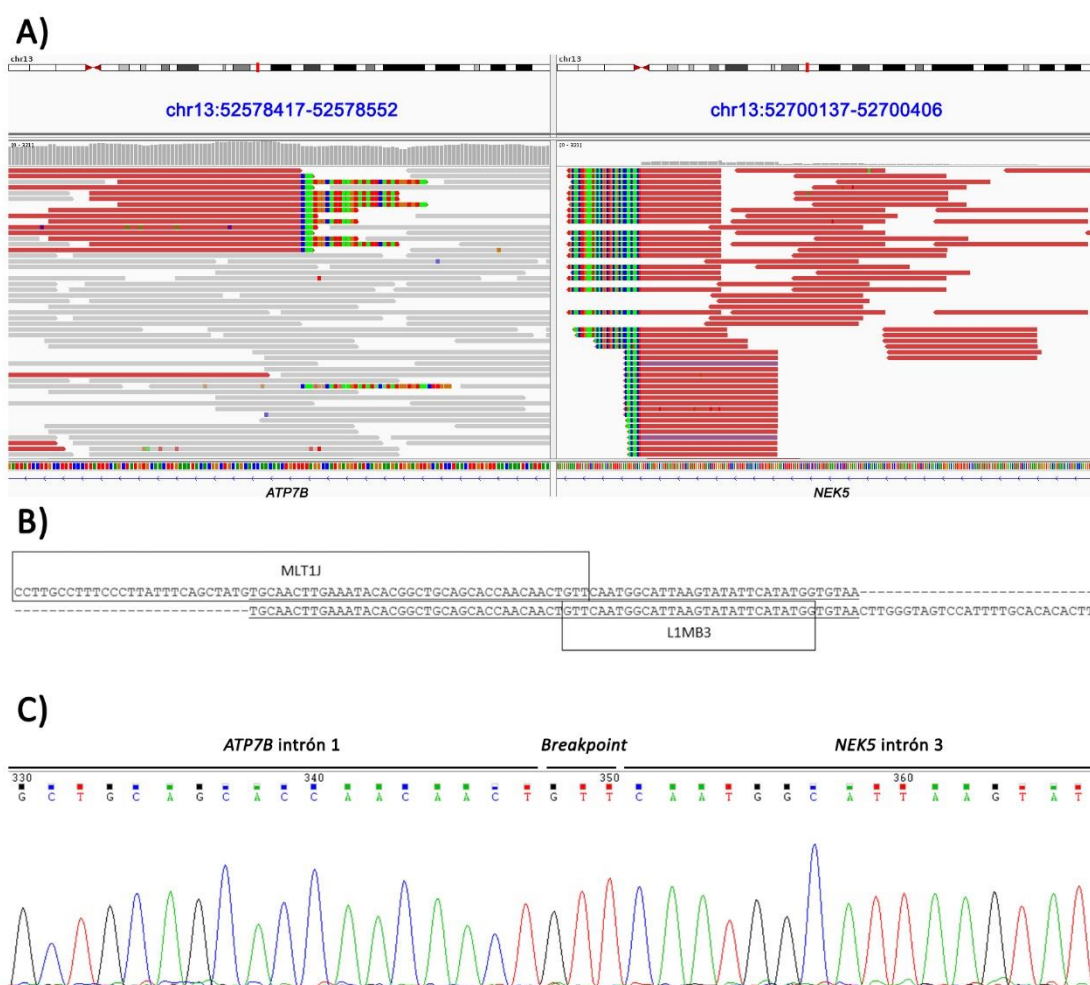
**Tabla R1.2: Regiones con cobertura <20x en *ATP7B* y su anotación con elementos repetitivos de la base de datos RepeatMasker.**

Región cromosómica*	Tamaño (pb)	RepeatMasker	Tamaño RepeatMasker (pb)	% elemento RepeatMasker poco cubierto
13:52537865-52537883	19	AluSq10	306	6,21
13:52558451-52558518	68			
13:52558644-52559163	520			
13:52559428-52559509	82			
13:52559911-52559911	1	L1PA7	6440	42,11
13:52560272-52560475	204			
13:52560761-52560814	54			
13:52561150-52562690	1541			
13:52562775-52563016	242			
13:52567010-52567204	195	AluSx1,L1ME4a	451	43,24
13:52576730-52576739	10	(GGGGA)n	50	20
Total bases cobertura <20x	2936			

\*Todas las regiones están localizadas en el intrón 1.

A modo de validación de la técnica, se estudió la muestra EW24, en la cual previamente se identificaron variantes patológicas mediante secuenciación directa y MLPA respectivamente. En el programa IGV se revisó el alineamiento del intrón 1, en la región del posible *breakpoint* 5' indicado por el análisis, y a través de la información aportada por el alineamiento anómalo de las lecturas que lo cubren, se concluyó que la delección se expande 121,7 kb *upstream* de *ATP7B*. Esto incluye la delección completa de los genes *ALG11* y *UTP14C* (hebra directa), y de casi todos los exones de *NEK5* (hebra reversa), determinándose el *breakpoint* 3' en el intrón 3 de este gen (Figura R1.5A). En el análisis de la secuencia donde se sitúa el *breakpoint*, se observa la microhomología "GTT", flanqueada por los elementos repetitivos MLT1J en 5' y L1MB3 en 3', ambos retrotransposones de tipo LTR (*long terminal repeat*) y LINE (*long interspersed nuclear element*), respectivamente (Figura R1.5B y C).

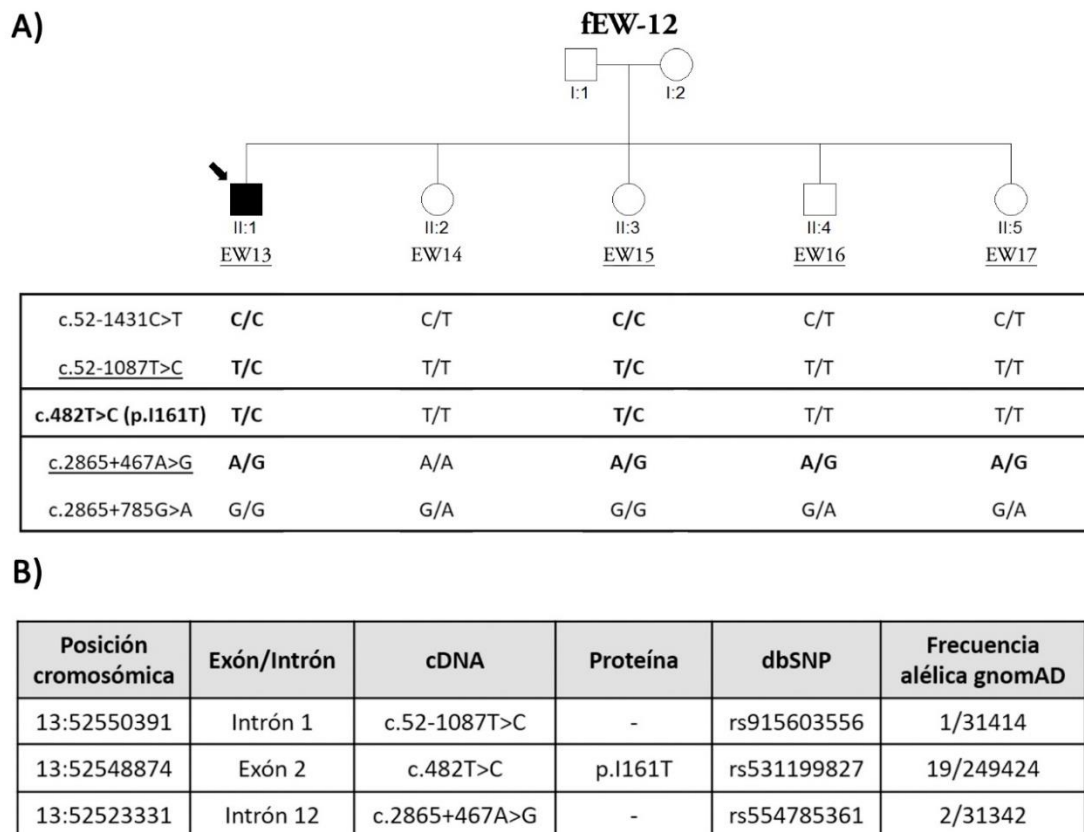




**Figura R1.5: Caracterización de la deletión en el cromosoma 13 detectada en EW24 mediante secuenciación masiva. A)** Visualización en IGV del alineamiento de las lecturas quiméricas en las regiones de *breakpoint*. Las lecturas observadas en el intrón 1 de *ATP7B* (*breakpoint* 5') también alinean parcialmente con una región del intrón 3 de *NEK5* (*breakpoint* 3') situada a 121,7 kb *upstream*. **B)** Alineamiento de la secuencias consenso de las lecturas que cubren los *breakpoints* 5' (arriba) y 3' (abajo). Se indica la anotación con elementos repetitivos de RepeatMasker y la secuencia quimérica está subrayada. **C)** Validación del *breakpoint* mediante amplificación y secuenciación directa del alelo portador de la deletión.

### ***Variantes candidatas identificadas***

De los dos casos estudiados, sólo se identificaron variantes con MAF <0,05 % (gnomAD) en EW13, probando de la familia fEW-12 (Figura R1.6). En la muestra de EW13 se detectaron un total de tres cambios en heterocigosis: una cambio de aminoácido en el exón 2, p.I161T, y dos mutaciones intrónicas profundas, c.52-1087T>C y c.2865+467A>G, en los intrones 1 y 12, respectivamente.

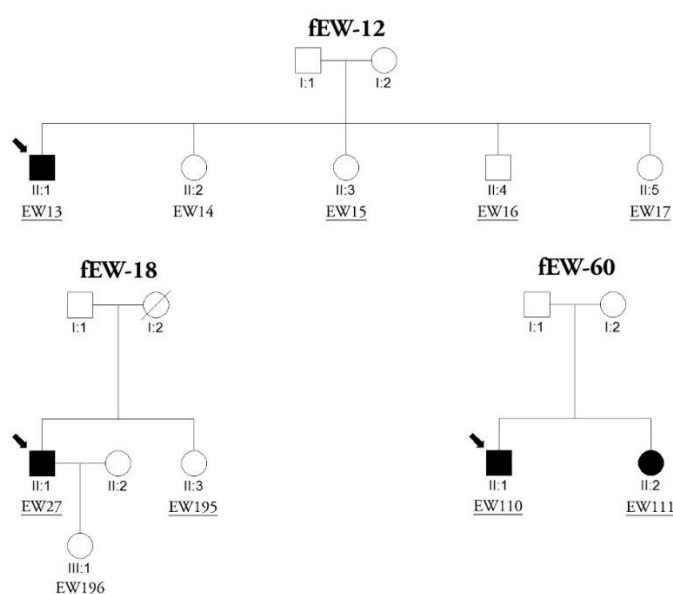


**Figura R1.6: Variantes identificadas en fEW-12 mediante diferentes estrategias de análisis genético de *ATP7B* (secuenciación directa y masiva). A)** Estudio de segregación de las variantes identificadas en el probando, EW13. Las variantes detectadas mediante secuenciación masiva están subrayadas, y en negrita el cambio identificado con ambas técnicas. Los cambios c.52-1431C>T y c.2865+785G>A son polimorfismos benignos detectados en el mismo amplicón de PCR de validación. **B)** Descripción de los cambios candidatos a ser mutación causal y su frecuencia alélica.

En la muestra del probando de la familia fEW-12, la variante p.I161T había sido previamente detectada mediante secuenciación directa. Se realizaron estudios de segregación para determinar la configuración alélica *cis/trans*, identificándose los cambios p.I161T y c.2865+467A>G en heterocigosis compuesta en EW13 y en su hermana asintomática, EW15 (Figura R1.6). Debido a que ambas mutaciones no habían sido previamente asociadas a patología y se desconocía sus posibles consecuencias fenotípicas, ambas fueron clasificadas como variantes de significado incierto (*Variant of Unknown Significance*; VUS).

### 1.1.3 Secuenciación de exoma

Al no lograr un diagnóstico genético concluyente de EW en los probandos de las familias fEW-12 y fEW-18 con las diferentes estrategias de análisis de *ATP7B* realizadas, éstos se investigaron mediante secuenciación de exoma (Figura R1.7). En este estudio se incluyó también la familia fEW-60, en la que previamente se descartó *ATP7B* como causa genética de la enfermedad ya que, además de que no habían sido identificadas mutaciones patológicas en el probando, se comprobó que ambos hermanos afectados no compartían el mismo haplotipo para el *locus ATP7B* (Tabla R1.3, en sombreado las variantes que difieren entre los pacientes).



**Figura R1.7: Familias investigadas mediante secuenciación de exoma.** Se indica el probando con una flecha y las muestras cuyo exoma se secuenció están subrayadas.

**Tabla R1.3: Haplotipo del locus *ATP7B* construido con los SNPs detectados en el cribado mutacional de los pacientes de la familia fEW-60.**

dbSNP	cDNA	MAF	EW110	EW111
rs143029892	c.-1353C>A	< 0,01	C/A	C/A
rs9563084	c.-520C>T	0,37	C/C	C/T
rs148013251	c.-123_-119dupCGCCG	0,37	-/-	-/CGCCG
rs2277448	c.-75C>A	0,48	C/C	C/A
rs114449708	c.1707+9T>C	0,01	T/C	T/C
rs9535809	c.1870-65G>A	0,22	G/A	G/A
rs1061472	c.2495A>G	0,5	A/G	A/G
rs732774	c.2855G>A	0,47	G/A	G/A
rs41292784	c.2866-105G>A	0,04	G/G	G/A
rs7325983	c.2866-13G>C	0,11	G/C	G/C
rs1801249	c.3419T>C	0,46	T/C	T/C
rs2282057	c.3903+6C>T	0,5	C/T	C/T
rs9535795	c.4021+50G>C	0,47	G/C	G/C

### ***Variantes candidatas identificadas***

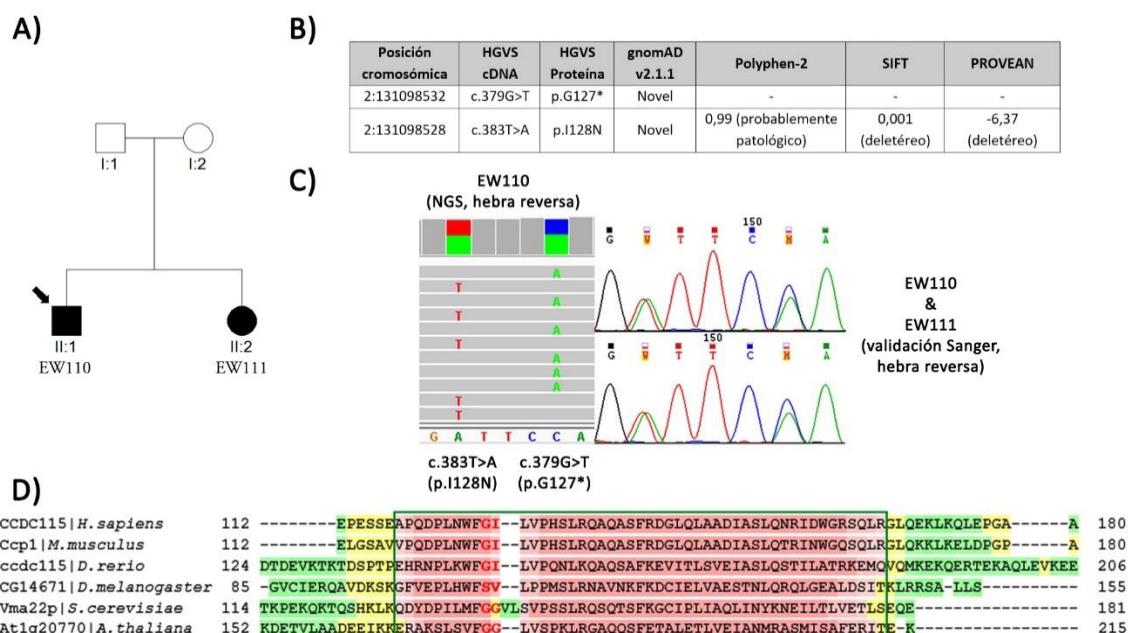
Las variantes detectadas en las tres familias se filtraron con los criterios establecidos (cambios con posible efecto deletéreo, MAF <0,5 % en gnomAD) y priorizadas a partir de los hallazgos obtenidos de las diferentes fuentes de información investigadas. Las variantes seleccionadas en cada caso se recogen en el Anexo III.

En la familia fEW-12, se realizó la secuenciación de exoma del probando y de tres hermanos (Figura R1.7) y se seleccionaron 14 cambios candidatos, bajo las hipótesis de herencia autosómica dominante y recesiva. Se llevaron a cabo análisis de segregación en las muestras de DNA de familiares disponibles, descartándose por una parte las variantes en los genes *TMX4*, *GON4L*, *ANTXRL* y *SLCO3A1* como posibles causantes de la enfermedad. Por otra parte, tres cambios se localizaban en genes relacionados con diferentes enfermedades: *RBM15* implicado en leucemia megacarioblástica aguda (MIM: 606077), *KCND3* descrito en síndrome de Brugada (MIM: 616399) y en ataxia espinocerebelosa tipo 19 (MIM: 607346) y *CACNA1H*, asociado a hiperaldosteronismo (MIM: 617027). El probando de la familia fEW-12 no presentaba signos asociados a ninguna de estas enfermedades. Las siete variantes restantes se localizaban en los genes *GON4L*, *ABCB8*, *ANTXRL*, *CCKBR*, *KIAA0430*, *FARSA* y *TPM4*; ninguno de estos genes ha sido previamente relacionado con enfermedad hepática.

En la familia fEW-18, se secuenciaron las tres muestras disponibles, seleccionándose finalmente 21 cambios candidatos bajo la hipótesis de herencia autosómica dominante (Figura R1.7). Se validaron variantes en genes relacionados con enfermedades hepáticas o con alta expresión en hígado: *JAG1*, *INSIG1*, *CTSO*, *KLC4*, *SLC22A7* y *SPDYC*. Variantes en *JAG1* y *KLC4*, implicados en síndrome de Allagile (MIM: 118450) y paraparesia espástica (Bayrakli *et al.*, 2015) respectivamente, fueron descartadas por análisis de segregación o porque el probando no presentaba un fenotipo clínico compatible con estas condiciones. De la misma forma, no se dispone de información suficiente para establecer si el resto de variantes que cosegregan con la enfermedad contribuyen al cuadro clínico.

Por último, en la familia fEW-60 se secuenció el DNA de ambos hermanos afectados (Figura R1.7) y se seleccionaron y priorizaron cambios bajo la hipótesis de herencia autosómica recesiva. Sólo se identificaron dos variantes en heterocigosis en los genes *TMPRSS11F*, *TSPAN17*, *TXLNA* y *CCDC115*. Tras revisar el alineamiento de las *reads* que cubren dichas variantes, se confirmó que habían sido detectadas en *cis*, excepto las variantes noveles c.379G>T (p.G127\*) y c.383T>A (p.I128N) localizadas en el gen *CCDC115* (Figura R1.8B y C). Este gen ha sido asociado a error congénito de la glicosilación tipo IIO (CDG2O) (MIM: 616828). El cambio c.379G>T daría lugar a un codón de parada temprano y el resultado de los predictores *in silico* de patogenicidad consultados apunta a que el cambio p.I128N

podría ser deletéreo (Figura R1.8B). Sobre la proteína CCDC115, ambos residuos mutados forman parte de un clúster conservado evolutivamente (Figura R1.8D). En base a las evidencias recogidas, los cambios p.G127\* y p.I128N se clasificaron como patológico y probablemente patológico, respectivamente, según los criterios de la ACMG.



**Figura R1.8: Análisis de las variantes identificadas en CCDC115.** **A)** Árbol genealógico de la familia fEW-60. **B)** Predicciones *in silico* de patogenicidad. **C)** Detalle de c.379G>T y c.383T>A en el visualizador genómico IGV en muestra del probando (EW110) y su validación mediante secuenciación directa (Sanger). Al estar situadas cerca, a partir del alineamiento se pudo comprobar que se encontraban en *trans* al no estar cubiertas por la misma lectura en ningún caso. **D)** Los residuos G127 e I128 se encuentran conservados evolutivamente.

#### 1.1.4 Resultados globales de la serie

Con el estudio genético de *ATP7B*, en 30 pacientes (22 casos) se logró un diagnóstico concluyente de EW con la identificación de variantes bialélicas P/PP, por lo que su puntuación en la escala de Leipzig aumentó en 4 puntos (rango final entre 6 y 12 puntos). (Tabla 1 del Anexo I).

En cuatro pacientes pertenecientes a tres familias (fEW-12, fEW-18 y fEW-60) no se detectaron mutaciones P/PP en *ATP7B*. No obstante, la puntuación en la escala de Leipzig de los casos índice se sitúa entre 4 y 6 puntos, por lo que un diagnóstico de EW es probable. En fEW-12 se identificó un cambio de aminoácido, p.I161T, junto con una variante intrónica profunda, c.2865+467A>G, ambas clasificadas como VUS. En fEW-18 y fEW-60 no se detectaron mutaciones candidatas en *ATP7B*, sin embargo con la secuenciación de exoma se pudo redirigir el diagnóstico en fEW-60 con la identificación de variantes P/PP en *CCDC115*, implicado en CDG20.

## 1.2 Cribado mutacional en pacientes de diferentes series

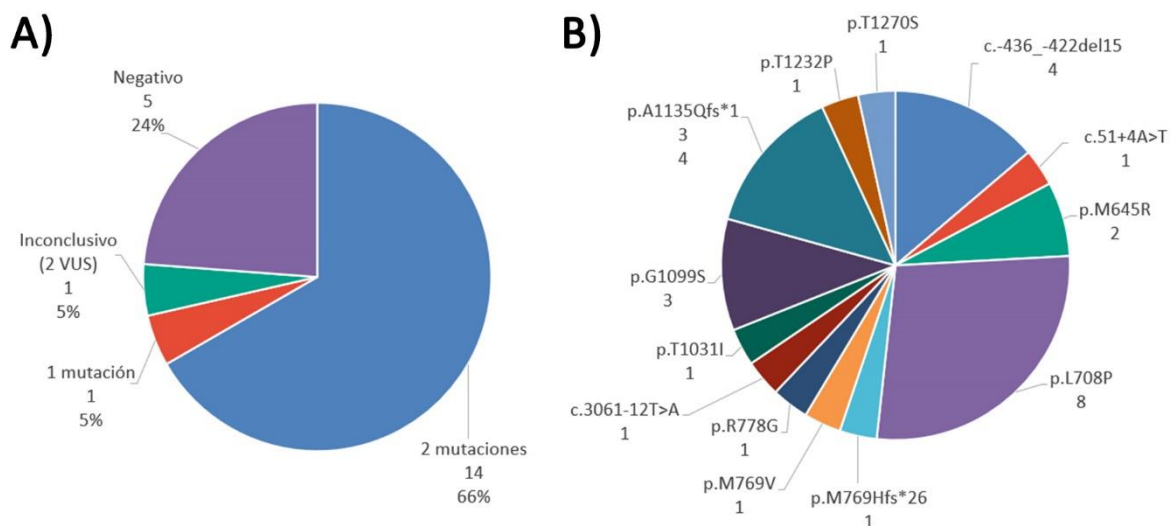
Se realizó el análisis genético de *ATP7B* mediante secuenciación directa y MLPA en 48 casos índice procedentes de distintos centros hospitalarios. Se distinguen dos subgrupos en función del número de pacientes remitidos de una misma zona geográfica.

### **Serie clínica H. U. Insular Materno-Infantil - H. U. de Gran Canaria Dr. Negrín**

Esta serie comprendía 26 pacientes, pertenecientes a 21 familias, que proceden de la isla de Gran Canaria. Los resultados obtenidos forman parte de la descripción clínica y genética de una cohorte más amplia publicada en García-Villarreal *et al.* (2020).

Se confirmó el diagnóstico de EW en 11 casos con la identificación de dos variantes P/PP en regiones codificantes e intrónicas flanqueantes, que se amplió a 14 casos con el estudio de la región promotora, esto suma el 66%. Sólo en un caso se detectó una única variante P/PP exónica en heterocigosis (Figura R1.9A).

Se identificaron 13 variantes P/PP distintas. El cambio más frecuente en esta serie es p.L708P, seguido de p.A1135Qfs\*13, ambos detectados en todos los casos en heterocigosis. Destaca la delección de 15 pb del promotor, c.-436\_-422del15, observada en tres familias no relacionadas, en una de ellas en homocigosis. Excepto por las mutaciones p.M645R y p.G1099S, el resto se caracterizaron en un único alelo, siendo p.T1031I un cambio novel (Figura R1.9B, Anexo II).



**Figura R1.9: Resumen del análisis genético de *ATP7B* en los 25 casos índice de la serie clínica H. U. Insular Materno-Infantil – H. U. de Gran Canaria Dr. Negrín. A) Resultados del análisis genético mediante secuenciación directa y MLPA. B) Distribución de mutaciones P/PP detectadas según su frecuencia (número de alelos identificados portadores del cambio) en los casos índice estudiados.**

En cinco casos (24 %) el estudio genético de *ATP7B* resultó negativo, y en un caso se identificaron dos VUS en heterocigosis: c.-1059G>A y p.M665V (Figura R1.9A, Anexo II).

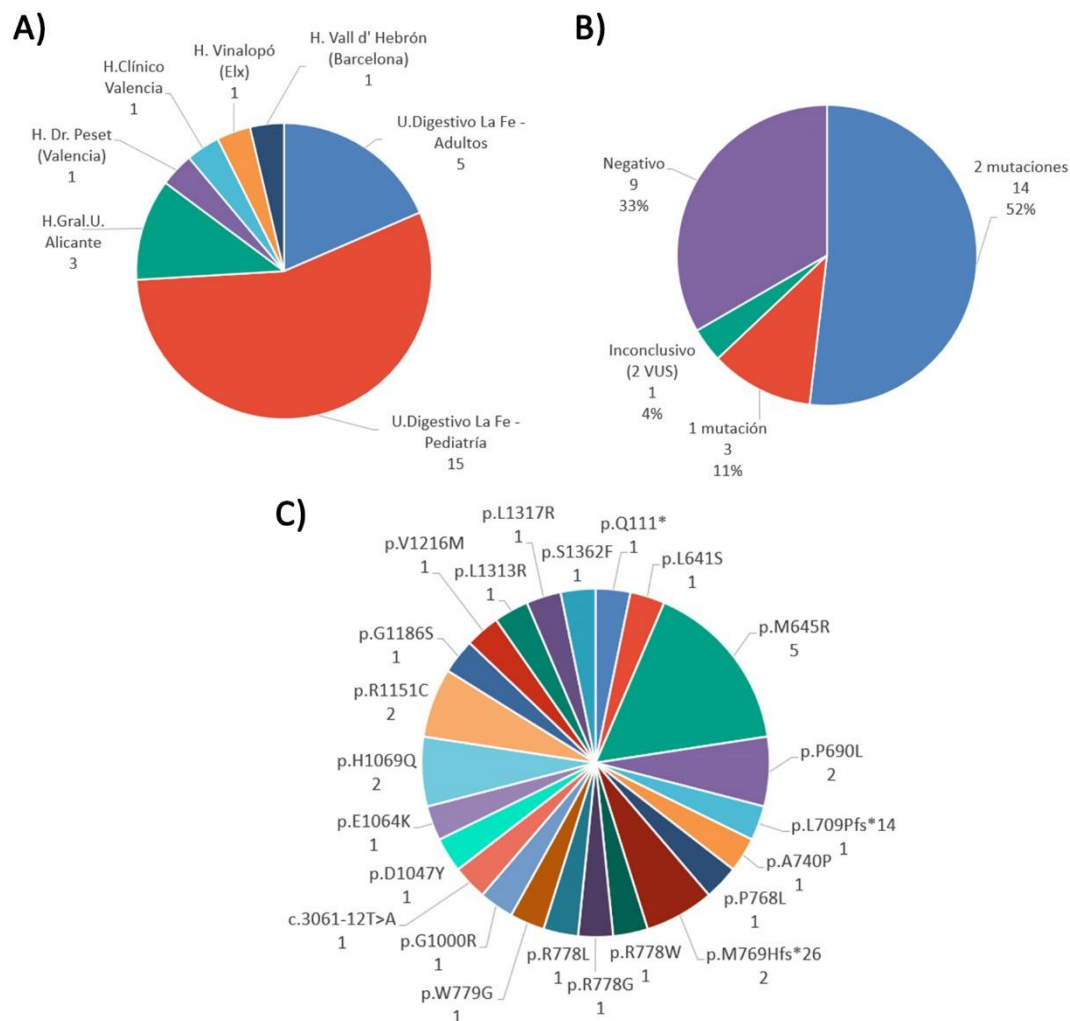
#### ***Pacientes procedentes de distintos centros hospitalarios***

Se recibieron un total de 31 muestras de pacientes, pertenecientes a 27 familias, que son seguidos en diferentes centros hospitalarios, en su mayoría de la Comunitat Valenciana (Figura R1.10A). En todos los casos, los especialistas que los supervisan apreciaron signos clínicos sugestivos de posible EW, por lo que la prueba genética se incluía dentro de la evaluación según la escala de Leipzig.

Se logró un diagnóstico definitivo de EW en la mitad de casos estudiados (52 %, 14 casos) con la identificación de dos mutaciones P/PP, pero en tres casos (11 %) sólo se caracterizó un cambio, todos ellos localizados en regiones codificantes e intrónicas flanqueantes. El ensayo de MLPA resultó negativo en todos los casos. En nueve casos (33 %) no se detectaron mutaciones P/PP en *ATP7B*, quedando descartado el diagnóstico de EW (Figura R1.10B). Destacar que en 11 de los 12 casos con una o ninguna mutación en *ATP7B*, se trataba de pacientes pediátricos. Debido a que el cuadro clínico en parte era compatible con EW, en siete de ellos se amplió el estudio con el análisis genético mediante secuenciación directa de *CCDC115* y *TMEM199*, genes implicados en trastornos congénitos de la glicosilación tipo II, resultando negativo en todos los casos.

Se detectaron 23 mutaciones P/PP diferentes, habiéndose identificado el cambio p.M645R en cinco alelos, seguido de p.P690L, p.M769Hfs\*26 y p.H1069Q en dos alelos, siempre en heterocigosis. Sólo se identificó un doble homocigoto para las variantes c.1285+5G>T y p.R1151C, que en base a las evidencias recopiladas se clasificaron como PP y P, respectivamente. El resto de variantes se observaron en un único alelo, y tres de ellas son noveles: p.L709Pfs\*14, p.A740P y p.S1362F (Figura R1.10C). Con el estudio de la región promotora sólo se apreció una mutación en homocigosis, c.-362C>T, que a pesar de ser una variante rara en la población, se clasificó como VUS al no disponer de suficiente información clínica del paciente para corroborar su posible patogenicidad (Figura R1.10B).



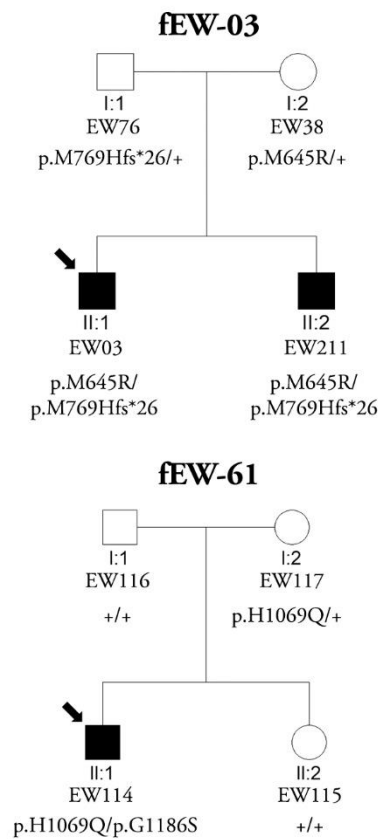


**Figura R1.10: Resumen del estudio genético de *ATP7B* realizado en 27 casos índice procedentes de diferentes centros hospitalarios. A) Distribución de los casos índice según el centro hospitalario de procedencia. B) Resultado del análisis genético de *ATP7B*. C) Distribución de mutaciones P/PP según su frecuencia (número de alelos identificados portadores del cambio).**

En algunas familias, los estudios de segregación contribuyeron a resolver el diagnóstico genético en el probando y a evidenciar posibles asintomáticos (Figura R1.11). En la familia fEW-03, el probando fue diagnosticado en edad infantil, y los estudios de segregación permitieron realizar un diagnóstico temprano de EW en su hermano nacido posteriormente, el cual comenzó a presentar signos de la enfermedad en el primer año de vida. En la familia fEW-61, en el probando se detectaron dos variantes P/PP en heterocigosis, p.H1069Q y p.G1186S. Sin embargo, sólo se caracterizó la variante p.H1069Q en su madre. Tras confirmar la paternidad de ambos progenitores, se determinó que el segundo cambio era *de novo*. Se corroboró que p.G1186S se encontraba en *trans* con respecto a p.H1069Q mediante amplificación por PCR y clonación del fragmento de DNA



genómico que comprende del exón 14 al exón 16 (3584 pb), en donde se localizan ambas variantes, respectivamente.



**Figura R1.11: Casos singulares con diagnóstico genético de la EW.** En la familia fEW-03, el estudio genético familiar permitió el diagnóstico precoz en el hermano del probando. En la familia fEW-61, los estudios de segregación familiar revelaron que p.G1186S era una mutación *de novo*, y estudios moleculares adicionales confirmaron que se encontraba en *trans* con respecto a p.H1069Q.

## 2. Estudios funcionales de expresión y regulación de variantes en *ATP7B*

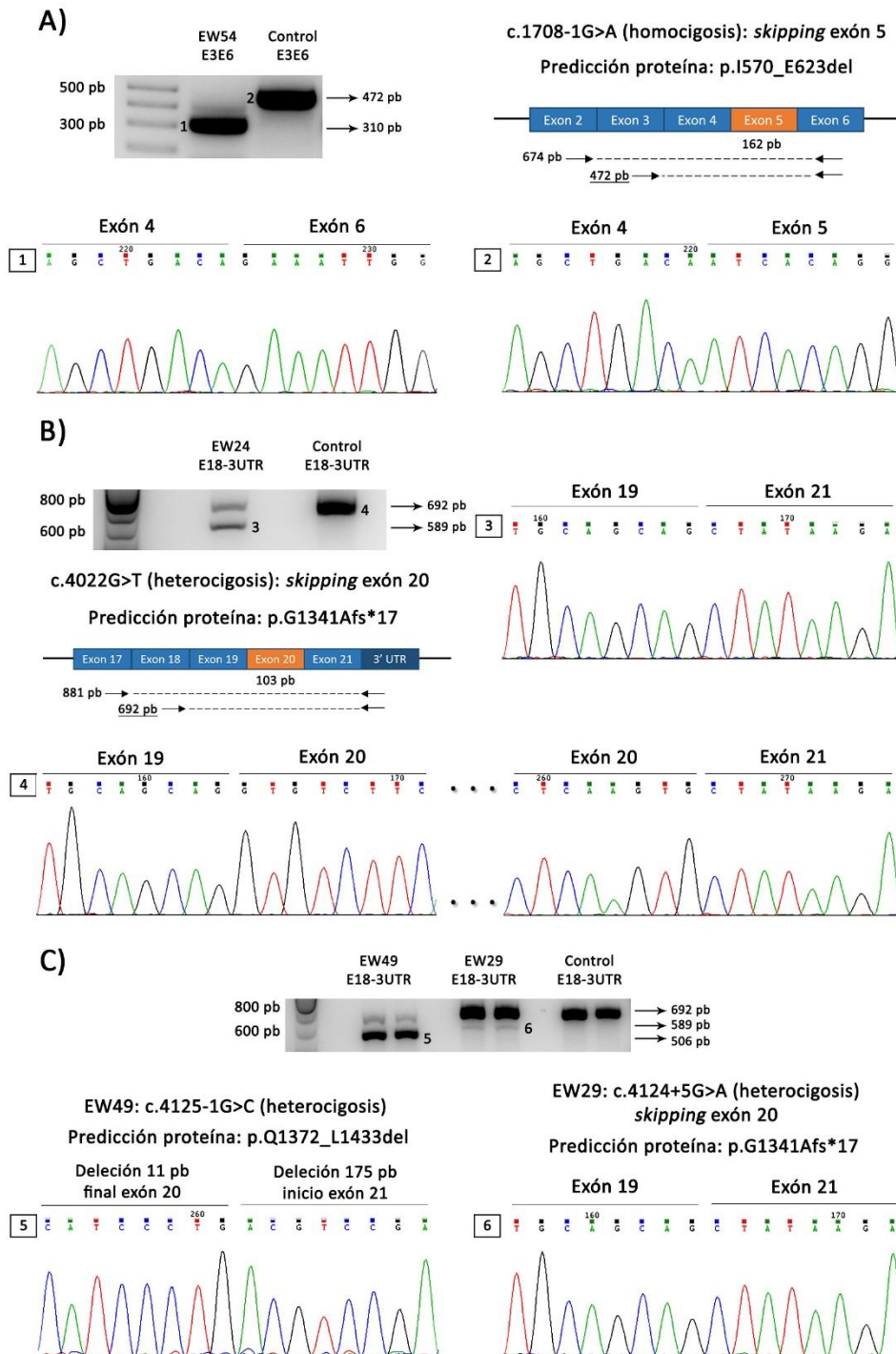
### 2.1 Caracterización de variantes de *splicing* en mRNA de sangre periférica y mediante ensayo de minigenes

Se investigaron seis variantes en *ATP7B* que podrían afectar al mecanismo de *splicing*. Inicialmente, se realizaron análisis computacionales para evaluar las posibles consecuencias de cada una (Anexo II, Figuras R1.12 y R1.13). Para confirmar las predicciones, se llevaron a cabo análisis en mRNA aislado de muestra de sangre periférica de pacientes portadores de los cambios, y en caso de no detectar alteraciones, se procedió a su estudio mediante ensayo de minigenes.

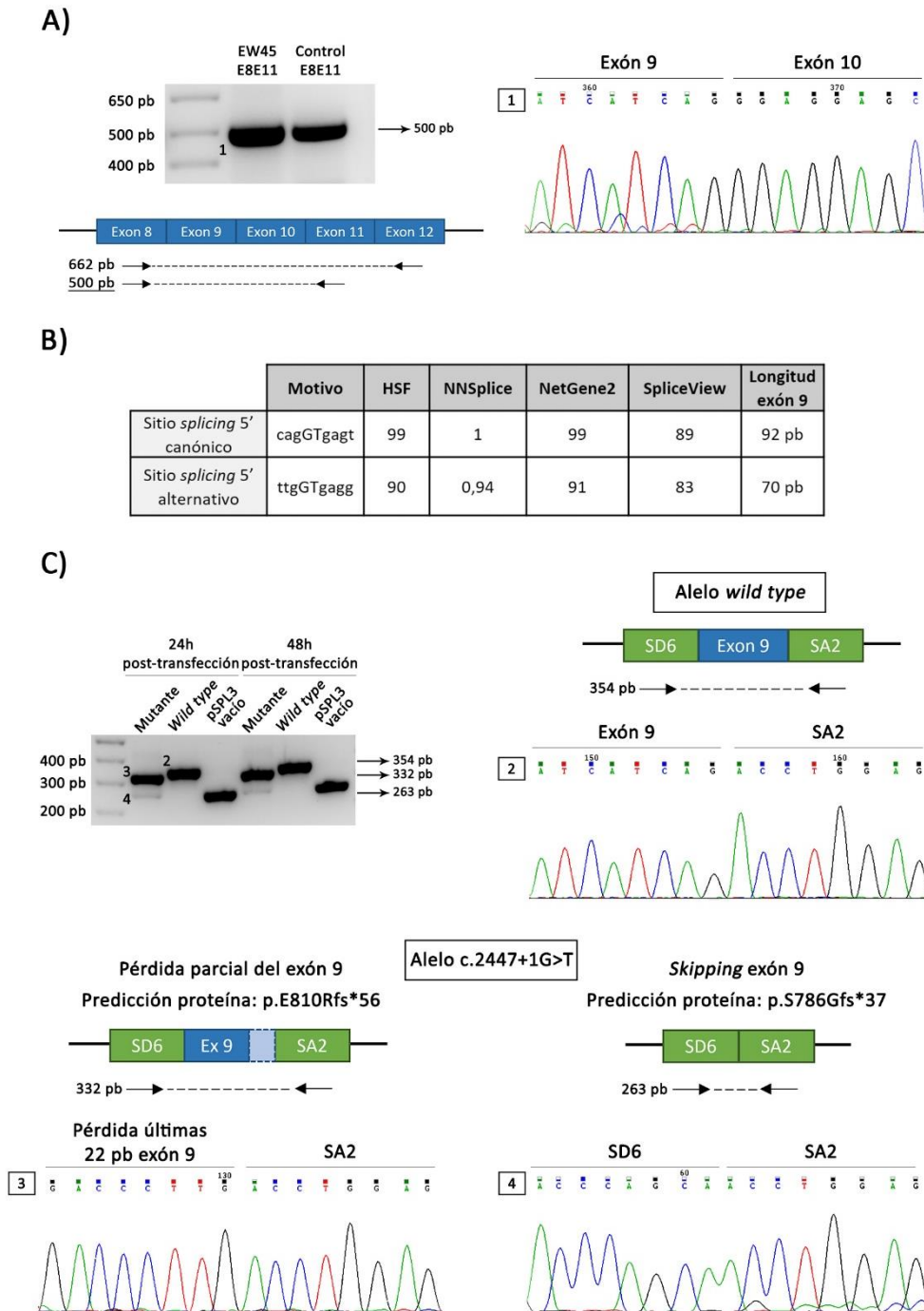
En tres casos, el resultado del análisis del mRNA mostró una pérdida de todo el exón: c.1708-1G>A produciría la pérdida del exón 5 (banda de 310 pb), y los cambios c.4022G>T y c.4124+5G>A del exón 20 (banda de 589 pb) (Figura R1.12A, B y C). El análisis de c.4125-1G>A reveló una delección de las últimas 11 pb del exón 20 y las primeras 175 pb del exón 21 (Figura R1.12C).

Sin embargo, para el cambio c.2447+1G>T, no se pudieron detectar alteraciones en mRNA (Figura R1.13A). Los cuatro programas de predicción utilizados reconocen el sitio de *splicing* original en ausencia del cambio, que daría lugar a un exón de 90 pb, pero en presencia del cambio, reconocen un sitio alternativo que daría lugar a un exón más corto (72 pb) (Figura R1.13B). El ensayo de minigenes corroboró este resultado, al obtenerse una banda de 332 pb (pérdida de las últimas 22 pb exón 9) y otra menor, de 261 pb (pérdida completa del exón 9) (Figura R1.13C).

Sobre la variante c.2865+467A>G en el intrón 12, se investigó la posibilidad de que causara la aparición de un pseudoexón. Sólo el algoritmo de HSF predice la activación de un nuevo sitio de *splicing* 5', así como de sitios de *splicing* 3' y *branch points* cercanos con una puntuación superior a 80 (Figura R1.14A). En el análisis del mRNA no se apreciaron alteraciones, por ello se continuó con el ensayo de minigenes. Se generaron construcciones basadas en el vector reportero pSPL3 con la secuencia de referencia (alelo *wild type*) y el cambio (alelo mutante) que contenían el exón 12 y 671 pb del intrón 12, incluyendo los sitios de *splicing* 3' y *branch points* de la predicción *in silico*. El ensayo de minigenes no mostró diferencias entre la sobreexpresión de ambos alelos, por lo que no se pudo demostrar que esta variante pueda alterar el *splicing* (Figura R1.14B y C).



**Figura R1.12: Análisis de transcritos de variantes de *splicing*.** Representación esquemática del diseño de PCR anidada, con la predicción del efecto de la variante a nivel de mRNA y proteína. **A)** c.1708-1G>A causa la pérdida del exón 5 (310 pb; banda y electroferograma 1), mientras que en el control se obtuvo un producto de 472 pb (banda y electroferograma 2). **B)** c.4022G>T conlleva a la pérdida del exón 20 (589 pb; banda y electroferograma 3). En el control se obtuvo una banda de 692 pb; el electroferograma representa la secuencia de los exones 19, 20 y 21 del alelo *wild type* (banda y electroferograma 4). **C)** c.4125-1G>C produciría la pérdida de 186 pb que afectaría a los exones 20 y 21 (506 pb; banda y electroferograma 5), mientras que c.4124+5G>A causaría la pérdida completa del exón 20 (589 pb; banda y electroferograma 6). Para el estudio de estas dos mutaciones, se utilizó el mismo diseño de PCR anidada que para el cambio c.4022G>T.



**Figura R1.13: Análisis del cambio c.2447+1G>T.** **A)** Productos de la amplificación por PCR a partir de mRNA del paciente EW45 y de un control, se observa una única banda de 500 pb (banda y electroferograma 1) correspondiente al alelo *wild type*. Esquema del diseño de PCR anidada. **B)** Resultado del análisis *in silico*. Los cuatro programas utilizados reconocen con alta puntuación el sitio de *splicing* en la secuencia consenso 5' del intrón 9 así como uno alternativo 22 pb antes. **C)** Productos de la amplificación por PCR de los transcritos generados la sobreexpresión de las construcciones de minigenes, a las 24 y 48 horas post-transfección, en células HeLa. Esquema del procesamiento del mRNA y su electroferograma para el alelo *wild type* (354 pb; banda y electroferograma 2) y para los dos productos obtenidos del alelo mutante (332 pb, banda y electroferograma 3; 263 pb, banda y electroferograma 4), con la predicción del efecto que tendría en el procesamiento del mRNA y de la proteína. SD6 y SA2 son los exones codificados por el vector reportero pSPL3.

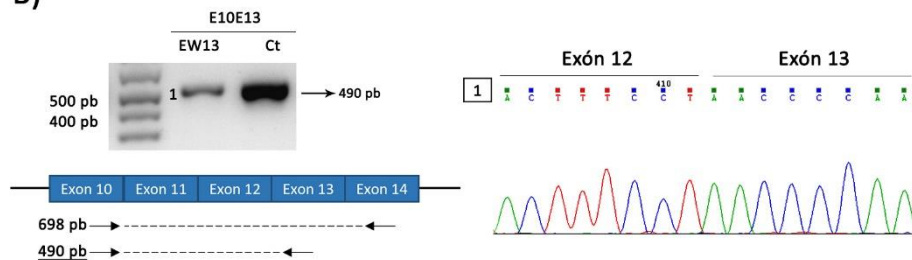
A)

HGVS cDNA	Intrón/ Exón	Predicción sitio <i>splicing</i>	HSF			MaxEnt			Predicción sitios <i>splicing</i> 3'			Predicción <i>branch points</i>				
			WT	Mut	% variación	WT	Mut	% variación	Sitios <i>splicing</i>	HSF	MaxEnt	BP	Punt.	Posición (pb)	Pseudo Exón (pb)	
c.2865+467A>G	Intrón 12	Activación sitio <i>splicing</i> 5' intrónico	56,41	68,57	+21,56	3,11	3,75	+20,58	ttgacctcccagCT	88	No detectado	atctcAa	85,77	-78	41	
									tatatttaccagTA	82,56				-58	61	
									gtcctttttgagGT	82,31			tgctcAg	91,17	-43	169
									tttctattaaagAT	81,9			ctcttAt	80,91	-60	270
									ctccttctgcagGT	95,2					-47	283
									tcttattgacagCA	85,37			tactgAc	86,67	-78	329

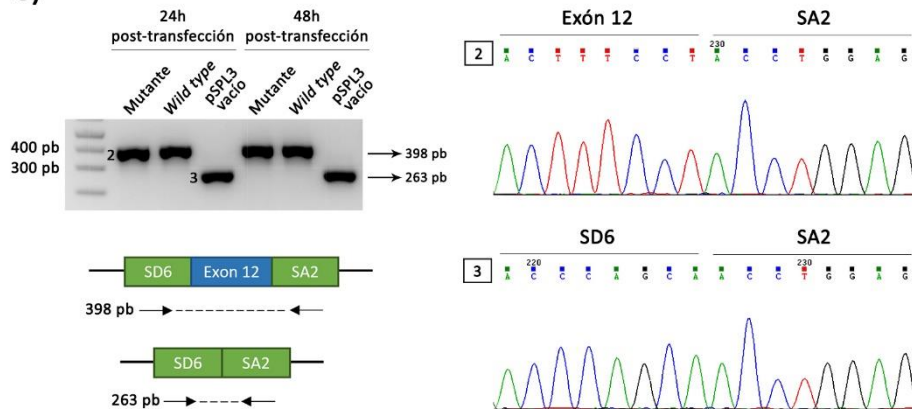
  

HGVS cDNA	Intrón/ Exón	HGVS Proteína	dbSNP	gnomAD v2.2.1	Polyphen-2	SIFT	PROVEAN
c.482T>C	Exon 2	p.I161T	rs531199827	19/249424	0,99 (Probablemente patológico)	0,011 (Patológico)	-4,21 (Deletéreo)

B)



C)



**Figura R1.14: Análisis de c.2865+467A>G.** **A)** Resultado del análisis *in silico*. Según el algoritmo de HSF, en presencia del cambio se activaría un nuevo sitio de *splicing* 5' que podría dar lugar a un pseudoexón. **B)** Productos de la amplificación por PCR a partir del mRNA del paciente EW13 y de un control. En ambos casos, sólo se observa una banda correspondiente al alelo *wild type* (490 pb, banda y electroferograma 1). **C)** Productos de la amplificación por PCR de los transcritos generados tras la sobreexpresión de las construcciones de minigenes, a las 24 y 48 horas post-transfección, en células HeLa. Esquema del procesamiento del mRNA, en ambos casos sólo se observa el procesamiento del mRNA correspondiente al alelo *wild type* (398 pb, banda y electroferograma 2). SD6 y SA2 son los exones codificados por el vector reportero pSPL3.

## 2.2 Análisis de expresión de variantes en la región promotora

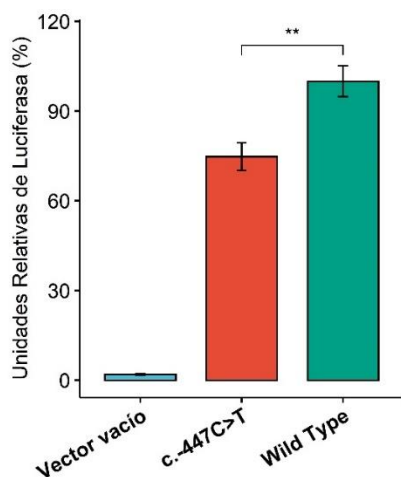
En primer lugar se analizó la unión de factores de transcripción (TF) a la secuencia del promotor de *ATP7B* con el programa Match incluido en la base de datos TRANSFAC (versión 2020.1) (Tabla R1.4). El algoritmo de predicción de este programa se basa en el alineamiento de secuencias cortas frente a matrices de secuencias consenso de motivos de unión de factores de transcripción (TF) conocidos.

Sobre el fragmento de secuencia del promotor de *ATP7B* en donde se localiza la variante c.-447C>T, el programa Match reconoce el sitio de unión de cuatro TFs con una puntuación superior a 0,9 sobre 1. Destaca la predicción de la unión de MTF-1 (*metal regulatory transcription factor 1*); el cambio no se localiza directamente sobre el núcleo (*core*) del motivo de unión de este TF, pero sí en la secuencia consenso, lo que resulta en una ligera disminución de la puntuación del alineamiento frente a la matriz. Para los otros tres TFs (HES-1, ING4 y CP2), el programa no reconoce el sitio de unión en presencia de la variante.

Tabla R1.4: Predicción *in silico* de *ATP7B* c.-447C>T con la herramienta Match (TRANSFAC)

TF	Activador/ Represor	Secuencia	Wild type		Mutante	
			Core score	Matrix score	Core score	Matrix score
MTF-1	Activador	cggaGCGC <b>A</b> c/t	0,98	0,96	0,98	0,95
HES-1	Represor	cgCAC/ <b>T</b> Cgcg	0,96	0,93	No reconoce la unión del TF	
ING4	Represor	gCAC/ <b>T</b> CA	1,00	0,86		
CP2	Activador	ca <b>C</b> / <b>T</b> CAGCgcg	1,00	0,91		

Posteriormente, se determinó *in vitro* si c.-447C>T podría afectar a la actividad del promotor de *ATP7B* mediante ensayo de luciferasa. Para ello, se obtuvieron construcciones a partir del vector reportero pGL4.24, para expresar el gen de la luciferasa bajo el control de la región promotora de *ATP7B* en presencia o ausencia de la variante, que se transfectaron en células HEK293T. Como se muestra en la Figura R1.15, en presencia de c.-447C>T la actividad del promotor estaba disminuida en un 25 %.

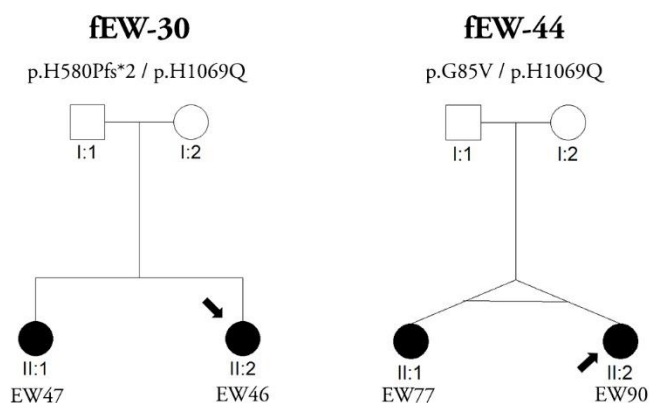


**Figura R1.15: Análisis *in vitro* de la variante c.-447C>T.** La actividad del promotor se representa en unidades relativas de luciferasa. Los histogramas representan la media  $\pm$  desviación estándar de la actividad de tres réplicas del ensayo, asumiendo el 100% de la actividad para el alelo *wild type* (\*\*P valor <0,01).

### 3. Análisis de modificadores genéticos

Se seleccionaron para secuenciación de exoma las familias fEW-30 y fEW-44, con dos hermanos afectados cada una de ellas, que pertenecen a la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d’Elx y en las cuales se logró un diagnóstico concluyente de EW (Figura R1.17).

En el seguimiento clínico de ambas familias, entre los hermanos se registró una clínica dispar en cuanto a gravedad y debut de las manifestaciones clínicas. Por una parte, en fEW-30, la hermana menor (EW46) debutó con un cuadro clínico neurológico alrededor de los veinte años que se agravó con el inicio del tratamiento, momento en el cual la hermana mayor (EW47) asintomática fue diagnosticada mediante cribado familiar. Por otra parte, en fEW-44, se trata de gemelas con un fenotipo mixto que presentaron los primeros síntomas a distintas edades: EW90 debutó durante la adolescencia con predominio de signos neurológicos, mientras que EW77 comenzó en segunda década con afectación hepática (Tabla 1 del Anexo I). Coincide que en las dos familias se detectó en heterocigosis compuesta la mutación ATP7B p.H1069Q. (Figura R1.16).



**Figura R1.16: Familias con mutaciones patológicas en ATP7B estudiadas mediante secuenciación de exoma para el análisis de modificadores genéticos.**

### 3.1 Cribado mutacional en genes implicados en el metabolismo del cobre

En la primera estrategia de análisis, se filtraron las variantes obtenidas en las cuatro muestras de DNA enviadas a secuenciación de exoma a partir de un listado de 64 genes implicados en el metabolismo del cobre y que pudieran estar relacionados con la función de *ATP7B* (Anexo IV). Este análisis reveló que las hermanas de la familia fEW-44 eran gemelas monocigóticas. Se detectaron 663 variantes, de las cuales el 40 % eran comunes a las cuatro muestras y en torno al 20 % eran compartidas entre cada pareja de hermanas. Además, en la familia fEW-30, en cada paciente se identificaron entre un 5-5,6% de variantes no compartidas con el resto de muestras (Figura R1.17).



**Figura R1.17: Distribución de variantes identificadas en 65 genes relacionados en el metabolismo del cobre.** Probandos EW46 y EW47 de la familia fEW-30, y EW77 y EW90 de la familia fEW-44. En éste último caso, los cambios resultaron idénticos.

Del total de variantes filtradas se priorizaron aquellas que podrían modular el resultado clínico de mutaciones en *ATP7B*, ya fuera por la función del gen o por su predicción *in silico* de patogenicidad. Se seleccionaron una mutación de cambio de aminoácido en *MYO5B*, detectada en heterocigosis en EW46, y otras dos en los genes *CCDC93* y *COMMD1*, detectadas únicamente en las probandos de fEW-44 (Tabla R1.5). Para estas tres variantes, al menos dos de los tres predictores de patogenicidad consultados indicaron que podrían ser deletéreas. Adicionalmente, se eligió una variante en la región 5'-UTR de *ATOX1*, detectada tanto en EW46 como en las hermanas de la fEW-44, que podría alterar la unión de los TFs HES-1 y MTF-1 (Tabla R1.5).



Tabla R1.5: Variantes candidatas en genes del metabolismo del cobre relacionados con *ATP7B*.

Gen	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Frecuencia gnomAD (rs)	SIFT	PROVEAN	Polyphen-2	Genotipo		
							EW46	EW47	fEW-44
<i>MYO5B</i>	c.2753C>T	p.R918H	41937/280030 (rs2298624)	0,005	-2,16	0,80	0/1	0/0	0/0
<i>COMMD1</i>	c.358C>T	p.R120W	4769/282534 (rs55677935)	0,027	-4,70	1	0/0	0/0	0/1
<i>CCDC93</i>	c.637G>A	p.R213C	3136/282762 (rs34095554)	0,001	-3,61	0,99	0/0	0/0	0/1

Gen	HGVS cDNA	Frecuencia gnomAD (rs)	Predicción unión TFs con Match		Genotipo		
			Wild type	Mutante	EW46	EW47	fEW-44
<i>ATOX1</i>	c.-99T>C	14378/31164 (rs1549921)	HES-1, MTF-1 (x2)	MTF-1	0/1	0/0	0/1

rs: identificador dbSNP; Polyphen-2: 1 (probablemente patológica), 0 (benigna); SIFT: 0 (deletérea), >0,02 (tolerada); PROVEAN: <-2,5 (deletérea). Predicción unión TFs con Match (TRANSFAC 2020.1): *core score* y *matrix score* >0,90

### 3.1.1 Correlación genotipo-fenotipo

El cribado de las variantes candidatas en 12 pacientes seleccionados de la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx se llevó a cabo en base a estos criterios (Tabla R1.6):

- Presentan el mismo tipo de mutación en *ATP7B* que los pacientes estudiados mediante secuenciación de exoma. Es decir, son portadores de alguna mutación cuyo efecto conduce a una retención de la proteína en el retículo endoplásmico o que afecta a la estabilidad de la proteína.
- Durante el transcurso de la enfermedad se observa alguna singularidad, principalmente signos neurológicos.
- Hermanos asintomáticos con mutaciones bialélicas en *ATP7B* identificados gracias al cribado familiar.

Tabla R1.6: Resultado del cribado mutacional en 12 pacientes seleccionados y su descripción clínica.

Muestra	Familia	ATP7B (G)	MYO5B (G)	CCDC93 (G)	COMMD1 (G)	ATOX1 (G)	S/EI/ED	Fenotipo	Signos clínicos	Progresión	L1	L2	
EW20	fEW-14	p.M645R / p.T977M (0/1)	p.R918H (0/1)	Negativo	Negativo	Negativo	M/7/7	Hepático	Hipertransaminasemia	En remisión	8	4	
EW21		p.M645R / p.T977M (0/1)	p.R918H (0/1)	Negativo	Negativo	Negativo	H/7/7	Hepático	Hipertransaminasemia	No remisión bioquímica	7	3	
EW24	fEW-15	c.4022G>T / Del Exón 1 (0/1)	p.A864T (0/1)	Negativo	p.D164= (0/1)	c.-99T>C (1/1)	M/22/23	Hepático	Hipertransaminasemia	En remisión	7	3	
EW28	fEW-19	p.Q111* / p.R778G (0/1)	Negativo	Negativo	c.462+63C>G (0/1)	c.-99T>C (0/1)	H/7/7	Hepático	Hipertransaminasemia	En remisión	7	3	
EW58	fEW-36	p.I1311T / p.E1086Rfs*32+p.L1120* (0/1)	p.R918H (0/1)	Negativo	c.462+63C>G (0/1)	Negativo	H/33/33	Neurológico	Temblor, distonía, disartria	No remisión neurológica	12	8	
EW65	fEW-38	p.M645R / p.R778W (0/1)	Negativo	Negativo	c.462+63C>G (0/1)	c.-99T>C (0/1)	H/45/48	Hepático	Hipertransaminasemia	En remisión	8	4	
EW66	fEW-39	p.R778G / p.N1324S (0/1)	Negativo	Negativo	c.462+63C>G (0/1)	Negativo	M/15/15	Cribado familiar	Asintomático	Asintomático	7	3	
EW67			Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	H/7/7	Cribado familiar	Asintomático	Asintomático	7	3	
EW68			p.R918H (0/1)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	M/9/9	Cribado familiar	Asintomático	Asintomático	7	3
EW69			p.R918H (0/1)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	M/5/5	Hepático	Hipertransaminasemia leve	No remisión bioquímica	7	3
EW178	fEW-65	c.4022G>T (1/1)	Negativo	Negativo	Negativo	c.-99T>C (0/1)	H/13/14	Neurológico	Temblor, distonía, disartria	En remisión	11	7	
EW190	fEW-72	p.T935M / p.L1088* (0/1)	p.R918H (0/1)	Negativo	c.462+63C>G (0/1)	Negativo	H/39/40	Neurológico	Distonía, disfagia, disartria	En remisión	10	6	

Abreviaturas: G: genotipo, S: sexo, EI: edad inicio, ED: edad diagnóstico, L1: Puntuación Leipzig con genética concluyente, L2: Puntuación Leipzig sin diagnóstico genético.

Como se recoge en la Tabla R1.6, en seis casos se identificó c.2753C>T (p.R918H) en *MYO5B*, y en un solo caso c.2590G>A (p.A864T), en el mismo exón. Cuatro de ellos debutaron con afectación hepática en edad infantil; dos con síntomas neurológicos en edad adulta, y el restante se halló mediante cribado familiar. La variante *ATOX1* c.-99T>C se identificó en cuatro casos, en uno de ellos en homocigosis, con predominio de la enfermedad hepática excepto por un caso de debut neurológico en la adolescencia. Por último, el cribado de la mutación c.358C>T (p.R120W) en *COMMD1* resultó negativo.

En concreto para *COMMD1* y *ATOX1*, dado que son genes ampliamente estudiados como posibles modificadores en EW, se estudiaron el resto de regiones codificantes del gen. En cuanto a *COMMD1*, en un caso con sintomatología hepática se detectó el cambio c.492T>C (p.D164=), y en cinco casos el cambio c.462+63C>G, todos ellos en heterocigosis y con disparidad de síntomas. Respecto a *ATOX1*, el análisis mutacional no reveló ninguna otra variante. En la Tabla R1.7 se recoge la anotación, frecuencias poblacionales y predicciones *in silico* de patogenicidad de estas otras variantes identificadas en el cribado.

**Tabla R1.7: Otras variantes detectadas en la ampliación del cribado mutacional en genes implicados en el metabolismo del cobre relacionados con *ATP7B*.**

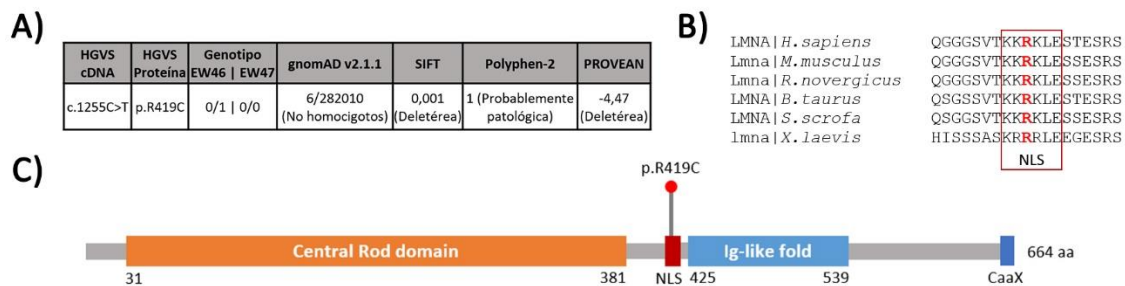
Gen	HGVS cDNA	HGVS Proteína	dbSNP (rs)	Frecuencia gnomAD	SIFT	PROVEAN	Polyphen-2
<i>MYO5B</i>	c.2590G>A	p.A864T	rs372432070	50/269892	0,001	-3,54	0,96
Gen	HGVS cDNA	HGVS Proteína	dbSNP (rs)	Frecuencia gnomAD	Human Splicing Finder (HSF)		
<i>COMMD1</i>	c.492T>C	p.D164=	rs9096	24589/282764	Alteración de elementos activadores (ESE) y silenciadores (ESS) de <i>splicing</i>		
	c.462+63C>G	-	rs55785307	6003/31376	Sin cambios		

Polyphen-2: 1 (probablemente patológica), 0 (benigna); SIFT: 0 (deletérea), >0,02 (tolerada); PROVEAN: <-2,5 (deletérea); ESE (*exonic splicing enhancer*); ESS (*exonic splicing silencer*)

### 3.2 Cribado mutacional en otros genes asociados a patología

En esta segunda estrategia de análisis, el objetivo era investigar la posibilidad de que alguna de las cuatro pacientes estudiadas mediante secuenciación de exoma fuera portadora de algún otro cambio que pudiera ser patológico, estuviera interfiriendo en el fenotipo EW y ello agravara el cuadro clínico. Para ello, se escogieron variantes con una MAF <1 % en gnomAD, que pudieran tener un efecto deletéreo y que se encontraban en genes relacionados con enfermedad.

En la probando EW46 (fEW-30) se identificó la variante *LMNA* c.1255C>T (p.R419C) en heterocigosis, cambio no detectado en su hermana afecta. Mutaciones en *LMNA* son causantes de laminopatías, término que engloba fenotipos clínicos originados por deficiencias en las proteínas del filamento intermedio que constituyen la lámina nuclear. Los predictores *in silico* de patogenicidad estiman que p.R419C podría tener un efecto deletéreo (Figura R1.18A). La variante se sitúa en la secuencia de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*) de la proteína lamina A/C, en una posición altamente conservada evolutivamente (Figura R1.18B y C).

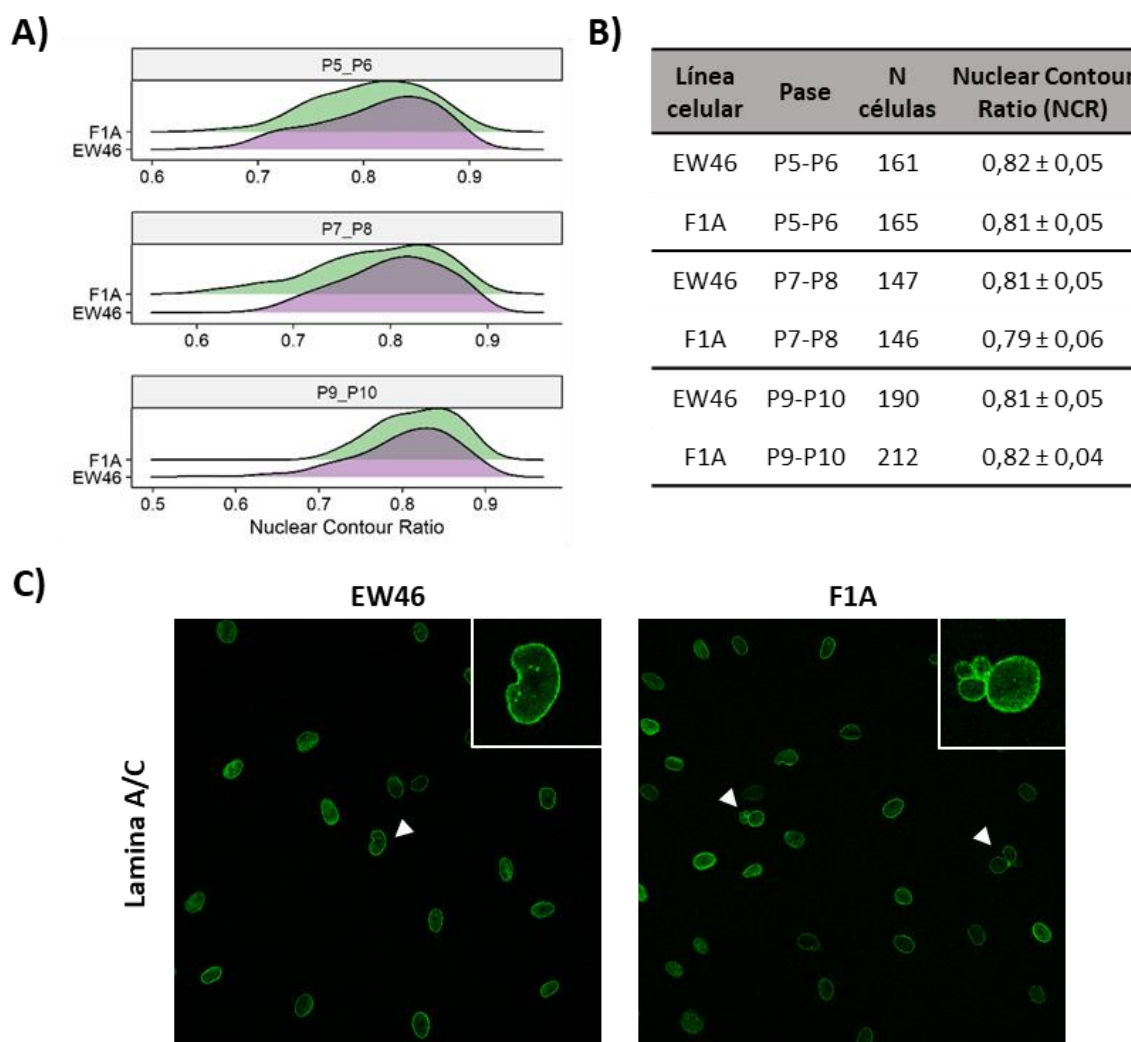


**Figura R1.18: Análisis de la variante p.R419C identificada en LMNA. A)** Detalle de la variante detectada en secuenciación de exoma en muestra de las pacientes de la familia fEW-30. Predicciones *in silico* de patogenicidad. **B)** El residuo R419 se encuentra en el motivo NLS (*Nuclear Localization Signal*) y está conservado evolutivamente. **C)** Esquema de los dominios de la proteína lamina A/C.

### 3.2.1 Caracterización funcional de LMNA p.R419C en fibroblastos

#### *Análisis de la morfología nuclear*

Una de las características principales de las laminopatías es la presencia de estructuras nucleares anormales. Por ello se comparó, mediante ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo específico para la detección de lamina A/C, la morfología nuclear observada en los cultivos de fibroblastos de EW46 (portadora heterocigota de LMNA p.R419C) con fibroblastos control (F1A). Esta evaluación se basó en el estudio de la circularidad o contorno del núcleo (NCR, *Nuclear Contour Ratio*), para analizar la desviación con respecto a un círculo perfecto (valor de 1). Los valores medios de NCR para ambas líneas se situaron en torno a 0,80, lo esperable para líneas adherentes con crecimiento en monocapa. Este valor permaneció constante tras varios pases, sin detectarse diferencias destacables entre las muestras EW46 y F1A (Figura R1.19A y B). Ocasionalmente se observaron núcleos anómalos, en forma de “burbuja” o “judía” por igual en ambas líneas (Figura R1.19C).

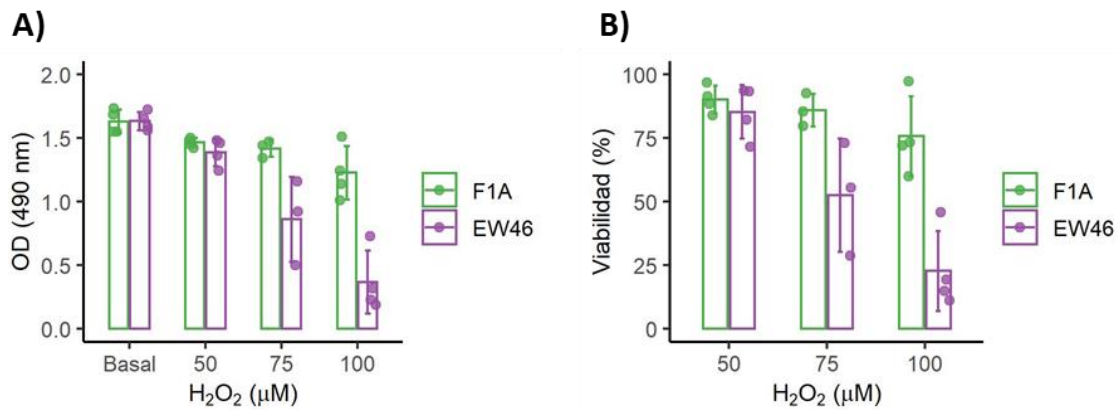


**Figura R1.19: Análisis de la morfología nuclear en fibroblastos portadores de LMNA p.R419C**  
**A) y B)** Distribución de valores de circularidad o contorno nuclear (NCR, *Nuclear Contour Ratio*) medidos en tres pases diferentes para la línea de fibroblastos EW46, portadora de LMNA p.R419C, y la línea de fibroblastos control F1A. En la tabla se recoge el valor promedio  $\pm$  desviación estándar y el número total de células analizadas para cada línea y pase **C)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia utilizando anti-lamina A/C que muestran la morfología nuclear observada en ambas líneas de fibroblastos. Se indica con flechas y mayor detalle algunos núcleos irregulares, con forma de “judía” (EW46, izquierda) o “burbujas” (F1A, derecha).

### **Efecto de $H_2O_2$ en la viabilidad celular**

La susceptibilidad a estrés oxidativo se ha asociado a diversas mutaciones causantes de laminopatías. Con el fin de estudiar la capacidad de los fibroblastos LMNA p.R419C de responder a estrés oxidativo causado por agentes externos, éstos y fibroblastos control F1A se trataron con tres concentraciones (50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) durante dos horas. La viabilidad celular se estima como ratio entre la absorbancia a 490 nm ( $OD_{490}$ ) (Figura R1.20A) para cada tratamiento con  $H_2O_2$  y la  $OD_{490}$  basal. En fibroblastos control F1A, el porcentaje de viabilidad fue similar y superior al 75 % tanto a

50 y 75  $\mu\text{M}$ , disminuyendo hasta dicho valor a 100  $\mu\text{M}$  (Figura R1.20B). En cambio, en fibroblastos EW46, aunque la viabilidad era comparable a la observada en F1A a 50  $\mu\text{M}$ , se redujo al 50 % con el tratamiento a 75  $\mu\text{M}$ , quedando por debajo del 25 % a 100  $\mu\text{M}$  (Figura R1.20B).



**Figura R1.20: Evaluación del efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la viabilidad celular de fibroblastos portadores de LMNA p.R419C. A)** Absorbancia (OD) medida a 490 nm en el ensayo de MTS en estado basal y tras el tratamiento con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante dos horas en fibroblastos control, F1A, y portadores de LMNA p.R419C, EW46. **B)** Viabilidad celular en fibroblastos F1A y EW46 para los tres tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicados. Viabilidad calculada como ratio entre OD<sub>490</sub>, tratamiento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OD<sub>490</sub> basal para cada línea celular, expresado en porcentaje. En ambas gráficas, se representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de los datos correspondientes a tres réplicas para el tratamiento a 75  $\mu\text{M}$  y a cuatro réplicas para el resto de condiciones del experimento.

### Respiración y producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial

Una de las fuentes principales de especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive Oxygen Species*) en la célula son los distintos procesos metabólicos relacionados con la producción de ATP que tienen lugar en la mitocondria. La cadena respiratoria (también denominada cadena de transporte de electrones) es la principal fuente de ROS mitocondrial a través de los complejos I y III, y su disfunción contribuye a la acumulación de radicales superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y con ello al aumento de estrés oxidativo (Cedikova *et al.*, 2016). Para investigar si el cambio LMNA p.R419C podría contribuir a una deficiencia de la capacidad respiratoria mitocondrial, se analizó el perfil de consumo de oxígeno (OCR; *Oxygen Consumption Rate*) y de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante respirometría de alta resolución en un equipo Oxygraph-2k (O2k, OROBOROS Instruments) en fibroblastos EW46.

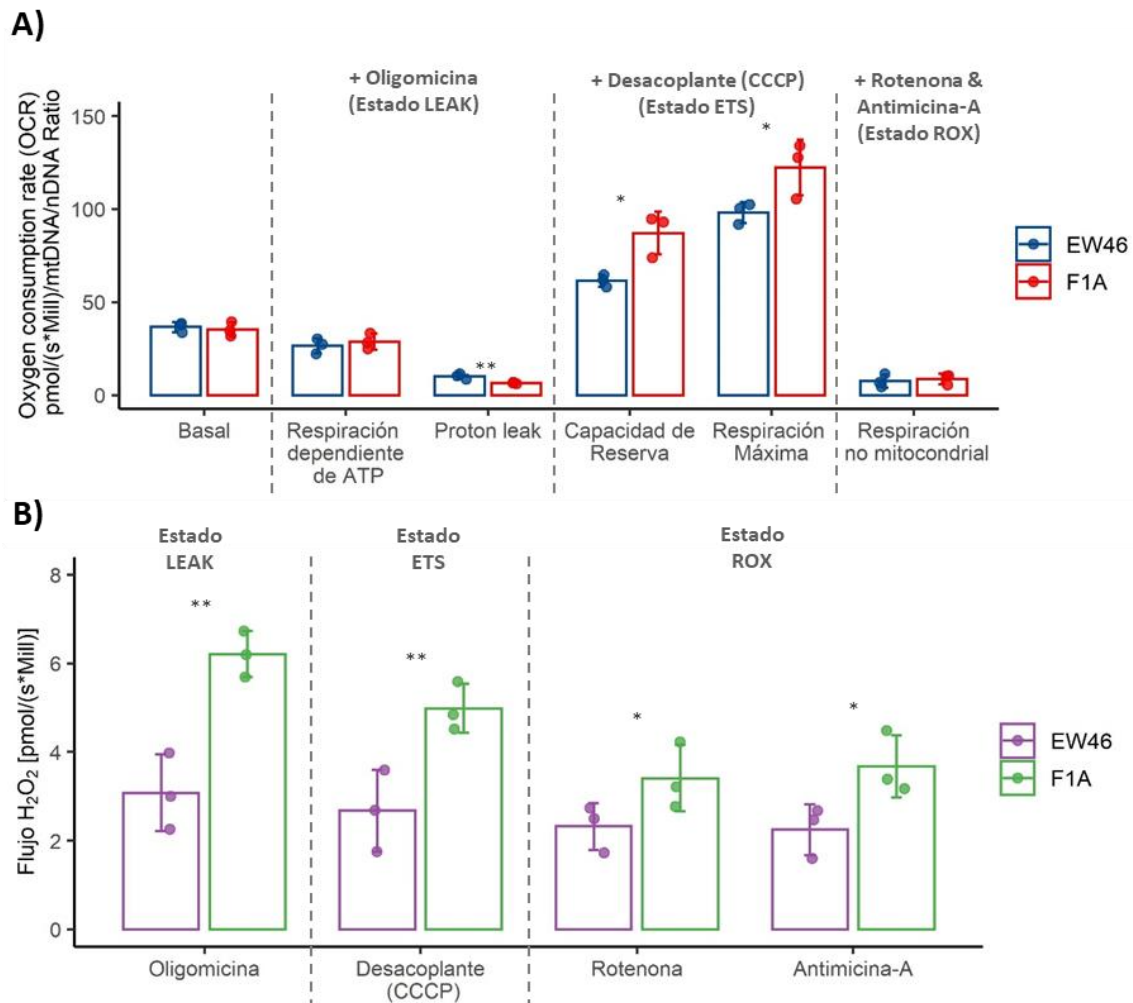
En la determinación del OCR en célula intacta (Figura R1.21A), se añadieron secuencialmente inhibidores de los complejos OXPHOS, lo que permitió obtener cinco parámetros clave de respiración mitocondrial (respiración basal, respiración dependiente de la producción de ATP, *proton leak*, respiración máxima y capacidad de reserva). En condiciones basales no se detectaron diferencias en el consumo de O<sub>2</sub> entre ambas líneas

celulares. A continuación, se indujo el estado LEAK de respiración mediante la inhibición del complejo V/ATP sintasa con oligomicina, de forma que la respiración en este estado se debe a mecanismos alternativos de entrada de protones a través de la membrana mitocondrial interna (*proton leak*). En dicho estado, en fibroblastos EW46 se registró un mayor consumo de O<sub>2</sub> que en fibroblastos F1A. Seguidamente, se analizaron los parámetros de respiración máxima y capacidad de reserva. La respiración máxima es una medida de la capacidad máxima de la cadena respiratoria para generar ATP. Para ello, se induce el estado ETS (*Electron Transfer System*), en el cual se desacopla el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) mediante la adición de incrementos del agente desacoplante CCCP hasta alcanzar la respiración máxima. Los desacoplantes favorecen la eliminación del control respiratorio por parte del sistema OXPHOS, colapsando el gradiente de protones a través de la membrana, y para tratar de reestablecerlo, la cadena respiratoria intenta rendir al máximo. Por su parte, la capacidad de reserva es la diferencia entre respiración máxima y basal, y está relacionada con la capacidad de la célula para responder a situaciones de alta demanda energética (Rose *et al.*, 2014). En el estado ETS, se determinó que tanto la capacidad de reserva como la respiración máxima en fibroblastos EW46 se encontraban disminuidas significativamente. Esto es consecuencia de que, en ausencia de CCCP, los fibroblastos EW46 ya estarían haciendo uso del mecanismo de *proton leak* para el consumo de O<sub>2</sub>, por lo que en ese momento la mitocondria estaría más cerca de su capacidad máxima en comparación con fibroblastos F1A. Por último, con la adición de rotenona y antimicina-A, inhibidores de los complejos I y III respectivamente, se bloquea completamente el flujo de electrones de la cadena respiratoria para alcanzar el estado ROX. En él, se registra el consumo de O<sub>2</sub> residual proveniente de reacciones oxidativas al margen de la cadena respiratoria, como por ejemplo aquellas catalizadas por NADPH y xantina oxidasas. Como se observa en la Figura R1.21A, en estado ROX el consumo de O<sub>2</sub> tanto en fibroblastos EW46 como F1A se reduce drásticamente, lo que indica que la contribución de otras fuentes de consumo de O<sub>2</sub> distintas a la cadena respiratoria durante el experimento fue baja.

Con la misma secuencia de inhibidores, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue significativamente inferior en fibroblastos EW46 en comparación con F1A en todos los estados de respiración analizados (Figura R1.21B). En este experimento, se espera que la mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenga lugar en el estado LEAK, al bloquear el complejo V/ATP sintasa con oligomicina, lo que hace aumentar el gradiente de protones favoreciendo la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, y que a continuación disminuya en el estado ETS con la adición de incrementos del desacoplante CCCP, debido a que la activación de mecanismos alternativos de entrada de protones contribuye a rebajar el gradiente y en consecuencia la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> es menor. Esta



diferencia en la producción de  $H_2O_2$  entre ambos estados es más evidente en fibroblastos F1A, mientras que en fibroblastos EW46 apenas se aprecia.



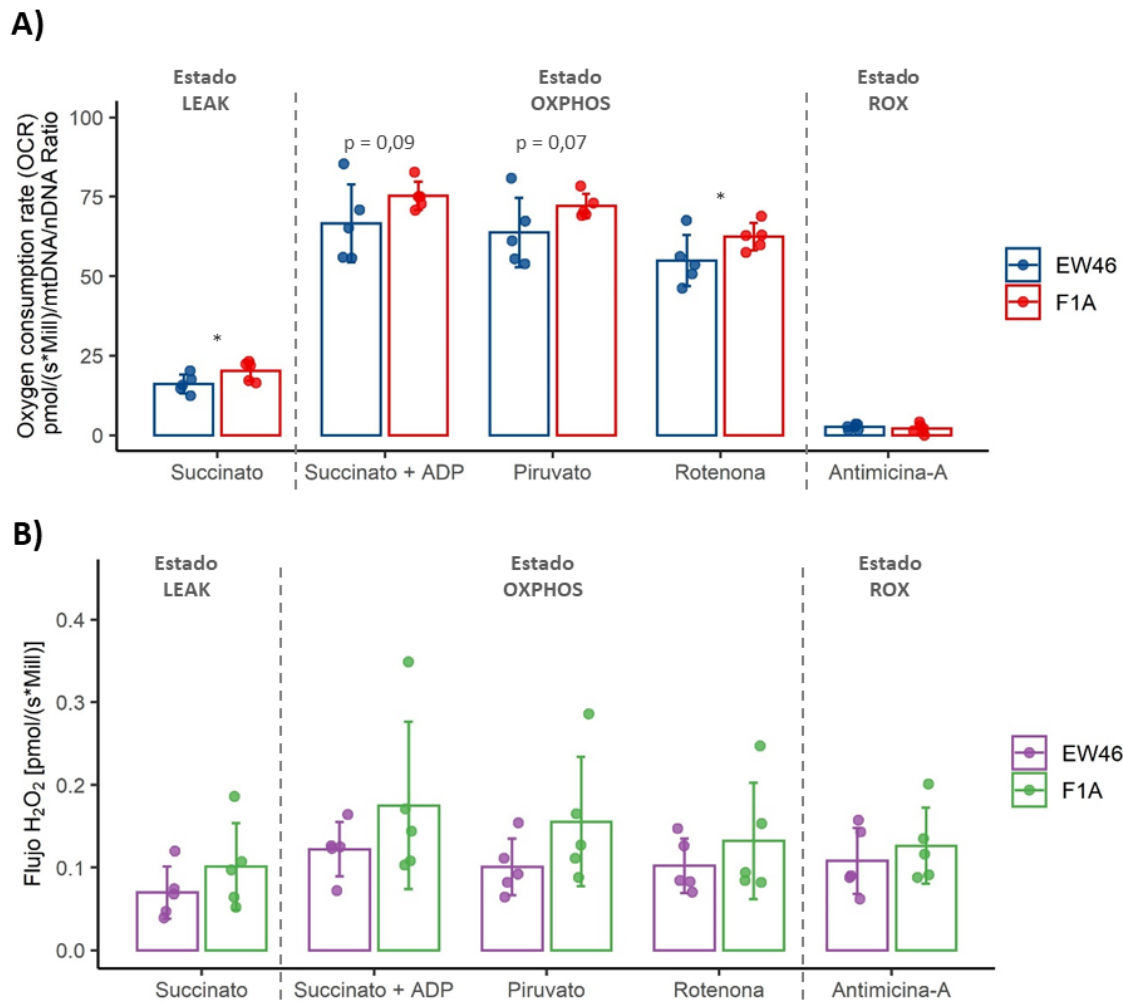
**Figura R1.21: Análisis del perfil de consumo de  $O_2$  (OCR) y producción de  $H_2O_2$  de fibroblastos LMNA p.R419C en célula intacta.** **A)** Medición de OCR en condiciones basales y en diferentes estados de respiración mitocondrial alcanzados tras la adición secuencial de inhibidores de los complejos OXPHOS. Se representa OCR basal (diferencia entre OCRs antes de añadir oligomicina y en estado ROX), OCR dependiente de ATP (diferencia entre OCRs basal y después de añadir oligomicina), proton leak (diferencia entre OCRs después de añadir oligomicina y en estado ROX), capacidad de reserva (diferencia entre OCR tras adición óptima de CCCP y OCR basal), respiración máxima (diferencia entre OCR tras adición óptima de CCCP y OCR en estado ROX) y OCR no mitocondrial, registrada en el estado ROX. **B)** Medición de  $H_2O_2$  generado en los diferentes estados de respiración mitocondrial alcanzados tras la adición secuencial de inhibidores de los complejos OXPHOS (valores normalizados por la fluorescencia previa a la inyección de las células). Inhibidores utilizados: oligomicina (inhibidor del complejo V/ATP sintasa, estado LEAK de respiración mitocondrial debida a entrada de protones alternativa), CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona; desacoplante de la membrana mitocondrial interna que activa la cadena de transporte de electrones hasta alcanzar respiración máxima, estado ETS), rotenona y antimicina A (inhibidores de los complejos I y III, respectivamente, estado ROX de consumo de oxígeno residual tras inhibir la cadena de transporte de electrones). En ambas gráficas se representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de los datos correspondientes a tres réplicas del experimento, para fibroblastos control (F1A) y portadores de LMNA p.R419C (EW46) (\*\*P valor  $\leq 0,01$ ; \*P valor  $\leq 0,05$ ).



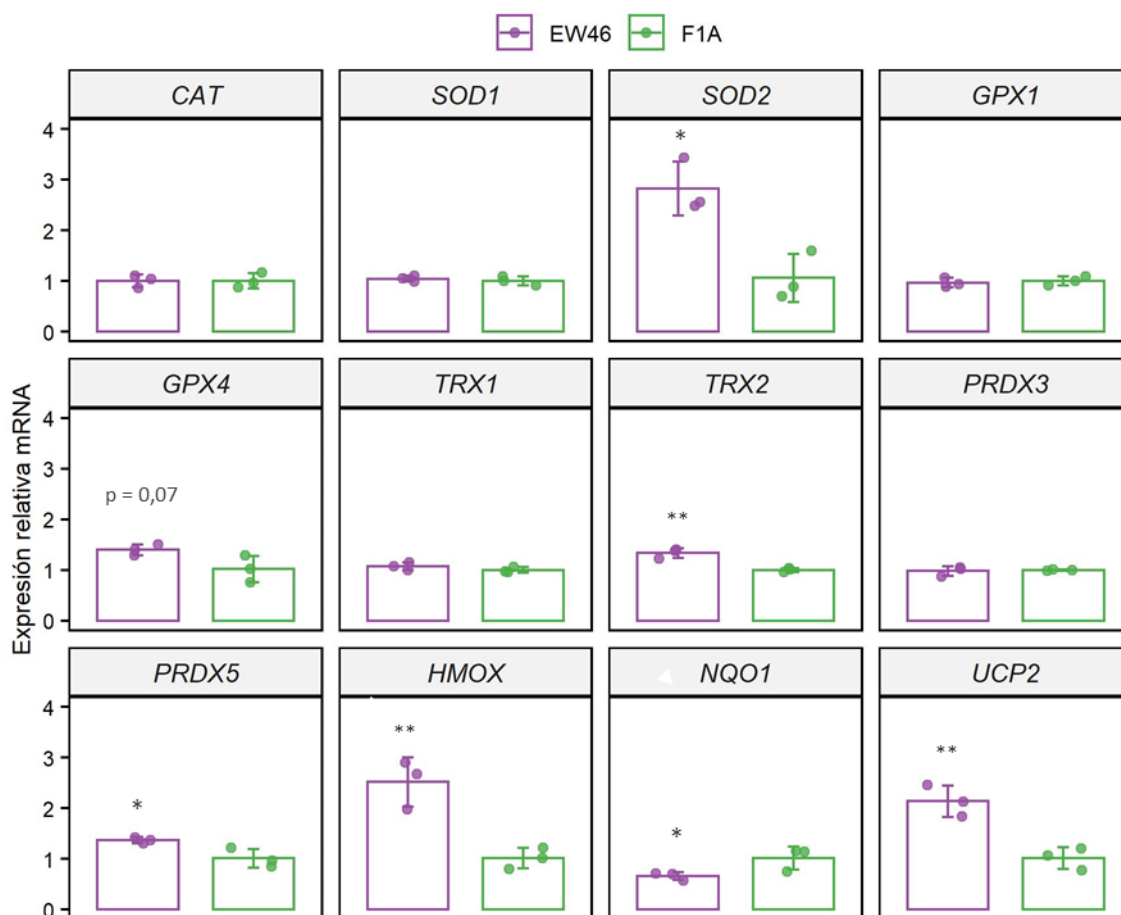
En célula permeabilizada se estudió simultáneamente el perfil de OCR (Figura R1.22A) y la producción de  $H_2O_2$  (Figura R1.22B). La permeabilización diluye el contenido celular, por lo que los estados respiratorios explorados van a depender de la combinación de sustratos adicionados. Concretamente, en este experimento se estudió el estado LEAK y el estado de activación del sistema OXPHOS, en presencia de sustratos del complejo I y/o II. En fibroblastos EW46, se apreció una tendencia de menor consumo de  $O_2$  así como de producción de  $H_2O_2$ , tanto en el estado LEAK en presencia de succinato, como en el estado OXPHOS al adicionar ADP, junto con el succinato, el piruvato y la rotenona. Esto podría reflejar que la combinación de sustratos utilizada no es óptima para los fibroblastos EW46 en comparación con fibroblastos F1A para inducir ambos estados. Al igual que en el experimento en célula intacta (Figura R1.21A y B), en éste también se indujo el estado ROX con la adición de antimicina-A, que actúa junto a la rotenona ya presente para bloquear el flujo de electrones de la cadena respiratoria inhibiendo los complejos III y I, respectivamente. De esta forma, se comprobó la no contribución al experimento de otras fuentes de consumo de  $O_2$  distintas a la cadena respiratoria.

#### ***Análisis de la expresión de genes con función antioxidante***

Para verificar el estado de la respuesta antioxidante en fibroblastos EW46 y F1A, se analizaron en condiciones basales los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa (qPCR) de una serie de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo. Como se recoge en la Figura R1.23, se aprecia mayor expresión en fibroblastos EW46 con respecto a fibroblastos F1A de *SOD2*, *TRX2*, *PRDX5* y *GPX4*, genes que codifican para enzimas antioxidantes que actúan en la mitocondria. En concreto *SOD2* (MnSOD) cataliza la transformación de  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , que a su vez es disociado en  $H_2O$  y  $O_2$  por la acción conjunta de *PRDX5* y *TRX2*. Por su parte, *GPX4* ejerce un efecto protector sobre las membranas, reduciendo los peróxidos lipídicos en presencia de glutatión (GSH). Respecto a genes de respuesta a estrés inducido por  $H_2O_2$ , se detectó un aumento de *HMOX* y una disminución de *NQO1*. Destaca la sobreexpresión de *UCP2*, que codifica para una proteína desacoplante que permite la entrada de protones alternativa al complejo V/ATP sintasa en la mitocondria, y cuya expresión también se induce como respuesta a un aumento de ROS en forma de  $O_2^-$  en la mitocondria.



**Figura R1.22: Análisis del perfil de consumo de O<sub>2</sub> (OCR) y producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de fibroblastos LMNA p.R419C en célula permeabilizada. A) Medición de OCR y B) Medición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (valores normalizados por la fluorescencia previa a la inyección de las células) en los diferentes estados de respiración mitocondrial alcanzados, tras permeabilizar con digitonina y seguidamente la adición secuencial de sustratos e inhibidores de los complejos OXPHOS: succinato (sustrato complejo II, promueve estado LEAK de respiración mitocondrial debida a entrada de protones alternativa), ADP (adenosín difosfato; sustrato del complejo II que, junto al succinato, activa estado OXPHOS), piruvato (sustrato del complejo I para mantenimiento estado OXPHOS), rotenona (inhibidor complejo I, contribuye a la regulación de la respiración en estado OXPHOS activada por succinato y ADP) y antimicina-A (inhibidor del complejo III, estado ROX de consumo de oxígeno residual tras inhibir la cadena de transporte de electrones junto con la rotenona). En ambas gráficas se representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de los datos correspondientes a cinco réplicas del experimento para fibroblastos control (F1A) y portadores de LMNA p.R419C (EW46) (\*P valor  $\leq$ 0,05).**



**Figura R1.23: Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo en fibroblastos LMNA p.R419C mediante PCR cuantitativa (qPCR).** Para cada gen, se representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de los niveles relativos de mRNA tras normalizar frente a *GAPDH*, calculados como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los valores representados corresponden a tres réplicas biológicas de fibroblastos control (F1A) y portadores de LMNA p.R419C (EW46) (\*\*P valor  $\leq 0,01$ ; \*P valor  $\leq 0,05$ ).



## Discusión

El diagnóstico temprano de la enfermedad de Wilson (EW) es de crucial importancia, ya que permite que los pacientes reciban lo antes posible el tratamiento adecuado para evitar la progresión de la patología. Por ello, el estudio genético de *ATP7B* es fundamental para el diagnóstico diferencial de la EW, por ser una prueba concluyente no invasiva que además permite la detección de individuos asintomáticos.

### ***Serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx***

En este trabajo se ha llevado a cabo una caracterización clínico-genética de una serie de 25 casos índice (34 pacientes), supervisados en los Servicios de Medicina Digestiva y Neurología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia) y Hospital General Universitari d'Elx (Alicante). Todos los probandos contaban con diagnóstico clínico de EW, de acuerdo con la puntuación obtenida (igual o superior a cuatro puntos) tras su evaluación con la escala de Leipzig (European Association for the Study of the Liver, 2012).

El 72% de los pacientes de esta serie comenzaron con sintomatología hepática, con una media de edad de debut 10 años inferior a la de los pacientes con cuadro clínico neurológico (28%). En otras series de la EW, independientemente de la frecuencia de casos presentados según fenotipo clínico, es habitual observar que la sintomatología hepática se adelanta a la neurológica entre 5 y 10 años (Merle *et al.*, 2007, Litwin *et al.*, 2012a; Beinhardt *et al.*, 2014). De hecho, en estudios de pacientes pediátricos, el porcentaje de casos neurológicos es bajo, y de haberlos, suelen debutar en la adolescencia (Nicastro *et al.*, 2009; Abdel Ghaffar *et al.*, 2011). De la misma forma, no son usuales los casos hepáticos de debut tardío, con diagnóstico a partir de los 30 años; en nuestra serie sólo dos pacientes. En estas formas tardías, en la mayoría de casos sólo se detectan inicialmente alteraciones de la función hepática, por lo que es posible que el diagnóstico de EW no sea obvio para el especialista (Ferenci *et al.*, 2007; Møller *et al.*, 2011).

Como parte de la evaluación clínica, se llevó a cabo un examen neurológico exhaustivo, en el que se detectaron algunos signos en siete de los 18 pacientes hepáticos, principalmente temblor postural y distonía de la mano. Los síntomas neurológicos eran lo suficientemente leves como para que el mismo afectado considerara éstos como parte de su propia normalidad. Estos pacientes contaban con una RMN normal, por lo que se les realizó una RMN de precisión que permitió detectar hipointensidades en las secuencias T2 en regiones de interés de los ganglios basales (datos no mostrados). Para otras enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo PKAN (*PANK2-associated neurodegeneration*) debido a defectos en *PANK2* (MIM: 606157) o en casos de

hipermanganesemia con distonía causada por mutaciones en *SLC30A10* (MIM: 611146), se observan hipointensidades en T2 que se corresponden con depósitos anómalos de hierro o manganeso, respectivamente (Darling *et al.*, 2017). En pacientes con EW, se registran hiperintensidades en secuencia T2 correspondientes a lesiones causadas por la acumulación de cobre que con la terapia quelante revierten (Kim *et al.*, 2006). Sin embargo, diversos estudios coinciden en la presencia de hipointensidades en secuencia T2 que podrían corresponderse con acúmulos tanto de cobre como de hierro y que persisten a pesar del tratamiento (Südmeyer *et al.*, 2006; Skowrońska *et al.*, 2013; Dusek *et al.*, 2018). De hecho, estudios histológicos en cerebros *post-mortem* de pacientes con EW revelaron depósitos de hierro y cobre en globo pálido y putamen (Dusek *et al.*, 2017); adicionalmente, trabajos previos habían descartado acumulación de zinc o manganeso (Litwin *et al.*, 2013). Los acúmulos de hierro podría ser consecuencia de la alteración del metabolismo de este metal debida a la deficiencia de Holo-Cp que caracteriza el cuadro clínico de la EW y que se agravaría con la terapia quelante. El grupo de pacientes estudiado mediante RMN de precisión en esta serie es reducido, por lo que es necesario ampliarlo con el fin de ganar evidencia estadísticamente significativa entre los signos neurológicos apreciados y la presencia de depósitos de metales. De momento, los resultados preliminares señalan que así ocurre.

Se identificaron 25 variantes P/PP, de las cuales 15 se detectaron en un único alelo, lo que demuestra la heterogeneidad alélica de la población estudiada. Tres de los cambios identificados son noveles: p.E1086Rfs\*32, que truncaría el dominio N de unión a ATP (*N-domain*); c.4125-1G>A, que alteraría la secuencia de *splicing* 3' del exón 21; y c.-447C>T, en la región promotora. El cambio p.M645R es el más frecuente, seguido de p.L1120\*; ambas mutaciones destacan en otras series clínicas españolas de EW. El cambio p.M645R se describió por primera vez en población judía askenazí (Shah *et al.*, 1997), y es una mutación prevalente en series clínicas de pacientes de la península (Margarit *et al.*, 2005; Brage *et al.*, 2007; Huarte-Muniesa *et al.*, 2014), si bien, p.M645R se ha descrito en pacientes de otros orígenes geográficos, principalmente de países latinoamericanos (Deguti *et al.*, 2004; Paradisi *et al.*, 2015; Penon-Portmann *et al.*, 2020). En cambio, la mutación p.L1120\* sólo se ha detectado en población española (Margarit *et al.*, 2005). Consecuentemente, ambos cambios presentan una frecuencia relativamente alta en nuestra población. No puede deberse a una mayor tasa de mutación al no localizarse en un *hotspot* (punto caliente) mutacional. Consecuentemente, no se descarta un posible efecto fundador para ambas mutaciones. Por una parte, p.M645R pudiera tener su origen en judíos askenazíes (Amir *et al.*, 2019), los cuales comparten un origen común con los sefarditas, comunidad asentada en la Península Ibérica entre los siglos III y XV, y desde aquí se podría haber exportado a países latinoamericanos por movimientos migratorios. Por otra parte, p.L1120\* podría

considerarse un evento fundador en España, en tanto que sólo se ha detectado en nuestra población. Se conocen varias mutaciones fundadoras propias de nuestro país, como por ejemplo c.358C>T (p.R120W) en *GDAP1*, asociada a neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo 2K (CMT2K; MIM: 607831) (Sivera *et al.*, 2010), o el cambio c.559delG (p.V187\*) en *SGCE*, implicado en distonía mioclónica (MIM: 159900) (Vanegas *et al.*, 2020). Sería interesante construir los haplotipos para el *locus ATP7B* en individuos con las mutaciones p.M645R o p.L1120\* de nuestra serie con el objetivo de establecer con absoluta certeza si son eventos fundadores o sucesos mutacionales independientes.

Otras mutaciones en *ATP7B* con una frecuencia significativa propias de población aislada geográficamente y/o con alta tasa de consanguinidad a las que se les asocia un posible efecto fundador son c.-441\_-427del15 en la isla de Cerdeña (Loudianos *et al.*, 1999b), c.2123T>C (p.L708P) en la isla de Gran Canaria (García-Villarreal *et al.*, 2000), y c.2448G>T (p.R816S) en Austria (Hofer *et al.*, 2012). En nuestra serie, el cambio c.1708-1G>A se halló sólo en pacientes romaníes en homocigosis, sin embargo este mismo cambio se ha reportado en pacientes de otras poblaciones (Loudianos *et al.*, 2000; Panagiotakaki *et al.*, 2004; Merle *et al.*, 2010), lo que indicaría que no es exclusivo de la comunidad romaní. En esta población se han identificado múltiples mutaciones fundadoras que a fecha de hoy no se han detectado en individuos no romaníes. Por este motivo, es llamativo cuando un cambio concreto es identificado tanto en caucasianos romaníes como caucasianos no romaníes. Este fenómeno podría deberse a la existencia de diferentes focos fundadores, como se conoce para la anemia falciforme causada por mutaciones en el gen que codifica para la cadena  $\beta$  de la hemoglobina (MIM: 141900) en la que se han descrito, al menos, tres sucesos independientes en África (Serjeant, 2013). También se podría explicar si hubiera habido ganancia de panmixia, de modo que la mutación fundadora pasara de una comunidad a otra, como ha sucedido con c.1583C>T (p.T528M) en *PANK2* descrita tanto en caucasianos romaníes como no romaníes implicada en PKAN (Darling *et al.*, 2017).

En dos de las familias estudiadas se detectaron tres variantes distintas en heterocigosis en *ATP7B* que cumplían los criterios de baja frecuencia poblacional en la base de datos gnomAD y posible efecto deletéreo. En la familia fEW-36, el probando es portador de tres mutaciones P/PP, p.E1086Rfs\*32 y p.L1120\* en *cis* heredadas de su madre y p.I1311T de su padre. En la familia fEW-66, la probando es homocigota para la variante novel c.-447C>T, de la que ambos progenitores son portadores en heterocigosis, y el padre además es portador del cambio p.M665I en *trans*. En la bibliografía se han descrito familias no consanguíneas en las que se aprecia un patrón de herencia pseudodominante, al haber sido diagnosticada la EW en generaciones consecutivas debido principalmente a la tasa de portadores relativamente alta (Coffey *et al.*, 2013; Dufernez *et al.*, 2013). Al tratarse de una mutación anteriormente descrita en pacientes EW (Loudianos *et al.*, 1999; Coffey *et al.*,

2013), se evaluó clínicamente al padre confirmándose que no presentaba afectación ni hepática ni neurológica. Recientemente, se ha anotado un individuo homocigoto para p.M665I en gnomAD. En estudios en población control española se ha observado que el cambio p.M665I es prevalente, por lo que incluso podría tratarse de un polimorfismo local (Dopazo *et al.*, 2016). Todo ello avala que p.M665I sea considerada no deletérea.

En nuestra serie, se han identificado mutaciones bialélicas en *ATP7B* en 22 casos (88 %) con el estudio de regiones codificantes, intrónicas flanqueantes y promotor, además del análisis de grandes duplicaciones y deleciones mediante MLPA. En las series clínicas de pacientes EW publicadas con estudio genético de *ATP7B* (regiones exónicas e intrónicas flanqueantes), de forma recurrente se observa un porcentaje que oscila entre 1-27 % de casos sin diagnóstico genético concluyente y puntuación igual o superior a 4 en la escala de Leipzig (Espinós and Ferenci, 2020). Siguiendo una estrategia centrada únicamente en regiones codificantes, identificaron en torno a un 85 % de casos con dos mutaciones P/PP tanto en un estudio realizado en Dinamarca (Møller *et al.*, 2011) como otro en Corea (Lee *et al.*, 2011). Incluyendo en el análisis la región promotora, en un estudio de prevalencia de la EW en población británica, la tasa de éxito se elevó al 98 % (Coffey *et al.*, 2013). En cambio, en otros trabajos, incluso habiendo estudiado la región promotora y deleciones/duplicaciones por MLPA, los autores no consiguen mejorar su rendimiento diagnóstico (Mukherjee *et al.*, 2014; Todorov *et al.*, 2016). Estos datos sugieren que otras regiones poco estudiadas en *ATP7B*, como son las regiones intrónicas profundas o la región 3'-UTR, podrían albergar mutaciones causantes de los fenotipos clínicos observados. Por ello, con el objetivo de avanzar en el diagnóstico genético de los dos pacientes de esta serie clínica con una clínica sugestiva de EW y una o ninguna mutación P/PP detectada en *ATP7B*, en este trabajo se ha desarrollado una herramienta basada en la captura y secuenciación masiva del gen completo. Esta aproximación ya se aplica en trastornos monogénicos como la fibrosis quística (*CFTR*, MIM: 219700) distrofia muscular de Duchenne (*DMD*, MIM: 310200) o la enfermedad de Stargardt (*ABCA4*, MIM: 248200), en la que en buena parte de casos con variantes monoalélicas se resuelve el diagnóstico con la identificación de mutaciones intrónicas profundas que pudieran dar lugar a la activación de pseudoexones (Trujillano *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Bauwens *et al.*, 2019).

El locus *ATP7B* contiene alrededor de 20 elementos repetitivos *Alu* localizados principalmente en secuencias intrónicas (Todorov *et al.*, 2016), lo que dificulta el diseño de sondas de captura para la secuenciación masiva de estas regiones, que requieren una mayor profundidad de secuenciación para alcanzar una buena cobertura que permita una correcta identificación de alteraciones genéticas. No obstante, la cobertura media alcanzada de *ATP7B* en las muestras estudiadas fue superior a 350x y el 98 % de las bases se cubrieron con al menos 20 lecturas. En EW13, se detectaron dos cambios intrónicos



profundos, c.52-1087T>C y c.2865+467A>G en heterocigosis, estando éste último en *trans* con c.482T>C (p.I161T), mutación con posible efecto deletéreo previamente detectada mediante secuenciación directa. Sin embargo, en EW27 no se detectó ningún cambio candidato con MAF <1 %. En cualquier caso, el haber analizado ambas muestras con esta técnica alternativa y altamente sensible nos permitió corroborar la ausencia de falsos negativos en los estudios mediante secuenciación directa y MLPA, y con ello concluir que probablemente la causa genética en estos dos pacientes reside en otros genes.

Para validar la herramienta, se analizó una muestra control (EW24), portadora de c.4022G>T junto con una delección en heterocigosis del exón 1 previamente detectados mediante secuenciación directa y MLPA, respectivamente. Esto permitió delimitar el tamaño de la delección: 121,7 kb desde el intrón 1 de *ATP7B* hasta el intrón 3 de *NEK5*. Hasta la fecha, únicamente se han descrito delecciones intragénicas en *ATP7B*, y en aquellas caracterizadas mediante secuenciación del *breakpoint* se ha demostrado la implicación de secuencias repetitivas tipo *Alu* en el mecanismo de la delección (Todorov *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2019b). En este caso, se han identificado los elementos transponibles MLT1J y L1MB3 en los *breakpoint* intrónicos 5' y 3', respectivamente, en torno a la microhomología "GTT". Se han relacionado grandes delecciones con elementos transponibles intercalados a lo largo del genoma, sobre todo en regiones intrónicas, 5' y 3'-UTR e intergénicas (van Zelm *et al.*, 2008). Las grandes delecciones suelen ocurrir durante la reparación de roturas de la doble cadena de DNA (DSBs, *double strand breaks*). Diferentes mecanismos que implican microhomologías se encargan de la reparación de DSBs; el más frecuente se conoce como NHEJ (*non-homologous end joining*) y se caracteriza por la presencia de microhomologías en la zona de unión inferiores a 4 pb, rodeadas de segmentos de baja homología (van Zelm *et al.*, 2008; Ottaviani *et al.*, 2014). Esto coincide con lo observado en la secuenciación del *breakpoint* aquí estudiado, por lo que el mecanismo de NHEJ podría ser el responsable de dicha delección.

Hasta la fecha, sólo *ATP7B* se ha asociado con la EW, pero otras enfermedades pueden presentar un cuadro clínico similar, *Wilson-like*. Por ello, se investigaron tres familias mediante secuenciación de exoma de las cuales se logró diagnosticar una de ellas (fEW-60). En las dos familias restantes (fEW-12 y fEW-18), son necesarios más estudios para descifrar si alguna de las variantes identificadas mediante esta técnica contribuye al fenotipo clínico. En la familia fEW-60 se identificaron dos cambios noveles, c.379G>T (p.G127\*) y c.383T>A (p.I128N), en heterocigosis compuesta en *CCDC115*, gen causante de CDG20. Se ha descrito que *CCDC115* se localiza en la región que comunica el retículo endoplásmico con el aparato de Golgi, en donde participaría en el ensamblaje de las V-ATPasas, por lo que la pérdida de función de esta proteína estaría relacionada con alteraciones en la homeostasis y tráfico vesicular del aparato de Golgi (Jansen *et al.*, 2016a).

Por ahora, se han descrito ocho casos con mutaciones en *CCDC115*, y en dos de ellos se estableció un diagnóstico inicial de EW debido a que presentaban bajos niveles de ceruloplasmina e hipertransaminasemia, acompañado de una concentración intrahepática de cobre moderada (Jansen *et al.*, 2016a; Girard *et al.*, 2018). En la familia fEW-60, el probando presentaba un fenotipo clínico compatible con EW con una puntuación de 5 en la escala de Leipzig, consistente en la presencia de elevación anormal de transaminasas, extrapiramidalismo y una alta concentración intrahepática de cobre. El cuadro clínico en su hermana era equivalente, excepto por la ausencia de acumulación de cobre en la biopsia de hígado, por lo que la puntuación en la escala de Leipzig fue inferior a 4 puntos. El resultado obtenido en esta familia pone de manifiesto el poder diagnóstico de la genética en general, y de la secuenciación de exoma en particular, para resolver cuadros clínicos complejos.

Conocer las bases moleculares que subyacen en los cuadros clínicos *Wilson-like* es importante para conseguir un diagnóstico temprano, y garantizar el mejor tratamiento posible. Recientemente se han publicado casos pediátricos con cuadro clínico compatible con EW y mutaciones en *TMEM199*, asociado a CDG2P (MIM: 616829) (Jansen *et al.*, 2016b; Vajro *et al.*, 2018). *TMEM199* es una proteína que interactúa con *CCDC115*, y los signos clínicos observados en los pacientes son similares a los definidos en CDG2O. En cuanto a enfermedad hepática, se han descrito similitudes con colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3 (PFIC3, MIM: 602347) causada por mutaciones en *ABCB4* (Shneider, 2011; Ramraj *et al.*, 2012; Boga *et al.*, 2015), o el síndrome MEDNIK (*AP1S1*, MIM: 609313), asociado a mutaciones en la proteína adaptadora de clatrina AP1, que participa en la regulación del tráfico intracelular de ATP7A y ATP7B (Martinelli *et al.*, 2013; Incecik *et al.*, 2018). Desde el punto de vista neurológico, otros trastornos que comparten descripción clínica con lo observado en EW son la aceruloplasminemia (*CP*, MIM: 604290) (Kuhn *et al.*, 2005; Kerkhof and Honkoop, 2014) así como la enfermedad de Menkes (*ATP7A*, MIM: 309400), en la que deficiencias en la proteína transportadora de cobre homóloga de ATP7B causan un déficit de cobre (Bansagi *et al.*, 2016). Indudablemente, las técnicas de NGS no sólo permiten ser más eficientes en el diagnóstico genético, sino que contribuirán a la identificación de otros genes asociados a fenotipos *Wilson-like* y que necesariamente habrá que considerar en pacientes con fenotipos compatibles.

#### ***Serie clínica H. U. Insular Materno-Infantil - H. U. de Gran Canaria Dr. Negrín***

Se estudiaron 21 casos índice (26 pacientes) procedentes de la isla de Gran Canaria, que pertenecen a una serie más amplia caracterizada clínicamente, con una alta homogeneidad genética, descrita parcialmente en García-Villarreal *et al.* (2020).

Con el estudio de promotor y regiones codificantes e intrónicas flanqueantes de *ATP7B* mediante secuenciación directa, se confirmó el diagnóstico de EW en 14 casos (66 %). Sólo en un caso se identificó una mutación P/PP en heterocigosis; es probable que se trate de un portador con hallazgo casual de hipoceruloplasminemia, condición que se suele confundir con pacientes asintomáticos en los que verdaderamente evoluciona la enfermedad (Ferenci *et al.*, 2003). En los seis casos restantes, el resultado del estudio genético no determinó un diagnóstico definitivo de EW. La tasa de éxito en esta cohorte es relativamente baja comparada con la investigada de los H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d'Elx, y por otros grupos que está entre 75-98 % (Coffey *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2014; Ferenci *et al.*, 2019). Esta circunstancia se explicaría porque son casos con clínica sugestiva de EW, en los que el signo común en todos ellos era el nivel de ceruloplasmina inferior a 20 mg/dL en suero y las mutaciones más frecuentes en la isla de Gran Canaria habían sido descartadas. Niveles disminuidos de ceruloplasmina, además de con EW, se asocian con diferentes enfermedades hepáticas y renales, de modo que podrían contemplarse con otras causas genéticas para explicar el cuadro clínico observado. Se identificaron 13 variantes P/PP distintas siendo el cambio p.L708P el más frecuente, del que se ha descrito un efecto fundador en Gran Canaria (García-Villarreal *et al.*, 2000). Se detectó un cambio novel, p.T1031I, que se localiza en el dominio P de unión a ATP (*P-domain*) de *ATP7B*. En el residuo T1031 se han detectado previamente en pacientes las mutaciones p.T1031A y p.T1031S (Park *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2014), para las que ensayos funcionales han mostrado que afectarían a la localización y capacidad de transportar cobre de *ATP7B* (Park *et al.*, 2007; Huster *et al.*, 2012).

#### ***Pacientes procedentes de distintos centros hospitalarios***

Se estudiaron 27 casos índice (31 pacientes) de diferentes centros hospitalarios referidos para estudio genético de EW como parte de la evaluación clínica según la escala de Leipzig para diagnóstico. En 19 casos se trataba de pacientes en edad infantil y adolescencia, periodo en el que un diagnóstico de EW antes de que comiencen los síntomas hepáticos o neurológicos es crucial para establecer una terapia preventiva con quelantes (Kerkar and Roberts, 2019b).

Con el estudio de las regiones codificantes de *ATP7B*, en el 50 % de los casos estudiados se alcanzó un diagnóstico genético de EW. En tres casos se identificó una única mutación P/PP en heterocigosis, y el estudio de la región promotora y de la dosis del gen mediante MLPA descartaron la presencia de una segunda mutación. Además, en nueve casos no se identificó ninguna mutación P/PP siguiendo esta estrategia de análisis. En siete de los 12 probandos, se investigó si eran portadores de mutaciones P/PP en *CCDC115* y *TMEM199*

que pudieran explicar el fenotipo observado, resultando negativo en todos los casos. Esto evidencia la necesidad de interpretar conjuntamente los hallazgos bioquímicos y genéticos para determinar si se trata de pacientes asintomáticos, portadores heterocigotos de una mutación en *ATP7B*, o padecen otra enfermedad que se asemeja a la EW.

Entre las 23 mutaciones P/PP distintas identificadas, tres son noveles: p.L709Pfs\*14, que causaría la disrupción del dominio transmembrana 2, p.A740P y p.S1362F, localizadas en los dominios transmembrana 3 y 8, respectivamente. Para el residuo S1362, otro cambio, p.S1362A, ha sido detectado previamente en pacientes EW (Mukherjee *et al.*, 2014), mientras que en el residuo A740 no se conocen otras mutaciones patológicas. Se ha observado que un importante número de variantes P/PP en *ATP7B* se distribuyen entre los ocho dominios transmembrana (Dastsooz *et al.*, 2013), regiones implicadas en el tráfico entre el TGN y el dominio apical de los hepatocitos (Gupta *et al.*, 2018). Adicionalmente, análisis *in silico* han mostrado que mutaciones en estas regiones causarían un mayor impacto sobre la función de la proteína que aquéllas situadas en el extremo N-terminal (Squitti *et al.*, 2014).

#### **Estudios de expresión y regulación de variantes en *ATP7B***

Dadas las posibilidades terapéuticas efectivas que existen para frenar el avance de la EW, urge alcanzar un diagnóstico certero a edad temprana. Por ello, resulta de especial interés determinar el impacto funcional de los hallazgos obtenidos en los estudios genéticos. En este trabajo, se han investigado las consecuencias de variantes intrónicas, ya que atendiendo a la frecuencia de mutaciones P/PP detectadas sólo en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx, éstas han sido relativamente frecuentes (siete de 25 variantes P/PP y una variante intrónica profunda clasificada como VUS). Para dos de las mutaciones identificadas, c.51+4A>T y c.3061-12T>A, ya se han publicado estudios funcionales (Loudianos *et al.*, 2002; Lovicu *et al.*, 2009). De las seis variantes restantes, en cuatro se identificaron alteraciones en el patrón de *splicing* del transcrito de *ATP7B* en sangre periférica de pacientes portadores, mientras que para las otras dos, fue necesario ampliar su análisis con el ensayo de minigenes.

Normalmente, las mutaciones localizadas en secuencias consenso de sitios de *splicing* 5' y 3' dan lugar a deleciones del exón (*exon skipping*), como se observa con las mutaciones c.1708-1G>A y c.4124+5G>A. Para cambios exónicos como c.4022G>T se presume que causarían un cambio de aminoácido, pero como éste se sitúa en el primer nucleótido del exón 20, se comprobó que también contribuiría a la pérdida de este exón. En ocasiones, en presencia de mutación en la secuencia consenso del sitio de *splicing*, la maquinaria implicada en este proceso, spliceosoma, pierde afinidad por el sitio original en favor de

sitios crípticos cercanos. Esto resulta en la pérdida de un fragmento exónico o en la inclusión de un fragmento intrónico, como sucede con las mutaciones c.4125-1G>A y c.2447+1G>T.

Para el cambio c.2447+1G>T sólo se detectaron alteraciones del *splicing* del mRNA mediante el ensayo de minigenes. En un estudio comparativo de 30 mutaciones de *splicing* en el que utilizan tanto análisis de RNA en muestras humanas como ensayo de minigenes, los autores concluyen que todas las mutaciones dan lugar a transcritos aberrantes con ambas estrategias, pero para cuatro mutaciones, los patrones de *splicing* detectados mediante ambas aproximaciones son distintos (Van Der Klift *et al.*, 2015). En el análisis del único transcrito amplificado desde RNA del paciente portador en heterocigosis del cambio c.2447+1G>T, sólo se identificó un alelo correspondiente con la secuencia de referencia. Es posible que el transcrito codificado por el alelo c.2447+1G>T sea eliminado por el mecanismo de *non-sense mediated decay* (NMD). En cambio, en el ensayo de minigenes, se obtuvieron dos transcritos a partir del alelo c.2447+1G>T, en el que se pierde total o parcialmente el exón 9. En ambos casos implicaría el desplazamiento de la pauta de lectura y la aparición de un codón de parada temprano. Este fenómeno depende de diferentes factores, como la fuerza del sitio de *splicing*, longitud del exón/intrón, presencia de un codón de parada temprano, la cercanía de elementos activadores del *splicing* (ESE, *exonic splicing enhancers*) e incluso posiblemente el orden de procesamiento de los intrones en el pre-mRNA (Takahara *et al.*, 2002; Ramalho *et al.*, 2003).

Finalmente, al menos con las técnicas empleadas, se podría descartar c.2865+467A>G como variante patológica dado que en ambas aproximaciones experimentales, el patrón de *splicing* identificado se corresponde con el procesamiento del transcrito codificado por el alelo *wild type*. Por tanto, en el probando de la familia fEW-12 no se confirmaría el diagnóstico de EW, a pesar de ser heterocigoto compuesto para dos cambios *ATP7B* potencialmente deletéreos, c.2865+467A>G/c.482T>C (p.I161T), y un cuadro clínico compatible. Quizás, para obtener un resultado más concluyente, habría que ampliar el estudio a otros tejidos para descartar o confirmar la implicación de esta variante intrónica con la patología del paciente. En su conjunto, este hallazgo refleja la necesidad de ser cautelosos para interpretar las consecuencias fenotípicas de las mutaciones y por tanto, de establecer un diagnóstico con el correspondiente tratamiento terapéutico.

Hasta la fecha, se han publicado 12 variantes clínicas en pacientes con la EW en la región promotora de *ATP7B* (HGMD Professional 2020.3), y sólo en cinco se ha investigado el efecto que causarían sobre la regulación de la expresión (Loudianos *et al.*, 1999b; Wan *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018). En la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx se identificó en un caso una mutación novel en homocigosis, c.-447C>T,

posición nucleotídica adyacente a la secuencia consenso del tercero de los cuatro motivos de unión de respuesta a metales, MREc (*metal-responsive element c*), conservados en el promotor de *ATP7B* (Oh *et al.*, 1999). Mediante ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*) se ha descrito que esta posición es importante para la unión de factores de transcripción al motivo MREc (Stalke *et al.*, 2020). Dado que este tipo de mutaciones en *ATP7B* han sido poco estudiadas, se realizó un ensayo de luciferasa que permitió confirmar una reducción del 25 % de la actividad promotora, nivel equivalente a los registrados en otras mutaciones del promotor de *ATP7B* (Chen *et al.*, 2018). Consecuentemente, se concluyó que el cambio *ATP7B* c.-447C>T sería deletéreo. Así pues, en el probando EW182 portador de *ATP7B* c.-447C>T en homocigosis la enfermedad estaría causada por una disminución de *ATP7B* dado que su actividad transcritora estaría mermada.

### **Análisis de modificadores genéticos**

Establecer correlaciones genotipo-fenotipo en la EW es complicado debido a la disparidad de síntomas y modos de presentación observados en los pacientes, incluso con la misma mutación en *ATP7B*. Hay enfermos que cursan con signos neurológicos, otros con daño hepático, o incluso pueden ser asintomáticos. Además, la evolución de la enfermedad con manifestaciones neurológicas y/o hepáticas presenta igualmente una amplia variabilidad tanto inter como intrafamiliar. Estas observaciones son un rasgo característico de muchas enfermedades mendelianas en las que, pese a ser monogénicas, no se aprecia una correlación evidente entre mutación y clínica. Son muchos los factores que contribuyen a esta variabilidad desde factores genéticos como cambios en el genoma que acompañan a la mutación causal y que participan del fenotipo, hasta aspectos ambientales (hábitos) como epigenéticos. En este sentido, se descubrió en un estudio de más de medio millón de genomas en individuos que 13 de ellos eran portadores de mutaciones patológicas causantes de trastornos hereditarios pediátricos muy graves, para los cuales continuaban asintomáticos (Chen *et al.*, 2016). Este trabajo evidenció que en nuestro genoma existen variantes que actúan de forma protectora hasta tal extremo que evitan la expresión de mutaciones patológicas implicadas en dolencias severas congénitas o con debut a edad temprana. En la atrofia muscular espinal, causada por mutaciones en *SMN1* (MIM: 600354), el número de copias de *SMN2*, pseudogen de *SMN1* que produce una proteína inactiva, influye en la gravedad de los síntomas: a mayor número de copias de *SMN2*, clínica más leve (Calucho *et al.*, 2018). En la neuropatía de CMT2K, causada por mutaciones en *GDAP1*, se ha descrito que la coexistencia de las mutaciones *GDAP1* p.R120W y *JPH1* p.R213P agravan el fenotipo clínico, probablemente debido a que la liberación del calcio citosólico

tóxico se ve dificultada por interacciones incorrectas entre ambas proteínas que juegan un papel relevante en la respuesta SOCE (*store-operated Ca<sup>2+</sup> entry*) (Pla-Martín *et al.*, 2015). Poco a poco, el listado de factores genéticos que modifican el fenotipo resultante, en mayor o menor grado, va en aumento y en muchos casos, se deben tener en cuenta en el diagnóstico dada su influencia en la presentación de los signos clínicos.

Se han publicado varios casos de expresión variable entre hermanos, incluyendo gemelos monocigóticos. En la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx se identificaron dos familias, fEW-30 y fEW-44, con claras diferencias fenotípicas, en la edad de debut y modo de presentación así como en la evolución de la enfermedad. En la familia fEW-30, la probando debutó con un cuadro neurológico severo mientras que su hermana mayor permanecía asintomática siendo heterocigotas compuestas para p.H580Pfs\*2/p.H1069Q. En la familia fEW-44 se trataba de gemelas univitelinas, heterocigotas compuestas para p.G85V/p.H1069Q, que debutaron tanto con síntomas hepáticos como neurológicos con varios años de diferencia. En ambas familias se detectó en heterocigosis compuesta el cambio p.H1069Q, mutación prevalente en Europa (Członkowska *et al.*, 2018). Hay cuatro casos descritos en la bibliografía de variabilidad clínica entre hermanos portadores del cambio p.H1069Q (Członkowska *et al.*, 2009; Kegley *et al.*, 2010; Sapuppo *et al.*, 2020); en tres de ellos se trata de gemelos monocigóticos, tanto homocigotos como heterocigotos compuestos con variantes de pérdida de función (c.1211\_1212insA y c.3904-2A>G). El hecho de portar diferentes mutaciones en heterocigosis compuesta ya dificulta la posibilidad de determinar correlaciones genotipo-fenotipo. Pese a ello, se ha descrito que pacientes homocigotos para el cambio p.H1069Q suelen presentar un debut neurológico tardío (Stapelbroek *et al.*, 2004). Son necesarios más estudios con series grandes genéticamente homogéneas para llegar a establecer relaciones evidentes entre una mutación y la presentación/progresión de un signo clínico.

En la EW sería esperable la existencia de modificadores genéticos que interfieran en la regulación del metabolismo del cobre en pacientes de modo que contribuyan al cuadro clínico. Dada las diferencias clínicas apreciadas en las hermanas enfermas de las familias fEW-30 y fEW-44, éstas se seleccionaron para investigar mediante secuenciación de exoma un listado de genes implicados en el metabolismo del cobre y que pudieran estar relacionados con la función de ATP7B.

En EW46, probando de la familia fEW-30, se detectó en heterocigosis el cambio c.2753C>T (p.R918H) en *MYO5B*. Mutaciones bialélicas en este gen son causantes de la enfermedad de inclusión microvellosa (MVID, *microvillus inclusion disease*; MIM: 251850), que se caracteriza a nivel histológico por la pérdida de *microvilli* en el dominio apical de enterocitos y hepatocitos (Gupta *et al.*, 2016; Dhekne *et al.*, 2018). *MYO5B* es una proteína

motora asociada a los filamentos de actina que controla el tráfico de endosomas en el dominio apical, por lo que su deficiencia produce la deslocalización de proteínas de la membrana apical, entre ellas *ATP7B*. (Gupta *et al.*, 2016). En células WIF-B, modelo de hepatocitos polarizados, se ha descrito que *MYO5B* regula el tráfico vesicular de *ATP7B* para el transporte de cobre hacia el canalículo biliar. En este modelo, en condiciones de exceso de cobre, la sobreexpresión de un mutante de *MYO5B* con efecto dominante negativo retiene *ATP7B* en el compartimento subapical, impidiendo que llegue a su destino final para la secreción de cobre al canalículo biliar (Gupta *et al.*, 2018). En ocasiones, los pacientes MVID cursan con colestasis, posiblemente como consecuencia de la alteración del tráfico apical de proteínas transportadores de sales biliares (*BSEP*, *bile-salt export pump*) (Girard *et al.*, 2014). Sin embargo, se desconoce si en los pacientes MVID el metabolismo de cobre está alterado (Gupta *et al.*, 2018).

En la familia fEW-44 se detectó en ambas hermanas el cambio c.637G>A (p.R213C) en *CCDC93*. La proteína *CCDC93* forma parte del complejo CCC (*COMMD1/CCDC22/CCDC93*), que junto al complejo *WASH* y el retrómero *SNX27*, interacciona con *ATP7A* para su reciclaje en endosomas tempranos (Singla *et al.*, 2019). Deficiencias en el complejo CCC resultan en acumulación intracelular de cobre por mutaciones en *CCDC22*, debido a la interrupción del transporte basolateral dependiente de cobre de *ATP7A* (Phillips-Krawczak *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2018). Por homología, en condiciones de exceso de cobre, es posible que el tráfico de *ATP7B* en endosomas tardíos (lisosomas) sea regulado de forma similar por medio de *COMMD1* como parte del complejo CCC (van de Sluis, 2019). En cualquier caso, este cambio por sí solo no puede explicar las diferencias clínicas observadas entre estas hermanas. Indudablemente, hay aspectos ambientales y epigenéticos que no se recogen en un exoma y que influyen en el fenotipo, además de factores en el fondo genético de cada persona, incluso en hermanos univitelinos. Recientemente, la secuenciación del genoma en parejas de gemelos monocigóticos ha revelado, en el 15% de los casos estudiados, mutaciones en uno de los gemelos no compartidas por el hermano, cuyo origen se atribuye a estadios previos a su separación durante el desarrollo embrionario (Jonsson *et al.*, 2021). Se debiera desterrar la idea de que los genomas de gemelos monocigóticos son necesariamente idénticos en su totalidad.

Se ha demostrado que en presencia del cambio *ATP7B* p.H1069Q, la proteína queda parcialmente retenida en el RE, al activarse los mecanismos de control de calidad proteolíticos de la célula por agregación y problemas de plegamiento de la proteína sintetizada (Van Den Berghe *et al.*, 2009). Por ello, a pesar de que el mutante *ATP7B*-H1069Q presenta cierta actividad residual de transporte de cobre, no sería capaz de transportarse al aparato de Golgi y por tanto, su tráfico intracelular entre el TGN y el canalículo biliar para la excreción de cobre se encontraría interrumpido (Huster *et al.*,



2012). En un modelo celular de hepatocitos obtenido mediante reprogramación de fibroblastos de pacientes homocigotos para esta mutación, se ha comprobado que ante una elevación del cobre en el medio, un pequeño porcentaje de la proteína conserva capacidad de transporte entre el TGN y el compartimento endolisosomal (Parisi *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta que tanto MYO5B como CCDC93 participarían en el tráfico intracelular de ATP7B, sería de interés conocer si las mutaciones identificadas en ambas proteínas podrían afectar negativamente, reduciendo aún más los niveles de actividad residual del mutante ATP7B-H1069Q.

Por último, el análisis de variantes identificadas en el filtrado de genes de interés se centró en aquellas localizadas en *COMMD1* y *ATOX1*, genes descritos como posibles modificadores genéticos por su interacción directa con ATP7B (Gupta *et al.*, 2018; Medici and LaSalle, 2019). En la familia fEW-44 se identificó en heterocigosis el cambio c.358C>T (p.R120W) en *COMMD1*. Esta mutación ha sido identificada en heterocigosis en un paciente con presentación neurológica en segunda década (Bost *et al.*, 2012) y también en otros seis pacientes, descartándola como posible mutación patológica porque es un cambio común en población control sana (Lovicu *et al.*, 2006). Estudios *in vitro* han mostrado que *COMMD1* se une aberrantemente al mutante ATP7B-G85V, mutación detectada en esta misma familia, promoviendo su degradación (de Bie *et al.*, 2007b). En *ATOX1* se detectó en heterocigosis el cambio c.-99T>C tanto en la familia fEW-44 como en la probando EW46 de la familia fEW-30. En un estudio de búsqueda de variantes en *ATOX1* en pacientes con la EW, se asoció la variante *ATOX1* c.-99T>C con un inicio temprano de la enfermedad (Simon *et al.*, 2008), aunque en un trabajo posterior no lograron validar este resultado (Bost *et al.*, 2012).

El análisis de los posibles cambios que pudieran actuar como modificadores genéticos (MYO5B p.R918H, CCDC93 p.R213C, y *ATOX1* c.-99T>C y *COMMD1* p.R120W) identificados en las pacientes de las familias fEW-30 y fEW-44 se hizo extensivo a un subgrupo de 12 pacientes de la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx: MYO5B p.R918H estaba presente en cinco casos, aunque sólo uno de ellos cursaba con sintomatología neurológica al igual que EW46; ninguno de los 12 pacientes portaba ni CCDC93 p.R213C ni *COMMD1* p.R120W; *ATOX1* c.-99T>C se observó en tres casos en heterocigosis y en uno en homocigosis, con inicio de la enfermedad tanto en edad adulta como infantil y adolescencia. El estudio de todas las regiones codificantes e intrónicas flanqueantes de *COMMD1* y *ATOX1* no reveló ninguna otra variante con posible efecto deletéreo, lo que pone de manifiesto la importancia de estas proteínas en el metabolismo celular. En *COMMD1* se detectó la sustitución intrónica c.462+63C>G en cinco casos, dos de ellos neurológicos con inicio en edad adulta, y el cambio sinónimo c.492T>C (p.D164=) en un caso con sintomatología hepática con inicio en segunda década. Ambos cambios han sido

detectados en otros cribados mutacionales de *COMMD1* en pacientes con EW. En el estudio de Stuehler y colaboradores (2004), se asoció el cambio c.492T>C en *COMMD1* con inicio temprano de la EW, en pacientes homocigotos para ATP7B p.H1069Q. Sin embargo, posteriormente, el equipo de Lovicu (2006) descartó que el cambio *COMMD1* c.492T>C alterara el *splicing* del mRNA. Todo ello sugiere que ambas variantes no contribuirían significativamente al fenotipo clínico observado en los pacientes EW portadores de las mismas.

Motivado por la variabilidad clínica intrafamiliar observada en la familia fEW-30, en ambas hermanas se profundizó en el estudio de modificadores genéticos con la búsqueda de otras variantes que pudieran contribuir a la diferente presentación de la enfermedad. En la probando EW46 se identificó en heterocigosis la variante p.R419C en LMNA, mientras que su hermana EW47, prácticamente asintomática, no la presenta. LMNA codifica para las isoformas lamina A y C, proteínas del filamento intermedio que principalmente constituyen la lámina nuclear y juegan un papel importante en mantener la integridad del núcleo, la organización de la cromatina y la regulación transcripcional (Broers *et al.*, 2006). El transcrito más largo de LMNA contiene 12 exones y codifica para la proteína precursora prelamina A, que tras un proceso de maduración consistente en la farnesilación del segmento CaaX en el extremo C terminal, metilación de la cisteína farnesilada y corte proteolítico por parte de la metalopeptidasa ZMPSTE24, da lugar a la lamina A madura que se incorpora a la lámina nuclear (Barrowman *et al.*, 2008). Mediante *splicing* alternativo se genera un transcrito que contiene los 10 primeros exones que codifica para la lamina C, por tanto ambas isoformas se diferencian en el extremo C terminal (Janin and Gache, 2018). El cambio c.1255C>T (p.R419C) se localiza en el exón 7, región que codifica para la secuencia de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) que comprende los residuos 417-422, y por tanto, afectaría a ambas isoformas (Florwick *et al.*, 2017).

Mutaciones en LMNA son causantes de laminopatías, término que refiere a un amplio espectro de cuadros clínicos diversos que engloban distrofias musculares, lipodistrofias, cardiomiopatías, neuropatías, displasias y síndromes progeroides (Brady *et al.*, 2018). En concreto, LMNA p.R419C se publicó en un caso de lipodistrofia parcial familiar tipo 2, variedad Dunnigan (LPF/D; MIM: 151660), trastorno que se caracteriza por una pérdida selectiva de tejido adiposo subcutáneo en extremidades y tronco (Haque *et al.*, 2003), fenotipo descartado en la probando EW46. Los pacientes con LPF/D pueden manifestar signos adicionales tales como diabetes, dislipidemia y esteatosis hepática, apreciándose penetrancia incompleta y expresividad variable (Brady *et al.*, 2018). Kiel y colaboradores (2014) estudiaron el transporte y localización en núcleo mediante sobreexpresión en células HeLa de diferentes mutaciones en LMNA causantes de LPF/D, y en el caso de

p.R419C observaron una menor eficiencia de incorporación a la lámina nuclear, acompañado de acumulación de prelamina A en el citoplasma.

Diversos estudios en fibroblastos de pacientes portadores de mutaciones en *LMNA* asociadas a síndromes como la progeria de Hutchinson-Gilford (MIM: 176670) y lipodistrofias como la familiar parcial tipo 2 (MIM: 151660), han mostrado acumulación de prelamina A, alteraciones en la formación de la estructura nuclear y una mayor susceptibilidad a estrés oxidativo (Capanni *et al.*, 2005; Caron *et al.*, 2007; Verstraeten *et al.*, 2009; Sieprath *et al.*, 2015). En el contexto de la fisiopatología de la EW, la acumulación de cobre en la célula causa daños en la mitocondria, en donde progresivamente se concentra debido a la gran cantidad de proteínas mitocondriales que requieren de cobre para su correcto funcionamiento, lo que resulta en una mayor producción de ROS (Zischka and Borchard, 2019).

Trabajando con fibroblastos humanos, se han relacionado mutaciones en *LMNA* con formas anormales del núcleo con el tipo de mutación y el fenotipo (van Tienen *et al.*, 2019). Mediante inmunofluorescencia utilizando anti-lamina A/C, se evaluó si en fibroblastos EW46 existía una predominancia de núcleos con estructuras anormales en comparación con fibroblastos control F1A, observándose estructuras anómalas por igual en ambos tipos celulares, posiblemente relacionadas con el estadio de división celular en el que se encontraban. También se trató de determinar diferencias morfológicas mediante el estudio de la circularidad o contorno del núcleo (NCR, *nuclear contour ratio*) por análisis de imagen, en el cual ambas líneas presentaron valores similares (promedio de NCR en torno a 0,80). Otros autores han aplicado este mismo tipo de análisis de imagen para cuantificar deformidades del núcleo en fibroblastos portadores de otras mutaciones en *LMNA*, mostrando que este valor es compatible con líneas control adherentes con crecimiento en monocapa, y para las líneas mutantes muestran valores promedio de NCR ligeramente inferiores (Saha *et al.*, 2010; Steele-Stallard *et al.*, 2018).

Una forma de evaluar la susceptibilidad a estrés oxidativo en cultivos celulares consiste en la exposición a agentes que lo causen como  $H_2O_2$  y posterior evaluación de la viabilidad celular. Se aplicaron diferentes concentraciones de este compuesto para inducir estrés durante dos horas y a continuación se analizó la viabilidad celular mediante ensayo de MTS. Una concentración de 75  $\mu M$  de  $H_2O_2$  fue suficiente para reducir la viabilidad al 50 % en fibroblastos EW46, mientras que en fibroblastos control F1A ésta se mantuvo tanto a 75 como a 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , concentración máxima testada. Estos resultados demuestran que los fibroblastos EW46 presentan una mayor vulnerabilidad ante una situación de inducción de estrés, lo que advierte de que la respuesta antioxidante de la célula se puede ver sobrepasada para vencerla.

La función principal de la mitocondria es la obtención de energía en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) a través de la cadena respiratoria. Un mal funcionamiento de la cadena respiratoria puede desembocar en una mayor producción de ROS mitocondrial, debido a que los electrones que escapan de los complejos I y III de la cadena respiratoria antes de que se complete la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$  por parte de complejo IV/citocromo c oxidasa se convierten en radicales superóxido ( $O_2^-$ ) (Cedikova *et al.*, 2016). Tanto en fibroblastos como adipocitos de pacientes con mutaciones en *LMNA* asociadas a lipodistrofia, se ha observado una disminución en los niveles de COX2, subunidad mitocondrial del complejo IV/citocromo c oxidasa, lo que sugiere que pueden existir deficiencias en el funcionamiento de la cadena respiratoria (Caron *et al.*, 2007; Béréziat *et al.*, 2011). Para comprobarlo, se analizó el perfil de respiración mitocondrial y producción de  $H_2O_2$  mediante respirometría de alta resolución en fibroblastos EW46 en comparación con fibroblastos control F1A. La determinación del OCR en célula intacta permitió comprobar que el mecanismo de respiración LEAK se encuentra sobreestimulado en fibroblastos EW46, y por consiguiente, la capacidad de reserva de la mitocondria está disminuida, es decir, la célula está limitada para responder a una situación de alta demanda energética. Se ha visto que la estimulación del *proton leak* tiene un papel citoprotector para la célula en condiciones de estrés oxidativo (Cadenas, 2018), por lo que el hecho de que este mecanismo esté activado podría indicar que existen deficiencias en los complejos que conforman el sistema OXPHOS, tal y como se ha descrito para mutaciones en *LMNA* asociadas a lipodistrofia (Caron *et al.*, 2007; Béréziat *et al.*, 2011). En el experimento en célula permeabilizada, se ha observado que los sustratos empleados para el estudio de los estados respiratorios LEAK y OXPHOS conducen a una respiración más deficiente en fibroblastos EW46. En cualquier caso, para analizar con más detalle posibles defectos en la cadena respiratoria en fibroblastos EW46, sería necesario medir los niveles de los complejos que la componen.

En la medición de la producción de  $H_2O_2$  acoplada al consumo de  $O_2$  tanto en célula intacta como permeabilizada, los niveles de  $H_2O_2$  detectados en fibroblastos EW46 con respecto a F1A fueron inferiores, aunque sólo significativos en célula intacta. Para corroborar dichos resultados junto con el del experimento de inducción de estrés oxidativo bajo tratamiento de  $H_2O_2$ , se evaluó la respuesta antioxidante en fibroblastos del paciente y del control con el análisis de los niveles de expresión génica de una serie de enzimas antioxidantes. En condiciones basales, en fibroblastos EW46 se detectaron mayores niveles de expresión de enzimas antioxidantes que actúan en la mitocondria, *SOD2*, *TRX2*, *PRDX5* y *GPX4*, así como un aumento de *HMOX* y disminución de *NQO1*, genes de respuesta a estrés inducido por  $H_2O_2$ . Destaca que todos estos genes son diana del factor de transcripción Nrf2, el cual activa su expresión en respuesta a estrés oxidativo (Johnson *et*

*al.*, 2008; Ma, 2013; Li *et al.*, 2014). Esto indicaría que, en estado basal, los fibroblastos EW46 presentan una respuesta antioxidante sobreactivada en la mitocondria, lo que justificaría los menores niveles de  $H_2O_2$  detectados en los experimentos de respiración mitocondrial. En la mitocondria, la actividad de *SOD2* es crucial para la eliminación de radicales  $O_2^-$  y ésta ha de estar sincronizada con la actividad de enzimas que eviten la acumulación de  $H_2O_2$ , como son *TRX2* y *PRDX5* (Kakkar and Singh, 2007). El hecho de que en fibroblastos EW46 ya en condiciones basales se detecte la sobreexpresión de genes de respuesta a estrés oxidativo como *HMOX*, sugiere que la célula podría encontrarse en una situación comprometida, y por ello el tratamiento con  $H_2O_2$  indujera una mayor mortalidad en dicha línea celular.

Las UCPs son transportadores de protones presentes en la membrana mitocondrial interna que disipan el gradiente de protones que genera la cadena respiratoria, y por tanto, contribuyen a la respiración en estado LEAK. En fibroblastos EW46, destacan los mayores niveles de expresión detectados en *UCP2*, gen que codifica para la proteína desacoplante 2, lo que explicaría el aumento de la respiración debida al *proton leak* observado en esta línea celular. Además, se ha descrito que la sobreexpresión de *UCP2* contribuiría a reducir la producción de radicales libres en condiciones de estrés oxidativo. La acumulación de  $O_2^-$  en la membrana mitocondrial interna activaría la expresión de *UCP2*, por lo que aumentaría la permeabilidad de la membrana y con ello el desacoplamiento de la respiración oxidativa, resultando en una menor producción de este radical ya que éste es dependiente del gradiente de protones (Kakkar and Singh, 2007). Además, se ha demostrado que *UCP2* promueve la oxidación de ácidos grasos, mecanismo para la obtención de energía en forma de ATP que a diferencia del basado en la oxidación de succinato como intermediario del ciclo de Krebs, evita la transferencia de electrones reversa de la cadena respiratoria hacia el complejo I, resultando en una menor producción de  $O_2^-$  (Schönfeld *et al.*, 2010). *UCP2* exporta malato, oxalacetato y aspartato, compuestos del ciclo de Krebs, hacia el exterior de la mitocondria, lo que resulta en un *shift* metabólico: se inhibe la obtención de energía a partir de la oxidación del piruvato a través del ciclo de Krebs en favor de obtenerla de la oxidación de ácidos grasos o de la glutaminólisis (Pecqueur *et al.*, 2008; Voza *et al.*, 2014). Por una parte, esto justificaría que en célula intacta no se observaran diferencias en el consumo de  $O_2$  en condiciones basales entre fibroblastos EW46 y F1A, ya que este *shift* metabólico permitiría mantener la producción de ATP generando menores niveles de ROS mitocondrial. Por otra parte, en el experimento en célula permeabilizada, podría explicar el hecho de que la respiración en presencia de succinato fuera deficiente en fibroblastos EW46, ya que supondría la generación de mayores niveles de ROS mitocondrial para la célula. Para corroborar esta observación, sería interesante explorar la respiración mitocondrial a través de la oxidación de ácidos grasos y de la glutaminólisis en fibroblastos

EW46, para determinar si son fuentes de energía más adecuadas para la célula. En definitiva, los fibroblastos EW46 pudieran haber adoptado un mecanismo de defensa para amortiguar el estrés oxidativo originado en la mitocondria basado en la sobreexpresión de (i) enzimas antioxidantes y (ii) la proteína UCP2, la cual contribuiría a rebajar el gradiente de protones (del que depende la producción de  $O_2^-$ ) y a promover un posible *shift* metabólico hacia el uso de sustratos que generan menos ROS en la respiración.

En resumen, los hallazgos obtenidos sugieren que los fibroblastos EW46 portadores de LMNA p.R419C y ATP7B p.H580Pfs\*2/p.H1069Q presentarían deficiencias en la respiración mitocondrial, acompañado de una respuesta a estrés oxidativo en condiciones basales incrementada en la mitocondria. Adicionalmente, sería necesario comprobar niveles de ROS de origen no mitocondrial que pudieran contribuir a un mayor estrés oxidativo en fibroblastos EW46 en condiciones basales. Se ha postulado que, para proteger al material genético de los efectos nocivos del estrés oxidativo, en el espacio perinuclear se concentrarían una gran cantidad de enzimas antioxidantes, que funcionarían como un escudo protector mantenido por interacciones electroestáticas (Fabrini *et al.*, 2010). En el modelo propuesto, las nesprinas 1 y 2 funcionarían como proteínas *scaffold*. Ambas isoformas, lamina A y C, conforman junto a las nesprinas 1 y 2 el complejo LINC (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*), que conecta el citoesqueleto con la lámina nuclear (Méjat, 2010). En concreto, LMNA interacciona con nesprina 2, y el residuo R419 se localizaría en la zona de unión entre ambas proteínas, por lo que Yang y colaboradores (2013) comprobaron que en presencia de esta mutación la interacción entre ambas proteínas se ve disminuida. LMNA es esencial para la correcta localización de nesprina 2 en la membrana nuclear para formar el complejo LINC. Consecuentemente, la presencia de mutaciones en LMNA alteraría la formación de la envoltura nuclear y por tanto, una menor efectividad del escudo protector debido a la incorrecta localización de las enzimas antioxidantes en torno al núcleo, lo que confiere una mayor susceptibilidad a daño por estrés oxidativo (Sieprath *et al.*, 2012).

Se precisan más estudios que corroboren que las alteraciones observadas están relacionadas con la mutación en LMNA. Para ello, sería necesario introducir como control de estos experimentos fibroblastos de pacientes EW portadores de las mismas mutaciones en ATP7B y sin mutación en LMNA. En cualquier caso, ATP7A pudiera suplir la función de ATP7B en fibroblastos (Lenartowicz *et al.*, 2016), por lo que posibles alteraciones de la homeostasis del cobre en fibroblastos por mutaciones en ATP7B quedarían disminuidas.

## Conclusiones

1. El análisis de las regiones codificantes, de *splicing* flanqueantes, y promotor mediante Sanger, junto con el estudio de grandes deleciones/duplicaciones mediante MLPA, ha permitido alcanzar un diagnóstico definitivo de EW en el 88 % de los casos en la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx formada por probandos con puntuación en la escala Leipzig superior a 3.
2. La herramienta desarrollada para el diagnóstico molecular de la EW basada en la secuenciación completa de *ATP7B* resulta eficaz para la detección de alteraciones en regiones codificantes, no codificantes y reguladoras, incluyendo grandes duplicaciones y/o deleciones. Su aplicación es de interés para descartar con la mayor certeza posible la implicación de *ATP7B* en la enfermedad.
3. Análisis de transcritos y/o de minigenes han permitido concluir que las cinco mutaciones de *splicing* analizadas (c.1708-1G>A, c.4022G>T, c.4124+5G>A, c.4125-1G>A y c.2447+1G>T) modificarían el *splicing* correcto y producirían proteínas truncadas. Estos resultados destacan el relevante número de mutaciones de *splicing* en *ATP7B* y su implicación en la patología.
4. El paciente EW13 resultó ser heterocigoto compuesto para *ATP7B* c.2865+467A>G/c.482T>C (p.I161T). El estudio funcional de la mutación intrónica profunda no mostró alteraciones, descartando su posible patogenicidad, aun teniendo diagnóstico clínico de EW.
5. En la probando EW182 se identificó la mutación novel c.-447C>T en homocigosis en la región promotora de *ATP7B*. El ensayo de luciferasa reveló que ésta causaría deficiencias en la actividad transcripcional del promotor, lo que apoyaría su patogenicidad.
6. Pese al estudio exhaustivo de *ATP7B*, en tres probandos, EW13, EW27 y EW110, no se identificaron mutaciones deletéreas, por lo que se estudiaron mediante secuenciación de exoma, sin lograr un diagnóstico concluyente en dos de ellos (EW13, EW27).
7. En la secuenciación del exoma de los hermanos EW110 y EW111 se hallaron dos variantes noveles, c.383T>A (p.G127\*) y c.379G>T (p.I128N), en heterocigosis compuesta en *CCDC115*, gen asociado a un fenotipo *Wilson-like*. Este hallazgo resalta la necesidad de considerar otras enfermedades que cursen con cuprotoxicidad hepática en casos con resultado negativo en el análisis genético de *ATP7B*.

8. En el estudio del exoma de las familias fEW-30 y fEW-77, con amplia variabilidad intrafamiliar, se identificaron los cambios *MYO5B* c.2753C>T (p.R918H), *CCDC93* c.637G>A (p.R213C), y *COMMD1* c.358C>T (p.R120W), proteínas que participarían en el transporte intracelular de ATP7B. El cribado de estas variantes en otros pacientes de la serie no ha logrado establecer correlaciones con la variabilidad clínica observada.
9. En el análisis comparativo de variantes identificadas en la secuenciación del exoma de la familia fEW-30, se detectó en la paciente EW46 en heterocigosis la variante c.1255C>T (p.R419C) en *LMNA*, previamente asociada a lipodistrofia parcial familiar tipo 2, variedad Dunnigan, patología descartada en la paciente.
10. Estudios morfológicos en fibroblastos de EW46, portadores de *LMNA* c.1255C>T (p.R419C) + *ATP7B* c.1739delA (p.H580Pfs\*2)/c.3207C>A (p.H1069Q), no muestran anomalías en la estructura nuclear que pudieran ser relacionadas con mutaciones en *LMNA*. Sin embargo, los estudios funcionales de respiración mitocondrial y tras la inducción de estrés oxidativo, sugieren que existe una respuesta antioxidante crónica, lo que podría contribuir en el fenotipo clínico resultante.



**CAPÍTULO II:**  
**BÚSQUEDA DE miRNAs CIRCULANTES EN PLASMA**  
**COMO BIOMARCADORES EN LA EW**



## Hipótesis y Objetivos del Capítulo II

La identificación de **biomarcadores** que permitan anticipar la evolución de la enfermedad es crucial para mejorar el tratamiento que reciben los pacientes con EW. Se sabe que la desregulación de miRNAs puede estar implicada en cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y hepáticas, entre otras. Los miRNAs circulantes en plasma correlacionan con su expresión en tejidos, de modo que son biomarcadores realistas del estatus de la enfermedad. Alteraciones en el perfil de expresión de miRNAs pueden servir como biomarcadores pronóstico de la evolución de la enfermedad, mejorando el tratamiento que los pacientes con EW reciben actualmente. Además, pueden actuar como biomarcadores para testar la eficacia de nuevos medicamentos huérfanos y de terapias génicas.

### Objetivos específicos del Capítulo II

Determinación del perfil de miRNAs en plasma de pacientes con EW que sirvan como biomarcadores pronóstico de la progresión de la enfermedad:

1. Detección de miRNAs diferencialmente representados en plasma de pacientes con EW mediante miRNA-seq.
2. Análisis *in silico* para explorar procesos biológicos que regulan los miRNAs identificados y su relación con la fisiopatología de la EW.
3. Validación del perfil de miRNAs en plasma mediante qPCR y correlación de la expresión con signos clínicos.



## Resultados

### 1. Características de las poblaciones de estudio

La serie clínica investigada está formada por 41 muestras de plasma de pacientes con la EW pertenecientes a dos cohortes distintas: una primera cohorte de investigación (21 pacientes) procedente del Hospital U. i P. La Fe de Valencia y del Hospital Gral. U. d'Elx, y una segunda cohorte de validación (20 pacientes) procedente del Complejo Hospitalario Insular Materno Infantil de Gran Canaria. En una primera aproximación, los análisis se realizaron en la primera cohorte de investigación empleando la técnica de secuenciación masiva de miRNAs (miRNA-seq). En una segunda fase y con el propósito de analizar la solidez de los mismos, se empleó qPCR, como método alternativo para confirmar los hallazgos obtenidos tanto en la primera cohorte, como en la segunda cohorte de validación. En la Tabla R2.1 se indican las características demográficas y clínicas de los dos grupos de pacientes estudiados; para cada ítem, se indica el valor absoluto o la media  $\pm$  desviación típica y el rango entre paréntesis, según corresponda.

**Tabla R2.1: Características clínicas y demográficas de los grupos de pacientes.**

	1ª Cohorte Investigación	2ª Cohorte Validación	p valor
<b>N</b>	20	21	
<b>Datos demográficos<sup>§</sup></b>			
Mujeres	11	10	
Hombres	9	11	
Edad	36,20 $\pm$ 9,10 (21-56)	43,30 $\pm$ 15,23 (15-70)	ns
Años desde diagnóstico	18,45 $\pm$ 9,27	27,25 $\pm$ 10,28	**
<b>Perfil al diagnóstico</b>			
Edad diagnóstico (años)	16 $\pm$ 12,40 (2-48)	15,60 $\pm$ 9,94 (6-38)	ns
Hepático	10	9	
Neurológico	4	7	
Mixto	2	-	
Asintomático	4	5	
<b>Parámetros clínicos<sup>§</sup></b>			
Colesterol (mg/dL)	178,60 $\pm$ 44,14	181,70 $\pm$ 31,22	ns
Triglicéridos (mg/dL)	129,70 $\pm$ 53,31	129,60 $\pm$ 62,94	ns
AST (U/L)	39,16 $\pm$ 25,25	32,32 $\pm$ 11,37	ns
ALT (U/L)	63,80 $\pm$ 74,92	45,80 $\pm$ 29,01	ns
GGT (U/L)	42,35 $\pm$ 24,38	43,90 $\pm$ 41,43	ns
Fosfatasa alcalina (U/L)	84,55 $\pm$ 35,64	93,95 $\pm$ 28,70	ns
Bilirrubina total (mg/dL)	0,66 $\pm$ 0,35	0,99 $\pm$ 0,81	ns
Riesgo de progresión hepática	8	-	

§: corresponden al momento de inclusión en el estudio; \*\*p-valor <0.01; ns: no significativo; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma-glutamil transferasa

Ambas cohortes están compuestas por un número similar de hombres y mujeres, con medias de edad entre los 35 y 45 años, siendo la media un poco más alta para la cohorte de validación. De hecho, para esta segunda cohorte, han transcurrido de media más años desde el diagnóstico, cuando para ambos grupos de pacientes las medias de edad de debut se sitúan en la adolescencia. Es importante destacar que en los dos grupos se incluyeron pacientes con inicio en edad avanzada, en cuarta e incluso quinta década.

Entre ambas cohortes, hay una cierta similitud en la representación de cuadros clínicos en el momento de inicio de la enfermedad. El número de pacientes con debut en enfermedad hepática supone el grupo más numeroso para ambas cohortes, seguido de los pacientes que manifestaron primero síntomas neurológicos. Llama la atención que en la cohorte de validación, estas cifras se aproximan (9 hepáticos y 7 neurológicos), mientras que en la cohorte de investigación se aprecia cierta desviación hacia los casos hepáticos (10 hepáticos y 4 neurológicos), lo que suele ser más habitual, un debut hepático. En cuanto a los cuadros mixtos, son muy pocos (2 pacientes) y sólo se describen en la primera cohorte. Por último, un total de 9 pacientes asintomáticos entre ambos grupos, se identificaron gracias a cribados genéticos en las familias una vez diagnosticado el probando.

Las determinaciones bioquímicas hechas en el momento de obtención de la muestra de plasma son bastante homogéneas si comparamos las dos cohortes. Se aprecia cierta diferencia en los valores medios de ALT que son más altos en la cohorte de investigación, aunque se incluyen en un rango de valores de mayor amplitud. Sea como sea, la comparativa entre ambos grupos de pacientes de estos valores bioquímicos no resultó significativa en ninguno de los casos.

Destaca que, en el seguimiento clínico de los pacientes incluidos en la primera cohorte de investigación, en ocho casos se registraron factores asociados a mayor riesgo de progresión de la enfermedad hepática. Los factores principalmente detectados han sido presencia de fibrosis avanzada mediante elastografía de transición (Fibroscan), presencia de esteatosis por ecografía, y elevación de ALT persistente, acompañado de niveles de triglicéridos superiores al valor de referencia.

Para la realización del estudio, se emplearon cohortes de población control independientes para cada una de las cohortes de pacientes. Para ambas, se dispuso de una colección de plasmas cedidas por el Biobanco para la Investigación Biomédica y en Salud Pública de la Comunidad Valenciana (IBSP-CV) de individuos control pareadas por edad y sexo con el grupo de pacientes. En la Tabla R2.2 se muestran las características demográficas de los grupos control. Para cada ítem, se indica el valor absoluto o la media  $\pm$  desviación típica y el rango entre paréntesis, según corresponda.

De éstos no dispusimos de analíticas bioquímicas, tan sólo de sexo, edad e IMC (índice de masa corporal).

**Tabla R2.2: Características demográficas de los grupos de individuos control.**

	Controles 1ª cohorte	Controles 2ª cohorte	p valor
N	20	21	
Mujeres	11	10	
Hombres	9	11	
Edad estudio (años)	35,60 ± 8,33 (20-56)	43,14 ± 15,28 (15-70)	ns
IMC	24,13 ± 3,75	26,44 ± 3,50	ns

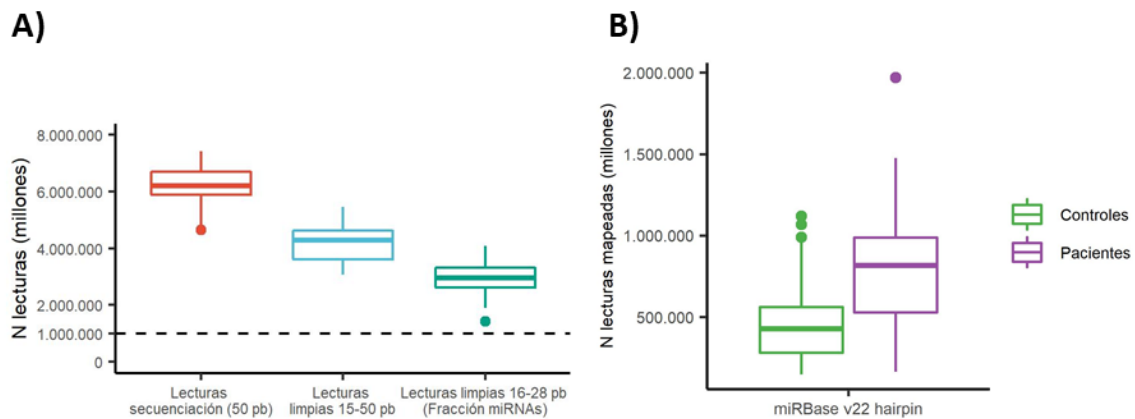
IMC: índice de masa corporal

## 2. Determinación de miRNAs circulantes en plasma mediante miRNA-seq

La primera aproximación realizada consistió en el análisis mediante miRNA-seq aislados de plasma de 20 pacientes con la EW pertenecientes a la primera cohorte de investigación, pareados con 20 individuos sanos por sexo y edad. De esta forma, fue posible realizar un amplio cribado de miRNAs circulantes en plasma, para mediante análisis comparativo, determinar miRNAs diferencialmente representados que caractericen al grupo de pacientes.

### 2.1 Análisis primario

En primer lugar, se comprobó que la cantidad y calidad de lecturas obtenidas (*reads*) en la secuenciación miRNA-seq y su procesamiento eran adecuados para llevar a cabo el análisis de representación diferencial. Como se observa en la Figura R2.1A, en cada una de las 40 muestras secuenciadas se obtuvieron entre 4-8 millones de lecturas brutas, que se redujeron a entre 4-6 millones tras eliminar adaptadores de librería y descartar lecturas de tamaño inferior a 15 pb. De éstas, entre 2-4 millones por muestra se correspondían a lecturas de la fracción de miRNAs maduros (tamaño 16-28 pb). Dichas lecturas se seleccionaron para ser alineadas frente a secuencias de miRNAs precursores (*hairpin*) anotadas en la miRBase versión 22. Para el análisis de representación diferencial, se obtuvieron los conteos de secuencias mapeadas en las coordenadas determinadas en los brazos 5p y 3p de cada precursor que corresponden al miRNA maduro. Proporcionalmente, el número de lecturas mapeadas correspondientes a secuencias de miRNAs maduros fue superior en el grupo de pacientes frente a controles, lo cual es representativo del estado fisiológico que diferencia ambos grupos (Figura R2.1B).



**Figura R2.1: Control del procesamiento de lecturas obtenidas mediante miRNA-seq en las 40 muestras de la primera cohorte de investigación. A)** Distribución de lecturas brutas y tras quitar adaptadores y seleccionar por tamaño. **B)** Distribución de lecturas de tamaño entre 16-28 pb alineadas frente a las regiones 5p y 3p de miRNAs precursores (*hairpin*) anotados en la base de datos miRBase versión 22. Los diagramas de cajas representan el rango intercuartílico del número (N) de lecturas de las muestras.

## 2.2 Análisis de representación diferencial

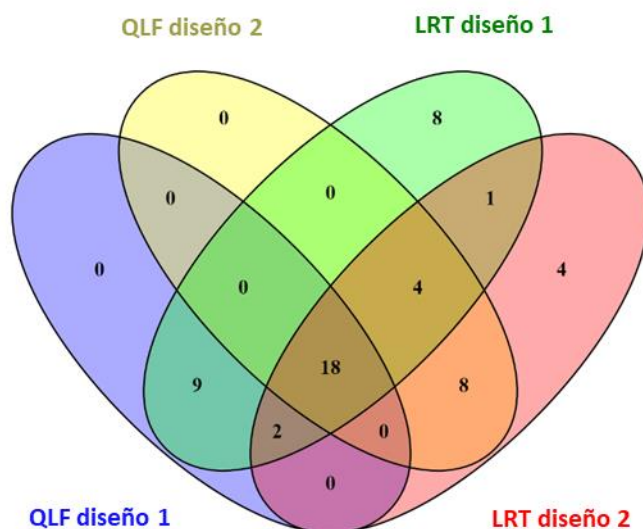
Como paso previo a la realización del análisis de representación diferencial, fue necesario preparar los datos de conteos de miRNAs maduros obtenidos llevando a cabo una etapa de filtrado y posterior normalización entre muestras. Para un total de 2650 miRNAs maduros, se asignó al menos un conteo en una de las 40 muestras estudiadas. En el paso de filtrado se eliminaron miRNAs con baja representación, lo que redujo el número de miRNAs maduros a considerar a 2158.

Para el análisis de representación diferencial se siguieron dos diseños experimentales distintos. En el diseño 1 se realizó un análisis comparativo entre ambos grupos sin tener en cuenta otras covariables, mientras que en el diseño 2 se incluyeron las covariables “sexo” y “edad” como factor bloque para controlar la variabilidad aportada por estos dos parámetros. Para ello, se aplicaron los métodos QLF (*Quasi-Likelihood F Test*) y LRT (*Likelihood Ratio Test*), que forman parte del paquete de análisis edgeR y que permiten incluir covariables experimentales.

En la Figura R2.2 se representa la concordancia de miRNAs maduros detectados como significativamente desregulados en muestras de plasma de pacientes, al aplicar los métodos de análisis QLF y LRT en ambos diseños experimentales. Teniendo en cuenta una FDR (*False Discovery Rate*) inferior al 5 %, el método LRT identificó 42 y 37 miRNAs diferencialmente representados entre los diseños 1 y 2, respectivamente. En contraste, el



método QLF reveló 29 miRNAs desregulados en el diseño 1 y 30 miRNAs en el diseño 2, todos ellos también detectados por el método LRT.



**Figura R2.2: Concordancia de miRNAs maduros detectados en muestras de plasma de pacientes entre las cuatro estrategias de análisis de representación diferencial. Se identifican como desregulados significativamente aquellos miRNAs con FDR <0,05.**

En la puesta en común de los resultados obtenidos, destaca la presencia de un grupo de 18 miRNAs detectados por las cuatro estrategias de análisis aplicadas (Figura R2.2). Esto indica que las diferencias detectadas en ellos no dependerían de las covariables “edad” y “sexo”. Por tanto, siguiendo criterios de robustez del análisis y control de la proporción esperada de falsos positivos, para continuar con el estudio se seleccionaron estos 18 miRNAs. Como se puede observar en la Tabla R2.3, los 18 miRNAs presentan un valor de logFC positivo, es decir, se encontrarían sobrerrepresentados en muestra de plasma de pacientes EW con respecto a controles.

**Tabla R2.3: miRNAs maduros significativamente desregulados en plasma de pacientes mediante el método QLF en los diseños 1 y 2.**

	QLF <i>diseño 1</i>			QLF <i>diseño 2</i>		
	logFC	p valor <sup>§</sup>	FDR	logFC	p valor <sup>§</sup>	FDR
<b>hsa-miR-122-5p</b>	3,38	1,02E-08	1,23E-05	2,77	2,39E-06	1,72E-03
<b>hsa-miR-122b-3p</b>	3,38	1,14E-08	1,23E-05	2,77	3,44E-06	1,86E-03
<b>hsa-miR-193b-5p</b>	2,64	1,76E-07	1,27E-04	1,92	1,83E-07	1,97E-04
<b>hsa-miR-885-3p</b>	3,23	2,38E-07	1,28E-04	2,67	7,91E-06	2,42E-03
<b>hsa-miR-125b-5p</b>	1,33	1,53E-06	5,50E-04	1,07	1,02E-04	1,57E-02
<b>hsa-miR-192-5p</b>	1,76	2,14E-06	6,59E-04	1,33	6,47E-05	1,16E-02
<b>hsa-miR-200b-3p</b>	1,31	3,54E-06	9,56E-04	1,18	8,96E-06	2,42E-03
<b>hsa-miR-885-5p</b>	2,47	4,81E-06	1,15E-03	2,17	1,50E-04	1,94E-02
<b>hsa-miR-200a-3p</b>	1,33	6,84E-06	1,48E-03	1,11	1,53E-04	1,94E-02
<b>hsa-miR-455-5p</b>	2,02	1,08E-05	2,11E-03	1,76	8,42E-06	2,42E-03
<b>hsa-miR-99a-5p</b>	1,31	1,45E-05	2,38E-03	1,05	3,50E-04	2,90E-02
<b>hsa-miR-122b-5p</b>	2,23	1,54E-05	2,38E-03	2,09	2,22E-04	2,28E-02
<b>hsa-miR-193a-5p</b>	1,42	2,69E-05	3,77E-03	1,11	3,36E-04	2,90E-02
<b>hsa-miR-30a-5p</b>	1,17	2,79E-05	3,77E-03	1,00	2,49E-04	2,34E-02
<b>hsa-miR-485-3p</b>	1,96	4,13E-05	5,24E-03	1,76	1,79E-08	3,86E-05
<b>hsa-miR-511-5p</b>	1,09	4,86E-05	5,52E-03	0,97	2,09E-04	2,25E-02
<b>hsa-miR-340-3p</b>	1,43	1,05E-04	1,08E-02	1,44	4,81E-06	2,07E-03
<b>hsa-miR-23b-3p</b>	1,18	3,68E-04	3,46E-02	1,10	1,91E-04	2,17E-02

§: p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg; FDR: *False Discovery Rate* (proporción esperada de errores tipo I o falsos positivos); logFC: logaritmo *Fold Change*

### 2.3 Caracterización mediante enriquecimiento funcional

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para conocer en qué rutas de señalización y otros procesos biológicos estarían implicados los 18 miRNAs desregulados detectados en plasma de pacientes. Para ello, en primer lugar se utilizó la herramienta mirPath, empleando el algoritmo microT-CDS para la predicción de interacciones miRNA-gen. En paralelo, se realizó un análisis equivalente con la herramienta miRWalk, con el algoritmo TargetScan para la predicción de genes diana.

Con un p valor ajustado <0,05, la herramienta mirPath identificó un total de 60 rutas de señalización y/o procesos biológicos anotados en la base de datos KEGG. A partir de este listado, se seleccionaron aquellos relevantes en procesos de daño hepático, de los cuales se comprobó si también habían sido detectados en el análisis con miRWalk como método de validación (Tabla R2.4). Entre ellos, destacan procesos implicados en regeneración hepática (vías de señalización de ErbB, Hippo, mTOR, Wnt y uniones adherentes entre células) y fibrosis (N-glicosilación de proteínas, adhesiones focales entre células, vías de

señalización TGF- $\beta$ , FoxO, HIF-1 y AMPK), además de otros característicos de NAFLD (síntesis de esfingolípidos y vía de señalización de la insulina).

**Tabla R2.4: Rutas de señalización y otros procesos biológicos de interés significativamente desregulados por los 18 miRNAs sobrerrepresentados en el grupo de pacientes de la primera cohorte de investigación.**

Ruta KEGG	mirPath (microT-CDS)		miRWalk (TargetScan)	
	P valor <sup>§</sup>	N genes	P valor <sup>§</sup>	N genes
Vía de señalización ErbB	<1,00E-04	67	<1,00E-04	16
Uniones adherentes	<1,00E-04	54	4,70E-03	11
Vía de señalización Hippo	1,33E-03	76	2,63E-02	15
Vía de señalización mTOR	5,82E-03	38	7,60E-03	17
Vía de señalización Wnt	3,72E-02	75	<1,00E-04	23
Vía de señalización de esfingolípidos	2,75E-04	68	3,00E-02	11
Vía de señalización de la insulina	2,22E-02	76	1,10E-03	19
Biosíntesis N-glicanos	4,63E-03	25	6,22E-02	24
Vía de señalización TGF- $\beta$	1,30E-03	45	3,87E-02	10
Vía de señalización FoxO	5,35E-04	79	4,30E-03	16
Vía de señalización HIF-1	3,48E-03	63	1,17E-02	13
Adhesión focal	1,86E-03	114	8,30E-03	20
Vía de señalización AMPK	8,55E-03	70	<1,00E-04	19

§: p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg; N: número

### 3. Perfil de miRNAs circulantes candidatos en plasma como biomarcadores

Del listado de 18 miRNAs circulantes con mayor presencia en muestras de plasma de pacientes, que potencialmente estarían implicados en la regulación de procesos relacionados con enfermedad hepática, se escogieron una serie de miRNAs para analizar su expresión mediante qPCR con el fin de determinar su validez como posibles biomarcadores en plasma. Para ello, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- Valor de log(FC) en el análisis de representación diferencial superior a 1,4 en ambos diseños experimentales (Tabla R2.3).
- En la bibliografía, se ha descrito su relación con enfermedad hepática y/o metabolismo de metales.

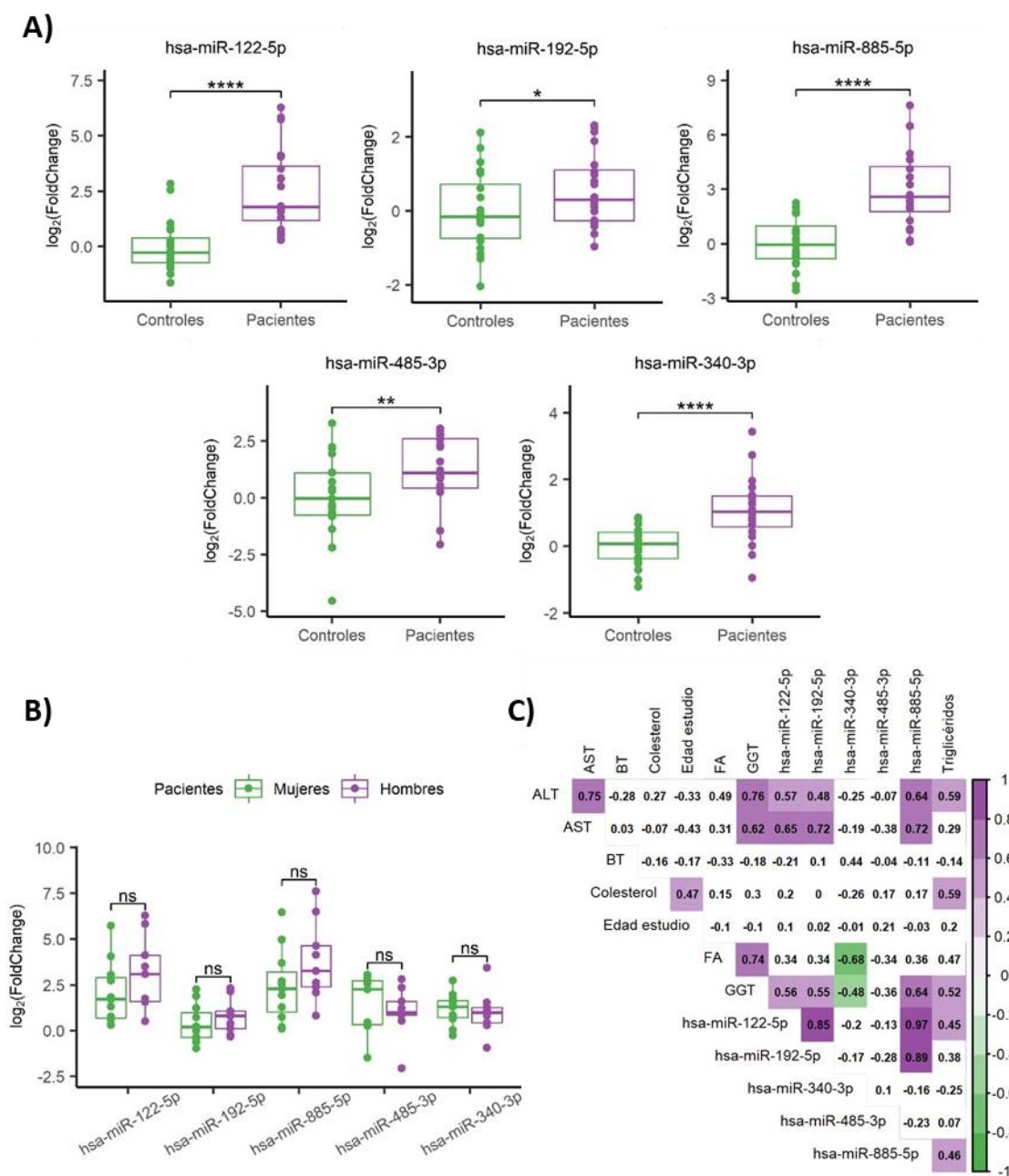
Atendiendo a estos criterios, se seleccionaron para validación por qPCR siete miRNAs: miR-122-5p, miR-193b-5p, miR-885-5p y 3p, miR-455-5p, miR-485-5p y miR-340-3p. A esta selección se añadió miR-192-5p, ya que si bien sólo presenta un valor de log(FC) superior a 1,4 en el análisis del diseño 1, ha sido ampliamente descrito en la bibliografía como marcador de daño hepático. Por otra parte, no se seleccionaron miR-122b-5p y 3p ya que pertenecen a la misma familia que miR-122-5p, y esta isoforma ha sido la más estudiada en el contexto de enfermedad hepática.

### 3.1 Primera cohorte de investigación

Se analizaron los niveles en plasma de los miRNAs seleccionados mediante qPCR en el grupo de pacientes (N=20) y de controles (N=20) de la primera cohorte de investigación, con el propósito de confirmar que las diferencias detectadas por miRNA-seq se ratificaban con esta estrategia alternativa. Para ello, se utilizó la misma muestra de miRNAs aislados de plasma empleada en la obtención de librerías para miRNA-seq. Finalmente, de los ocho miRNAs seleccionados, sólo cinco pudieron ser analizados correctamente en todas las muestras mediante qPCR. Ello se debió a que para miR-193b-5p, miR-455-5p y miR-885-3p, no fue posible detectar su amplificación, al ser la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida indistinguible de la reacción sin miRNA molde (control negativo de la qPCR).

Como se observa en la Figura R2.3A, los niveles de expresión relativa de miR-122-5p, miR-192-5p, miR-885-5p, miR-485-3p y miR-340-3p fueron significativamente superiores en el grupo de pacientes con respecto al de controles. Es especialmente llamativa la significatividad lograda para miR-122-5p y miR-885-5p, asociados con enfermedad hepática, y miR-340-3p (Figura R2.3A). miR-485-3p participa en el metabolismo del hierro; y miR-340-3p juega un papel en el metabolismo de lípidos y en la ruta de la insulina. Estos resultados confirmaron los obtenidos con la primera aproximación experimental (miRNA-seq), y por tanto, se puede concluir que hay una expresión incrementada para los miRNAs miR-122-5p, miR-192-5p, miR-885-5p, miR-485-3p y miR-340-3p en el grupo de pacientes de la cohorte de investigación comparado con el grupo correspondiente de individuos sanos.

En el marco de una perspectiva de género, se analizó si existía diferencias de expresión relativa para los cinco miRNAs amplificados mediante qPCR entre pacientes con diferente sexo, viéndose que no la había (Figura R2.3B). Tampoco se detectó influencia alguna de la edad en los resultados (Figura R2.3C). Consecuentemente, en esta primera cohorte, no se aprecia relación entre los niveles en plasma de los miRNAs seleccionados, el género y la edad.



**Figura R2.3: Validación del perfil de miRNAs circulantes en plasma mediante PCR cuantitativa (qPCR) en muestras de la primera cohorte de investigación. A)** Análisis comparativo entre grupos de los niveles en plasma de miR-122-5p, miR-192-5p, miR-885-5p, miR-485-3p y miR-340-3p. Para cada miRNA, se representa el rango intercuartílico del  $\log_2$  de la expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de las muestras de cada grupo. **B)** Análisis comparativo de los niveles de expresión relativa de los cinco miRNAs mostrados en el apartado A) entre mujeres y hombres del grupo de pacientes. **C)** Matriz de correlación entre parámetros bioquímicos, edad y niveles de expresión de los cinco miRNAs mostrados en el apartado A) en el grupo de pacientes. En cada casilla, se indica el valor del coeficiente  $\rho$  de Spearman ( $R_s$ ) para cada pareja de variables. Las casillas moradas y verdes indican correlación significativa ( $p$  valor  $<0,05$ ) de signo positivo y negativo, respectivamente. \*\*\*\* $P$  valor  $<0,0001$ ; \*\* $P$  valor  $<0,01$ ; \* $P$  valor  $<0,05$ ; ns: no significativo; FA: fosfatasa alcalina; BT: bilirrubina total; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma-glutamyl transferasa.

Mediante análisis de correlación, se investigó si existía una relación entre los niveles de expresión relativa de estos cinco miRNAs seleccionados tras el análisis por qPCR y los analitos bioquímicos con el fin de valorar su posible utilidad como biomarcador de la progresión de la enfermedad (Figura R2.3C). Se detectó correlación positiva y significativa ( $p$  valor  $<0,05$ ) entre valores de actividad de ALT, AST, GGT y los miRNAs miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p, que están los tres relacionados con enfermedades hepáticas. De entre estos hallazgos, llama la atención AST con valores de  $R_s$  superiores a 0,60 en todos los casos. Valores altos de ALT, AST y/o GGT se asocian con hígado dañado por diferentes causas (hepatitis, cirrosis, etc). En conclusión, se observa una correlación directa positiva entre los miRNAs miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p con las enzimas hepáticas ALT, AST y GGT.

Adicionalmente, para miR-885-5p se observó una correlación positiva con los niveles de triglicéridos. Un aumento de triglicéridos en las células hepáticas se podría relacionar con enfermedad del hígado graso que suele ir acompañada de valores altos de colesterol. El miR-885-5p no parece presentar correlación con el colesterol en este análisis.

En cuanto a los miRNAs miR-485-5p y miR-340-3p, no se identificó ninguna correlación con los analitos estudiados, excepto para la actividad de las enzimas FA y GGT que mostraron una asociación negativa significativa con el miR-340-3p. Valores altos concomitantes de GGT y FA se asocian con enfermedad del tracto biliar, y la bilis generada en el hígado, se encarga de ayudar a la digestión y descomponer las grasas en ácidos grasos. Los resultados obtenidos podrían indicar relación entre este miRNA implicado en el metabolismo de lípidos y afectación del tracto biliar. En este sentido, se debe destacar la ausencia de correlación significativa con el colesterol si bien marca una tendencia negativa. De hecho, el colesterol no presentó ninguna correlación significativa con ninguno de los miRNAs investigados ni tampoco la BT.

Para finalizar, es relevante señalar que entre los miRNAs, se detectó una alta correlación ( $R_s > 0,80$ ) para los niveles de expresión relativa de miRNAs relacionados con daño hepático miR-122-5p, miR-192-5p, y miR-885-5p. Con respecto a los restantes dos miRNAs, miR-485-5p y miR-340-3p, no se observó ninguna correlación ni entre ellos ni con los tres anteriormente mencionados. Son esperables en cierta medida estas relaciones ya que miR-485-5p y miR-340-3p participan en rutas metabólicas diferentes (metabolismo del hierro y de lípidos/insulina, respectivamente).

Tras validar la mayor presencia de miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p en plasma de pacientes, se evaluó su posible utilidad para predecir el riesgo de progresión de enfermedad hepática. Como se mencionó en la descripción de las características de la población de estudio, en el seguimiento clínico de los pacientes de la primera cohorte de

investigación, en ocho casos se registraron factores que podrían contribuir a la progresión de la enfermedad hepática. Para ello, se llevó a cabo un estudio de regresión logística, en el que se usaron como variables predictoras los niveles en plasma detectados por qPCR para miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p en los pacientes de la primera cohorte de investigación. Uno de los supuestos que ha de cumplir un modelo de regresión logística es que no debe existir colinealidad entre las variables predictoras. Esto hace inviable obtener un modelo conjunto con los tres miRNAs, debido a la fuerte correlación que se detectó entre sus niveles de expresión relativa en los pacientes de la primera cohorte de investigación (Figura R2.3C). Por tanto, se generaron modelos de regresión logística simple con cada uno de ellos.

En la Tabla R2.5 se resumen los parámetros del modelo generado con cada miRNA. En los tres modelos, los coeficientes de regresión de la variable predictora (nivel de expresión relativa del miRNA) son positivos y significativos ( $p$  valor  $<0,05$ ). Expresados estos coeficientes en término de *odds ratio*, los intervalos de confianza asociados son superiores a 1. Todo ello indica que, conforme incrementan los niveles en plasma de estos miRNAs, también aumenta de forma significativa la probabilidad de pertenecer al grupo de riesgo de progresión.

**Tabla R2.5: Parámetros de los modelos de regresión logística para predecir el riesgo de progresión hepática.**

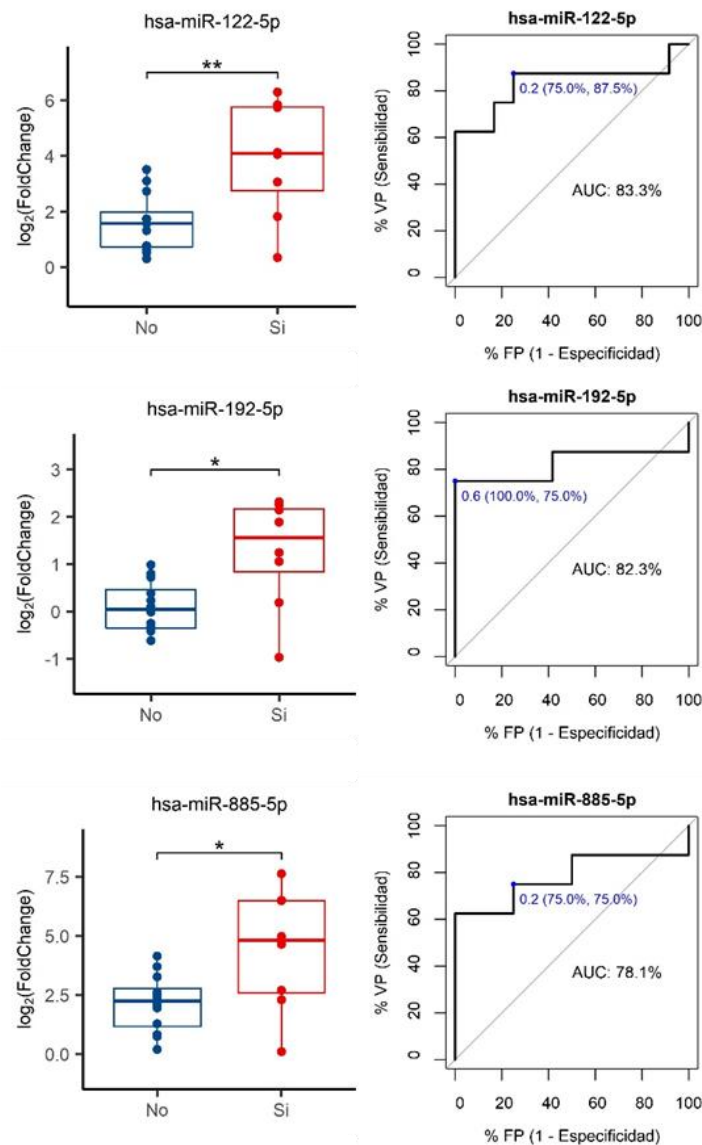
	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-885-5p
<b>Coefficiente de regresión</b>	0,92	1,57	0,67
<b>P valor</b>	0,025	0,026	0,040
<b>Odds ratio</b>	2,50	4,83	1,94
<b>Odds ratio IC 95%</b>	1,29-6,92	1,50-27,97	1,14-4,34
<b>AIC</b>	22,52	23,32	24,61

IC: Intervalo de confianza; AIC: *Akaike Information Criterion* (Criterio de información de Akaike)

A continuación, se evaluó el rendimiento de cada modelo para predecir el riesgo de progresión hepática. Como se observa en la Figura R2.4, los modelos generados clasificarían correctamente al presentar un valor de AUC en torno al 80 % en los tres casos. Atendiendo a las diferencias de expresión relativa de cada miRNA entre pacientes con y sin factores de riesgo, para miR-122-5p son más significativas, lo que coincide con que su modelo asociado presenta el mayor AUC de entre los tres (83,30 %). Con respecto a las probabilidades óptimas de clasificación, para miR-122-5p, con una probabilidad de pertenecer al grupo de riesgo del 20 %, se consigue una especificidad del 75 % y sensibilidad del 87,50 %, mientras que para miR-885-5p, con mismo valor de probabilidad, la

Capítulo II  
Resultados

sensibilidad es menor (75 %). En cuanto a miR-192-5p, la probabilidad óptima para clasificar a los pacientes es del 60 %, con la que se conseguiría una sensibilidad del 75 % y alta especificidad (100 %).



**Figura R2.4: Evaluación del rendimiento de los modelos de regresión logística simple para predecir el riesgo de progresión hepática.** Para cada modelo, se muestra el análisis comparativo de los niveles de expresión relativa del miRNA utilizado como predictor entre pacientes según si presentan o no factores de riesgo (izquierda) y el análisis de la curva ROC, en el que se indica la probabilidad óptima para clasificar a los pacientes, con su sensibilidad y especificidad asociadas (derecha). Intervalos de confianza del AUC: 60,40-100 % para miR-122-5p, 56,90-100 % para miR-192-5p y 52,10-100 % para miR-885-5p. \*\*P valor <0,01; \*P valor <0,05; VP: verdaderos positivos; FP: falsos positivos; AUC: *Area under the curve* (área bajo la curva).



### 3.2 Segunda cohorte de validación

En la segunda cohorte de validación, que como se ha indicado anteriormente, está formada por muestras procedentes de una serie independiente de pacientes (N=21) y controles (N=21), se replicó el estudio hecho en la primera cohorte de los cinco miRNAs mediante qPCR (Figura R2.5).

Como se muestra en la Figura R2.6A, de nuevo, se evidenciaron los niveles de expresión relativa de miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p significativamente superiores en el grupo de pacientes. De esta forma, los tres miRNAs asociados con enfermedad hepática se confirmaban con candidatos robustos a biomarcadores de la EW. Sin embargo, la expresión relativa de miR-485-3p y miR-340-3p fue significativamente inferior en éstos, cuando en el estudio de la cohorte de investigación los resultados mostraban un incremento de la expresión. Es llamativo que se obtenga resultados contradictorios en el caso de miR-485-3p y miR-340-3p, que necesariamente restan valor a la posible implicación de estos miRNAs en el proceso patológico de la EW.

Al igual que para la primera cohorte, se investigó la posible influencia de género y/o edad en la expresión de los miRNAs analizados. Tampoco en este caso se detectaron diferencias significativas de expresión para ninguno de los cinco miRNAs ni en función del sexo (Figura R2.5B) ni en función de la edad (Figura R2.5C). Junto con los datos obtenidos en la primera cohorte de investigación, se refuerza que ni género ni edad influyen en la desregulación de estos miRNAs en estos pacientes.

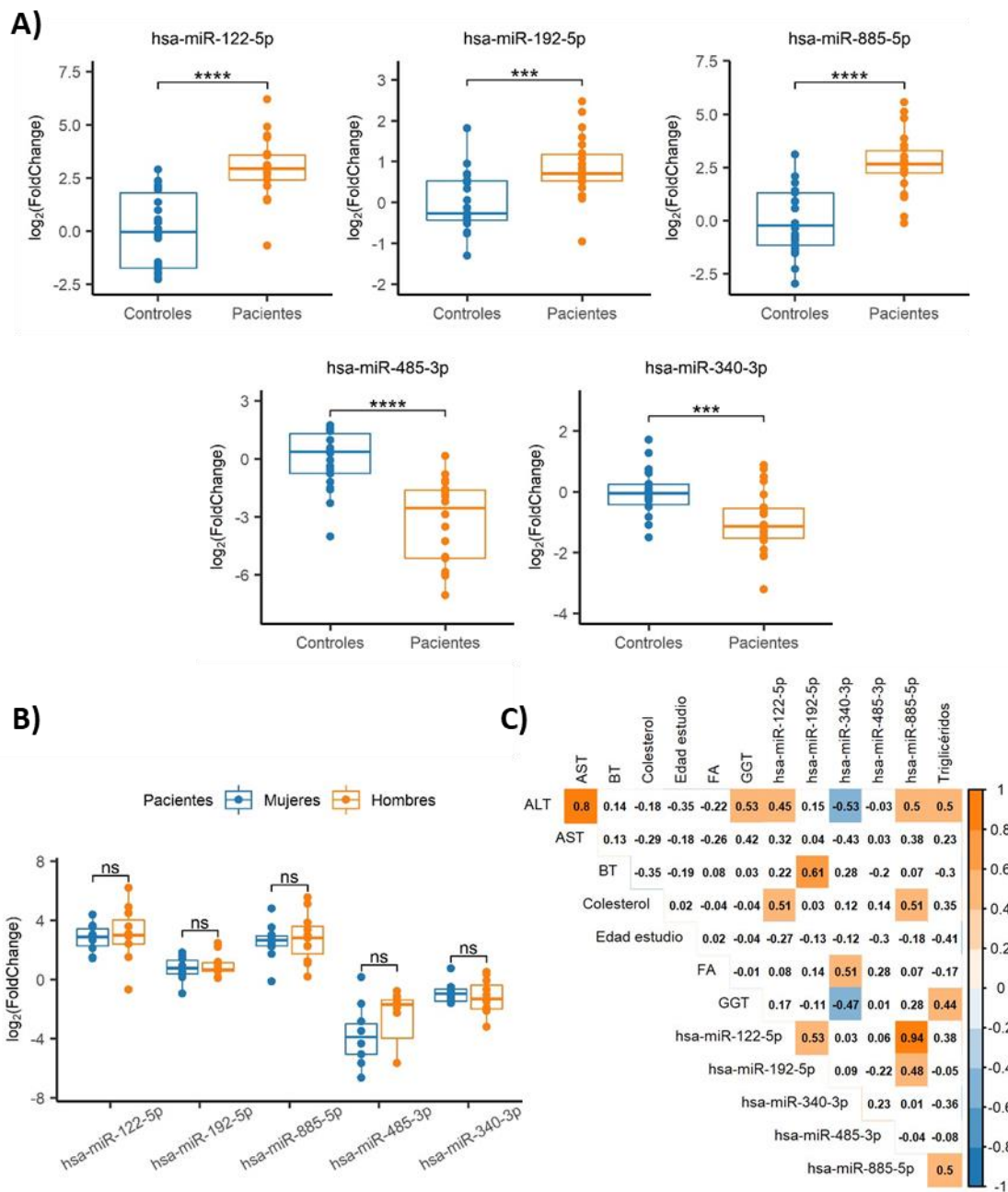
El análisis de correlación entre los miRNAs investigados y los analitos bioquímicos incluidos con el propósito de evaluar su papel como biomarcador de la progresión de la enfermedad (Figura R2.5C) mostró resultados un tanto dispares con respecto a los observados en la primera cohorte. Con ALT correlaciona positiva y significativamente los niveles en plasma de miR-122-5p y miR-885-5p, no así miR-192-5p, aunque los tres miRNAs correlacionan entre sí positivamente.

miR-885-5p correlaciona positiva y significativamente con los niveles de colesterol y triglicéridos. En la primera cohorte, esta última correlación ya se apreció, y con respecto al colesterol, la tendencia era positiva aunque no significativa. Se entendería un posible nexo entre la expresión del miR-885-5p y metabolismo de lípidos.

Por último, se detecta por primera vez asociación positiva significativa con BT para la expresión de miR-192-5p. La BT alta está implicada en necrosis y colestasis. Se abre con este resultado un nuevo analito a explorar que pudiera utilizarse para anticiparse a la evolución de la patología en combinación de miR-192-5p.

Tampoco en esta cohorte se logró establecer alguna relación de miR-485-5p con ninguno de los analitos incluidos, lo que apoyaría que éste no es un biomarcador útil para la progresión de la EW. Respecto a miR-340-3p, se halló una correlación significativamente inversa entre la expresión de miR-340-3p con la actividad de las enzimas ALT y GGT, así como positiva con la FA (Figura R2.5C). En la primera cohorte, miR-340-3p mostró una asociación negativa no significativa con ALT, y significativa con GGT. En ambos casos, la tendencia es la misma. Sin embargo, para FA, en la primera cohorte presentó una correlación negativa. Son resultados en parte contradictorios, que exigen la ampliación del estudio para poder llegar a una conclusión sólida que permita establecer las relaciones sugeridas entre miR-340-3p y afectación del tracto biliar.

De forma equivalente y tal como se ha comentado anteriormente, en los pacientes de la segunda cohorte de validación también se detectó correlación positiva y significativa de los niveles de expresión relativa de miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p entre sí. Este hallazgo refuerza el obtenido con la primera cohorte y que muestra la relación funcional de estos tres miRNAs entre sí. En cuanto a miR-485-5p y miR-340-3p, tampoco en esta cohorte se detectó ninguna correlación ni entre ellos ni con los tres anteriormente mencionados, lo que subraya que se trata de miRNAs implicados en diferentes rutas, como se ha comentado anteriormente.



**Figura R2.5: Validación del perfil de miRNAs circulantes en plasma mediante PCR cuantitativa (qPCR) en muestras de la segunda cohorte de validación. A)** Análisis comparativo entre grupos de los niveles en plasma de miR-122-5p, miR-192-5p, miR-885-5p, miR-485-3p y miR-340-3p. Para cada miRNA, se representa el rango intercuartílico del  $\log_2$  de la expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de las muestras de cada grupo. **B)** Análisis comparativo de los niveles de expresión relativa de los cinco miRNAs mostrados en el apartado A) entre mujeres y hombres del grupo de pacientes. **C)** Matriz de correlación entre parámetros bioquímicos, edad y niveles de expresión de los cinco miRNAs mostrados en el apartado A) en el grupo de pacientes. En cada casilla, se indica el valor del coeficiente  $\rho$  de Spearman ( $R_s$ ) para cada pareja de variables. Las casillas naranjas y azules indican correlación significativa ( $p$  valor  $< 0,05$ ) de signo positivo y negativo, respectivamente. \*\*\*\* $P$  valor  $< 0,0001$ , \*\*\* $P$  valor  $< 0,001$ ; ns: no significativo; FA: fosfatasa alcalina; BT: bilirrubina total; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma-glutamyl transferasa.



## Discusión

En pacientes con EW, un diagnóstico certero temprano acompañado de una terapia que impida la absorción de cobre o posibilite su eliminación son críticos para un mejor pronóstico. La EW es una enfermedad genética y como tal crónica. Pese al tratamiento que pudiera recibir y aun siendo éste efectivo, no se logra la curación completa. La terapia génica se contempla como la opción terapéutica definitiva para estos pacientes y otros con enfermedades Mendelianas. No podemos olvidar que éstas son causadas por mutaciones en un único gen. Actualmente, en España se comienza un ensayo clínico promovido por Vivets Therapeutics SAS basado en los trabajos realizados por la Dra. Gloria González-Aseguinolaza que proponen la expresión de *ATP7B* que supla la deficiencia del gen defectuoso (Murillo *et al.*, 2015). Existen otras iniciativas como la de Deep Genomics que va dirigida a pacientes portadores del cambio c.1934T>C (p.M645R), una mutación relativamente frecuente en nuestro país. Ésta conduce a la pérdida del exón 6 de *ATP7B*, de forma que la hibridación del oligonucleótido evita el *exon-skipping* (Merico *et al.*, 2020). Probablemente, la terapia génica sea una realidad para la EW en un futuro próximo.

Los pacientes actualmente suelen ser tratados con terapias quelantes o sales de zinc con el propósito de evitar el avance del proceso patológico y en la medida de lo posible, los daños irreversibles, principalmente neurológicos. Es una terapia de por vida, y en algunos pacientes es inevitable que exista riesgo de que progrese a pesar de él (Rodríguez *et al.*, 2012; Mariño *et al.*, 2020). Pero si el tratamiento es efectivo, la calidad de vida de los enfermos es buena con una esperanza de vida normal. En las enfermedades crónicas se observa con frecuencia falta de cumplimentación terapéutica y/o de adherencia. Esto suele ser la principal causa de deterioro y progresión de la patología, que puede desembocar en FHA (Maseñas *et al.*, 2019). En los pacientes con cuadros clínicos graves, la estrategia utilizada en clínica con el fin de curar la deficiencia metabólica subyacente, es el trasplante hepático, con un éxito de supervivencia del 87 % (Guillaud *et al.*, 2014). Incluso el trasplante de hígado se emplea como rescate terapéutico en formas graves neurológicas resistentes al tratamiento con quelantes (Poujois *et al.*, 2020). Si la clínica no es grave, como terapia de mantenimiento a largo plazo, se prefiere el uso de fórmulas basadas en sales de zinc, que previenen la absorción de cobre de la dieta. No obstante, en este tipo de tratamiento existe riesgo de empeoramiento o de falta de respuesta. Esto obliga a los pacientes a revisiones periódicas con el especialista de hepatología, para evaluar la eficacia y cumplimentación de la terapia (Członkowska *et al.*, 2018). En la monitorización del tratamiento, se controla que no haya descompensación en los parámetros bioquímicos asociados con la función hepática (principalmente AST y ALT) y que los niveles de NCC en suero sean bajos. La realidad es que no se dispone de biomarcadores fiables para la EW.

Hasta la fecha se han desarrollado estudios empleando ceruloplasmina, cobre hepático o cobre en orina 24 horas, como marcadores pronósticos con resultados poco convincentes (Hahn, 2014; Ryan *et al.*, 2019). La identificación de biomarcadores que nos permita mejorar el diagnóstico y anticiparnos a la evolución de la enfermedad es crucial para mejorar la terapia de estos enfermos, y también, para en el marco de ensayos clínicos, monitorizar la efectividad de nuevos medicamentos huérfanos y de terapias génicas (Gupta, 2014). Disponer de biomarcadores robustos es un reto al que responder en la biomedicina actual tanto para la EW como para tantos otros trastornos. Es esencial contar con moléculas que nos indiquen cómo progresa el proceso patológico para evitar consecuencias lesivas irreparables.

En este trabajo se ha llevado a cabo la búsqueda de biomarcadores basados en el perfil en plasma de miRNAs circulantes. Estudios previos en cáncer, enfermedades frecuentes poligénicas, y raras monogénicas, han mostrado que éstos pueden resultar marcadores fiables (Hayes and Chayama, 2016; Seco-Cervera *et al.*, 2017; García-Giménez *et al.*, 2018; Szelenberger *et al.*, 2019). Para ello, se ha trabajado con dos cohortes de pacientes distintas, con características clínicas y demográficas similares entre sí: una primera cohorte de investigación, en la que se inició el estudio, y una segunda cohorte de validación, para tratar de confirmar los hallazgos obtenidos. Dado que no se tiene conocimiento hasta la fecha de un estudio similar en el contexto de la EW, se optó por la secuenciación masiva de small-RNAs como herramienta de búsqueda inicial, centrando el análisis en la fracción correspondiente a miRNAs maduros (entre 16 y 28 pb). A diferencia de otras estrategias de carácter dirigido, basadas en el análisis por qPCR de un panel de miRNAs maduros concretos previamente asociados a una condición, este método nos permitió investigar el total de miRNAs maduros anotados en humanos, recogidos en la versión más reciente de la miRBase (versión 22). Además, esta aproximación abre la posibilidad de reanalizar los datos en el futuro, con el fin de cuantificar nuevos miRNAs que actualmente no se conocen.

Los miRNAs están implicados en la regulación de múltiples procesos biológicos y rutas metabólicas, por lo que alteraciones de los niveles de miRNAs en plasma pueden reflejar el estado fisiopatológico del hígado. Mediante análisis de enriquecimiento funcional en rutas de señalización y otros procesos biológicos anotados en la base de datos KEGG, se observó que el perfil de 18 miRNAs sobrerrepresentados significativamente en plasma de pacientes EW de la primera cohorte se asocia con procesos de regeneración y fibrosis hepática. En relación con la EW, destacan la vía de señalización HIF-1 y la síntesis de esfingolípidos.

Por una parte, estudios recientes en un modelo de pez cebra deficiente para *atp7b* identifican la vía de señalización HIF-1 como posible opción terapéutica. En concreto, observan que su activación contribuye a disminuir la acumulación de cobre y con ello la

esteatosis hepática cuando tratan con FG-4592 y DMOG, compuestos quimioterapéuticos que favorecen la estabilización del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  al inhibir a las prolil-hidroxilasas que lo degradan (Mi *et al.*, 2020). Por otra parte, alteraciones en la síntesis de esfingolípidos que causan acumulación de esfingomiélinina en el hígado son características en la evolución de NAFLD desde esteatosis simple a estadios más avanzados, con manifestaciones de fibrosis e inflamación (Simon *et al.*, 2019). En relación a la EW, el estudio llevado a cabo por Lang y colaboradores (2007) en el modelo de rata LEC, mostró que la acumulación de cobre en el hepatocito activa la síntesis de ceramidas, lo que desencadena el proceso de apoptosis mediado por este lípido. Las ceramidas se sintetizan a partir de la hidrólisis de la esfingomiélinina, reacción catalizada por la esfingomiélinasa ácida (Asm), por lo que el tratamiento con un inhibidor de esta enzima (amitriptilina) causó un efecto protector en las ratas, bloqueando el desarrollo de fibrosis y consiguiente fallo hepático. En su conjunto, estos dos estudios son ejemplos de procesos biológicos implicados en la fisiopatología de la EW, que podrían estar regulados por los miRNAs identificados. Es relevante conocer el papel que juegan en ellos para corroborar si puedan ser utilizados como biomarcadores o incluso como dianas terapéuticas.

Debido a que los miRNAs en circulación son menos abundantes que en las células o tejidos de origen, para su identificación en fluidos biológicos se requiere emplear métodos altamente sensibles, que permitan detectar moléculas de muy baja representación. Del perfil de 18 miRNAs circulantes con mayor presencia en muestras de plasma de pacientes de la primera cohorte identificados mediante miRNA-seq, se seleccionaron ocho miRNAs de interés para validación mediante qPCR en las mismas muestras: miR-485-3p, miR-340-3p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-885-5p, miR-193b-5p, miR-455-5p y miR-885-3p. Con los tres últimos miRNAs no se continuó el estudio, debido a que técnicamente no se logró su validación. Es posible que se trate de miRNAs de muy baja representación en plasma, por lo que las condiciones optimizadas para la obtención de librerías de small-RNA pudo favorecer su detección mediante secuenciación masiva.

***miRNAs sobrerrepresentados con expresión disminuida: miR-485-3p y miR-340-3p***

Los miRNAs miR-485-3p y miR-340-3p se detectaron significativamente sobrerrepresentados en plasma de pacientes de la primera cohorte, sin embargo, su expresión relativa resultó disminuida al investigar la cohorte de validación mediante qPCR. No se observó relación alguna entre sí ni con los tres miRNAs restantes que mostraron variaciones de sus niveles en plasma entre pacientes y controles (miR-122-5p, miR-192-5p, y miR-885-5p). En cierto modo, este resultado es esperable porque participan en funciones dispares.

Variaciones en los niveles de expresión de **miR-485-3p** se han asociado con diferentes tipos de cáncer, glioblastoma (Wang *et al.*, 2017), cáncer colorrectal (Taherdangkoo *et al.*, 2020), o cáncer de mama (Lou *et al.*, 2016). Pero también se vincula éste con una enfermedad autoinmune, el lupus eritematoso discoide: la sobreexpresión de miR-485-3p contribuye a la inflamación dérmica de las lesiones propias del lupus al regular la producción de mediadores de la inflamación (Solé *et al.*, 2019). El miR-485-3p está implicado en la regulación de la homeostasis del hierro, al modular post-transcripcionalmente junto a la hepcidina la expresión del transportador de membrana ferroportina (FPN), que se encarga de exportar el hierro a la circulación desde las células que lo expresan (enterocitos, macrófagos y hepatocitos) (Sangokoya *et al.*, 2013; Sangkhae and Nemeth, 2017).

Varios estudios sugieren que en la EW el metabolismo del hierro podría estar dañado y que en tejido hepático y/o cerebral se podría acumular hierro, y por tanto, empeorar el curso de la enfermedad (Pfeiffenberger *et al.*, 2012; Litwin *et al.*, 2013; Dusek *et al.*, 2017; Medici and Weiss, 2017). En un estudio en el que aplican un tratamiento con un agente quelante (BPS, disulfonato de batofenantrolina) en la línea celular de origen hepático HepG2, se reporta que la expresión de FPN disminuye como mecanismo para mantener los niveles de hierro intracelulares (Di Bella *et al.*, 2017). En la EW, la deficiencia de Cp resulta en la alteración del transporte del hierro en la circulación, dificultando que éste sea transformado en su forma férrica ( $Fe^{+3}$ ), lo que impide que pueda ser asimilado por la FPN para su expulsión y transportado en la circulación por la transferrina (De Domenico *et al.*, 2007, Gromadzka *et al.*, 2020a). La implicación del metabolismo del hierro en la EW es tal que anomalías en éste podrían coadyuvar a la presencia de síntomas. Recientemente, se ha descrito que en la EW, cambios en el metabolismo del cobre van acompañados de cambios en el metabolismo del hierro (Gromadzka *et al.*, 2021). El tratamiento farmacológico que reciben los pacientes con EW reduce la acumulación de hierro, pero no rescata el fenotipo, de modo que esta anomalía podría participar en las manifestaciones neurológicas y psiquiátricas que estos pacientes pueden padecer. Es más, la variabilidad detectada en las manifestaciones entre mujeres y hombres podría explicarse al menos, en parte, por diferencias en el metabolismo del hierro (Gromadzka *et al.*, 2020a). Los pacientes de EW hombres muestran niveles séricos más altos de ferritina, hepcidina, hierro, hemoglobina y eritrocitos comparados con las mujeres. Incluso se hipotetiza que las mutaciones p.C282Y y p.H63D en el gen *HFE* (*homeostatic iron regulator*) causantes de hemocromatosis podrían ser modificadores del fenotipo clínico de la EW (Gromadzka *et al.*, 2020b). Pacientes con la EW que además son heterocigotos para HFE p.C282Y tienen un debut más temprano de la enfermedad, mientras que los hombres homocigotos para



HFE p.H63D y las mujeres heterocigotas para el mismo cambio muestran los primeros síntomas más tardes que aquéllos que no portan estos cambios en HFE.

En resumen, las diferencias observadas en la presentación del miR-485-3p son interesantes porque se podría esperar que influyera en la fisiopatología de la EW y que sufriera alteraciones según variaciones en el proceso patológico subyacente. Sin embargo, no tenemos resultados robustos que sustenten esta hipótesis porque la presentación ha resultado contraria según la cohorte estudiada: incrementado en plasma de pacientes en la cohorte de estudio y disminuido en los de la cohorte de validación. Además, no se detectó correlación alguna significativa con los analitos bioquímicos analizados. Sin embargo, no podemos descartar con total certeza al miR-485-3p como posible biomarcador de la EW, y por ello, sería interesante continuar los estudios sobre éste para llegar a entender las discrepancias observadas.

El **miR-340-3p** se ha descrito como un posible biomarcador de la longevidad en un estudio que emplea el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (Smith-Vikos *et al.*, 2016). En general, el miR-340 se ha asociado con diferentes tipos de cáncer ya que juega un papel crítico en el inicio y el progreso de tumores al accionar múltiples oncogenes regulando su apoptosis y su metástasis (Huang *et al.*, 2021).

El miR-340-3p estaría relacionado con el metabolismo de lípidos e insulina. El análisis de miRNAs circulantes en la respuesta lipídica postprandial en ratones, mostró un incremento significativo de los niveles de miR-340-3p en plasma dos horas después de la ingesta de grasas, asociando su expresión al intestino, lo que sugiere su participación en la asimilación de lípidos (Mantilla-Escalante *et al.*, 2019). Por otra parte, en estudios sobre obesidad y/o sobrepeso, se han reportado alteraciones en los niveles de miR-340-3p en plasma según si los pacientes ingieren alimentos con alto o bajo índice glicémico, asociándolo así con el metabolismo de la glucosa e insulina (Giardina *et al.*, 2019). De hecho, en mujeres gestantes con diabetes estacional, se ha establecido que el aumento de insulina y la reducción de glucosa son variaciones ligadas a la expresión reducida del miR-340 (Stirm *et al.*, 2018). En un trabajo reciente llevado a cabo por Wooton-Kee y colaboradores (2020), se evaluó la respuesta a la *Western diet*, rica en grasas, del modelo de ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup>. Se observó que la desregulación de receptores nucleares que regulan el metabolismo hepático como FXR, RXR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  y LRH-1, resulta en la activación de la ruta de señalización de AMPK, lo que ejerce un efecto protector al evitar el desarrollo de obesidad, esteatosis y resistencia a la insulina, factores característicos del síndrome metabólico (Godoy-Matos *et al.*, 2020).

Hay casos descritos de pacientes con la EW y diabetes u otros desórdenes endocrinos tales como hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, y enfermedad metabólica ósea (Kapoor *et*

*al.*, 2014). Recientemente se ha descrito un paciente con un cuadro complejo que incluía aceruloplasminemia, diabetes, anemia microcítica, obesidad y supuesta EW (no se identificaron mutaciones en *ATP7B*) (Ondrejkočová *et al.*, 2020). Es evidente que existe una conexión estrecha entre insulina y obesidad, pero no son rasgos frecuentes en la EW, cuando para otras disfunciones hepáticas, son norma como en NASH que es la manifestación hepática del síndrome metabólico y cursa con obesidad, resistencia a la insulina y dislipidemia (Yu *et al.*, 2013).

Al igual que sucede con miR-485-3p, no es descabellado pensar que miR-340-3p pudiera afectar a la evolución de la EW de alguna forma, dada su relación con el metabolismo de lípidos y la ruta de la insulina. Los hallazgos logrados discordantes entre ambas cohortes, aumentado en plasma de pacientes en la cohorte de investigación pero en menor nivel en los de la cohorte de validación, no resultan muy sólidos. Por otro lado, se detectaron asociación entre algunas enzimas hepáticas y el miR-340-3p, pero no resultaron convincentes porque eran variables según la cohorte estudiada. Se apreció una asociación con ALT y GGT, no siempre significativa, pero de igual tendencia en ambas cohortes. Sin embargo, la correlación con FA variaba según el grupo de pacientes: negativa para la cohorte de investigación, y positiva en la cohorte de validación. Nuevamente, es preciso ahondar en estos resultados para determinar la posible implicación del miR-340-3p en la patología y su posible correlación con los analitos bioquímicos.

***miRNAs sobrerrepresentados con expresión aumentada: miR-122-5p, mir-192-5p y miR-885-5p***

En este trabajo, se ha confirmado que miR-122-5p, miR-885-5p y mir-192-5p están incrementados significativamente en plasma de pacientes con EW; esta observación ha sido corroborada en ambas cohortes de estudio. Además, se ha detectado correlación entre ellos tres, lo que es esperable en tanto que se trata de miRNAs relacionados con función hepática. De hecho, recientemente se ha publicado que los pacientes con cirrosis presentan niveles bajos en suero de los tres miRNAs identificados en este estudio, miR-122-5p, miR-885-5p y mir-192-5p, además de miR-181b-5p, y miR-29a-5p, igualmente relacionados con otras patologías hepáticas (García García de Paredes *et al.*, 2021).

Se detectó correlación positiva entre cada uno de estos tres miRNAs con marcadores bioquímicos de daño hepático como ALT, AST y GGT en los pacientes. La correlación entre valores anómalos de las enzimas hepáticas y disfunción del hígado es esperable. Se ha establecido correlación positiva entre miR-122-5p y ALT/AST en ratas tratadas con acetaminofén para inducir DILI (*Drug-Induced Liver Injury*), concluyendo que el silenciamiento del miR-122-5p protege contra el daño consecuencia de la droga (Pei *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). En ocasiones los pacientes hepáticos muestran valores de

transaminasas dentro de la normalidad. En un estudio hecho con una cohorte de pacientes con hepatitis B y ALT persistentemente normal, se estableció una firma con nueve miRNAs que incluía los tres aquí detectados miR-122-5p, miR-885-5p y miR-192-5p, útiles para anticiparse a la progresión de la patología (Tan *et al.*, 2015).

El **miR-122** es un miRNA con una expresión notable en hígado y por ello, son muchos los trabajos en los que se evalúa su posible relación con patología hepática principalmente. Los niveles de miR-122 se han asociado con hepatitis (El-Diwany *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2019) y con hepatocarcinoma (Wei *et al.*, 2020), pero también con otras enfermedades como la retinopatía diabética (Pastukh *et al.*, 2019), o la enfermedad de Kawasaki que no cursa con afectación hepática, en la que el miR-122 muestra una representación alta en suero relacionada con la inflamación sistémica (Lv *et al.*, 2020). Recientemente, se ha sugerido que el miR-122-5p podría ser una diana terapéutica para el tratamiento del dolor neuropático al inhibir la expresión de *PKD4*, que incrementa su actividad al progresar el dolor neuropático (Wan *et al.*, 2021).

El **miR-885-5p** se asocia con hepatitis (El-Diwany *et al.*, 2015) y con hepatocarcinoma: se ha establecido que el miR-885-5p suprime la metástasis del carcinoma hepatocelular (Zhang *et al.*, 2016) y que es un buen marcador pronóstico eficaz para el cáncer hepático avanzado (Wang, 2020). Se ha reportado que el miR-885-5p puede estar desregulado en otros tipos de cáncer como en el osteosarcoma (Liu *et al.*, 2018) o en el pancreático (Hussein *et al.*, 2017). Asimismo, se ha descrito un incremento significativo en miR-885-5p en plasma de mujeres enfermas de fibrosis cística comparado con pacientes hombres (Mooney *et al.*, 2020).

Respecto al **miR-192-5p**, al igual que los otros dos miRNAs incluidos en esta sección, se asocia con hepatitis (Nielsen *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2020) y con hepatocarcinoma: en células madre cancerígenas está silenciado (Gu *et al.*, 2019) y su pérdida inicia una actividad incrementada de la glicólisis lo que a su vez favorece la malignidad de las células (Gu *et al.*, 2020). De hecho, en el cáncer hepático, el papel que juega el miR-192-5p junto con otros tres miRNAs (miR-7-5p, miR-145-5p, miR-203a-3p) es crucial porque todos ellos son diana de múltiples genes que participan en rutas de señalización oncogénica (Qiu *et al.*, 2019). Este miRNA, al igual que otros relacionados con función hepática, se incluye en el perfil de miRNAs a analizar como biomarcadores de diabetes (van de Bunt *et al.*, 2013). Curiosamente, en ratas se ha descrito que la inhibición del miR-192-5p reprime la apoptosis de células nerviosas y promueve la recuperación de la función nerviosa al aumentar la expresión de factores de reparación alterados por la lesión del nervio periférico (Liu *et al.*, 2020a).

Diferentes estudios en modelos animales han mostrado que la inhibición de miR-122 altera la expresión hepática de genes implicados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos, lo que se traduce en una reducción del colesterol en plasma (Krützfeldt *et al.*, 2005; Esau *et al.*, 2006). La acumulación de cobre causa la desregulación del metabolismo de lípidos y presencia de esteatosis en hígado, atributo característico de la EW desde su inicio. Dichas observaciones se corroboran tanto en el modelo de ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup> como en el de rata LEC, en los que además perduran durante toda la enfermedad (Huster, 2014). Hallazgos histológicos en pacientes con EW en diferentes estadios de enfermedad del hígado, comparten características propias de NAFLD inicial con esteatosis simple y de NASH, por la presencia de depósitos de lípidos, inflamación y alteraciones en la estructura de la mitocondria (Stättermayer *et al.*, 2015).

El exceso de cobre en el ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup> causa la desregulación de genes implicados en el metabolismo de lípidos y la síntesis de colesterol en el hígado, y va acompañado de menores niveles de lípidos en suero, concretamente colesterol total, triglicéridos, HDL (*High-Density Lipoprotein*) y VLDL (*Very Low-Density Lipoprotein*). Algunas de las proteínas desreguladas en hígado de ratón *Atp7b*<sup>-/-</sup> implicadas en metabolismo de lípidos son SREBP2, FAS y HMG-CoA (Huster *et al.*, 2007), codificadas por genes diana de miR-122-5p (Cheung *et al.*, 2008). De forma equivalente, en el modelo de rata LEC, se detectó un mayor incremento de triglicéridos y colesterol en hígado, que se correspondía con menores niveles circulantes en plasma de los mismos (Levy *et al.*, 2007). Hay pocos estudios que exploren el perfil lipídico en pacientes con EW en terapia quelante para comparar lo observado en los modelos animales. Seessle y colaboradores (2011) sólo registraron niveles de colesterol total disminuidos significativamente en pacientes con sintomatología hepática al debut en comparación con el resto de los fenotipos (neurológico, asintomático y mixto), y tras dos años de tratamiento, éstos eran comparables a los de la población sana.

El miR-885-5p pudiera participar en la regulación del metabolismo de lípidos junto al miR-122-5p. En un estudio finlandés, Raitoharju y colaboradores (2016) analizaron la asociación entre miRNAs circulantes en sangre periférica, hígado graso idiopático y el perfil lipídico en suero. En él, detectaron mayores niveles de miR-122-5p y miR-885-5p en individuos con hígado graso, que correlacionaban positivamente con el contenido en suero de LDL (*Low-Density Lipoprotein*) y VLDL en el caso de miR-122-5p, e inversamente con HDL y colesterol en el caso de miR-885-5p. Es importante destacar que si bien se observó una correlación directa positiva entre los miRNAs miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p, y las enzimas hepáticas ALT, AST y GGT, sólo el miR-885-5p mostraba correlación significativa con triglicéridos en pacientes de la primera cohorte de investigación, y con triglicéridos y colesterol total en la segunda cohorte de validación. Probablemente este efecto sea consecuencia del nexo existente entre miR-885-5p y el metabolismo de lípidos. La

ampliación del estudio del perfil lipídico y su comparación con los niveles de miR-122-5p y miR-885-5p en estos pacientes podría aportar más información acerca de su papel en la regulación del metabolismo de lípidos en el contexto de la EW.

La acumulación progresiva de cobre en el hígado causa daños en los hepatocitos y muerte celular por apoptosis. Ello da lugar a la aparición de otras manifestaciones fenotípicas características, que incluyen hepatitis y fibrosis (Scheiber *et al.*, 2017). Acorde con la progresión de la enfermedad, a nivel histológico aumenta la proliferación de células de Kupffer, macrófagos del hígado que regulan la respuesta inflamatoria e inmunitaria, así como de depósitos de colágeno (Johncilla and Mitchell, 2011). La fibrosis hepática es la acumulación de tejido cicatricial junto a otros componentes de la matriz extracelular, como las fibras de colágeno, en respuesta a un daño hepático de tipo crónico como consecuencia de la inflamación y muerte celular. El primer evento que tiene lugar en la fibrosis hepática como respuesta al daño es la activación de HSC (*Hepatic Stellate Cells*), que son las células encargadas de producir y secretar componentes de la matriz extracelular. En la enfermedad del hígado avanzada asociada a EW, el estrés oxidativo y daño celular debido al exceso de cobre promovería la activación de HSC (Scheiber *et al.*, 2017). Se ha descrito que tanto miR-122-5p como miR-192-5p participarían en la regulación de procesos fibrogénicos e inflamatorios, respectivamente. Por una parte, un estudio reciente en un modelo de ratón NAFLD inducido por una dieta rica en grasas y colesterol, reveló que miR-192-5p sería liberado del hígado contenido en exosomas y participaría en la activación de macrófagos e inducción de respuesta inflamatoria al inhibir la expresión de la proteína Rictor, que junto a mTOR activa la vía AKT/FOXO1. En ausencia de Rictor, el factor de transcripción FOXO1 activaría la expresión de factores pro-inflamatorios (Liu *et al.*, 2020b). Por otra parte, en ratones *knockout* para miR-122, se demostró que este miRNA regula la expresión de *Klf6*, factor de transcripción pro-fibrogénico que participa en la vía de señalización TGF- $\beta$  para la activación de HSC, por lo que en ausencia de este miRNA, se observa presencia de inflamación portal y fibrosis en hígado (Tsai *et al.*, 2012). En consonancia con estos hallazgos, en ratones con fibrosis hepática inducida por tratamiento con CCl<sub>4</sub>, la expresión de miR-122 en HSC se encontraba disminuida, y los autores comprobaron que este miRNA ejercería una regulación negativa sobre la expresión de *P4ha1*, implicado en la maduración de las fibras de colágeno (Li *et al.*, 2013).

El miR-122-5p junto con miR-192-5p han sido propuestos como biomarcadores circulantes en suero/plasma para el diagnóstico y el seguimiento de diversas hepatopatías, especialmente en NAFLD y NASH (Dongiovanni *et al.*, 2018). En el estudio presente, se ha detectado asociación positiva significativa de miR-192-5p con BT. En niños con daño hepático y fallo intestinal se ha demostrado la correlación de la BT con la disminución del miR-122 (Calkins *et al.*, 2020). La BT alta está implicada en necrosis y colestasis, y se plantea

como un marcador bioquímico que se debiera tener en cuenta en los estudios cuyo objetivo es la identificación de biomarcadores. Diversos autores han concluido una relación inversa de los niveles de estos dos miRNAs entre hígado y suero, encontrándose más elevados en suero de pacientes con NAFLD y NASH con respecto a controles, y además se correlacionarían con la gravedad de la enfermedad (Becker *et al.*, 2015; Pirola *et al.*, 2015; López-Riera *et al.*, 2018). En concreto, tanto miR-122-5p como miR-192-5p permitirían discriminar entre pacientes con esteatosis simple de aquéllos con un cuadro clínico más complejo con inflamación (NASH), siendo miR-122-5p más adecuado para determinar diferentes grados de fibrosis (Pirola *et al.*, 2015; López-Riera *et al.*, 2018). En cuanto a miR-885-5p, además del trabajo realizado por Raitoharju y colaboradores (2016) en el que lo relacionan como biomarcador de hígado graso de diferente etiología, otro estudio mostró su utilidad como marcador no invasivo para discriminar entre individuos con diferentes tipos de enfermedad hepática (carcinoma hepatocelular, cirrosis y hepatitis B) y controles sanos (Gui *et al.*, 2011).

Puesto que las entidades clínicas mencionadas anteriormente comparten algunas características fisiopatológicas con la EW, se exploró la utilidad de miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p como posibles marcadores de progresión de la enfermedad. Para ello, se analizó su capacidad para predecir el riesgo de progresión de enfermedad hepática en los pacientes de la primera cohorte. Los modelos de regresión logística generados para cada uno de los miRNAs captaron de forma significativa el grupo de interés, en el que se incluían pacientes con factores registrados en su seguimiento clínico que indicarían una evolución desfavorable de la enfermedad. La evaluación del rendimiento predictivo de cada modelo confirmó este resultado, al obtenerse valores de AUC en torno al 80 %. Respecto a los parámetros registrados para cada modelo y la evaluación de su rendimiento predictivo, no se observaron grandes diferencias entre los tres miRNAs, si bien miR-122-5p sería el que más aporta en la clasificación correcta de los dos grupos establecidos. De entre los tres modelos, el resultado obtenido para miR-122-5p presenta el mayor valor de AUC (83,30 %) y un menor intervalo de confianza del mismo (60,40-100 %), así como una menor puntuación AIC (22,52); esto último determina que se trata del modelo más sencillo para explicar las diferencias entre ambos grupos. Por tanto, al igual que ya se ha demostrado para otras hepatopatías así como en el modelo de rata LEC (Siaj *et al.*, 2012; Bandiera *et al.*, 2015), miR-122-5p también es un biomarcador adecuado para alertar de situaciones adversas en el seguimiento de los pacientes con EW.

Conocer el estadio de enfermedad hepática en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento es crucial para establecer la pauta terapéutica adecuada en todo momento, factor determinante para que el pronóstico sea favorable. La biopsia hepática se considera el *gold standard* para el diagnóstico de hepatopatías, permitiendo determinar aspectos

como la presencia de esteatosis, inflamación, fibrosis y necrosis (Calvopina *et al.*, 2016). Sin embargo, dado que se trata de una prueba invasiva que entraña riesgos para el paciente, no es justificable incluirla en la rutina de seguimiento de los pacientes con EW ni tampoco para el diagnóstico de individuos asintomáticos. Precisamente, una de las limitaciones que presentan los ensayos clínicos de nuevas terapias para la EW, es la falta de criterios de valoración basados en marcadores no invasivos (*surrogate endpoints*) que funcionen para demostrar la efectividad, los cuales son exigidos por las entidades reguladoras [European Medicines Agency (EMA) y la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos] (Paternostro *et al.*, 2020). A este respecto, para medir el grado de fibrosis hepática y con ello determinar si hay mejoría o una evolución a cirrosis, en la práctica clínica se utilizan índices basados en marcadores séricos como el FIB-4 o el APRI (*AST-Platelet Ratio Index*) junto con métodos de imagen como la elastografía hepática (Fibroscan), basado en la medición de la rigidez del tejido con ultrasonidos (Sini *et al.*, 2012). No obstante, aunque los tres métodos ofrecen un buen valor predictivo para el diagnóstico de fibrosis avanzada y cirrosis en pacientes con EW, no serían lo suficiente informativos para determinar grados de fibrosis leve a moderada (Sini *et al.*, 2012; Mariño *et al.*, 2020; Paternostro *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta que es posible detectar alteraciones en los niveles de miRNAs circulantes en plasma o suero de forma temprana en comparación con otros marcadores convencionales, sería interesante explorar la utilidad de los tres miRNAs circulantes validados en este trabajo, miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p, en el seguimiento clínico y en el diagnóstico inicial para predecir el grado de fibrosis e inflamación en estadios previos a la cirrosis.





## Conclusiones

1. El análisis de miRNAs circulantes en plasma mediante secuenciación masiva (miRNA-seq) es una estrategia de cribado útil, que ha permitido identificar 18 miRNAs diferencialmente sobrerrepresentados en pacientes con EW de la primera cohorte de investigación.
2. Estudios mediante qPCR confirmaron que los miRNAs miR-485-3p, miR-340-3p, miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p están significativamente desregulados en plasma de pacientes con EW apoyando los resultados obtenidos con la primera aproximación para estos cinco miRNAs.
3. No se han apreciado diferencias de expresión relativa en ninguno de estos cinco miRNAs, miR-485-3p, miR-340-3p, miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p, entre hombres y mujeres, ni tampoco correlación con la edad. Consecuentemente, se descartaría la influencia de la edad y sexo en la regulación de estos miRNAs con los datos disponibles hasta el momento.
4. Para miR-485-3p, implicado en metabolismo del hierro, y miR-340-3p, relacionado con el metabolismo de lípidos y la ruta de la insulina, el comportamiento resultó dispar entre las dos cohortes estudiadas. No se puede por tanto concluir que miR-485-3p o miR-340-3p jueguen un papel en el mecanismo de la EW.
5. Los miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p, relacionados con función hepática, mostraron una expresión relativa similar entre ambas cohortes, estando incrementados en todos los casos al comparar las cohortes de pacientes (investigación y validación) con los grupos de controles.
6. Los niveles de expresión relativa de miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p en pacientes correlacionan positivamente entre sí y con marcadores bioquímicos de daño hepático. En cambio, miR-485-5p y miR-340-3p no correlacionan entre sí ni con los restantes miRNAs, probablemente debido a que éstos participan en procesos biológicos distintos no relacionados con daño hepático.
7. El perfil de miRNAs circulantes compuesto por miR-122-5p, miR-192-5p y miR-885-5p, ha servido para definir al grupo de pacientes con factores de evolución desfavorable, siendo miR-122-5p el que ha mostrado un mejor rendimiento para su clasificación. Esto demuestra su potencial como biomarcadores de progresión de enfermedad hepática



## MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. Sujetos del estudio

### 1.1 Serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d'Elx

Estudio longitudinal descriptivo entre Febrero 2016 y Marzo 2018, en el que se incluyeron pacientes adultos con diagnóstico sugestivo de enfermedad de Wilson (EW), según criterios del sistema de puntuación desarrollado en la 8ª Reunión Internacional sobre EW (Leipzig, 2001) (European Association for the Study of the Liver, 2012), supervisados por especialistas de los Servicios de Medicina Digestiva y Neurología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia) y Hospital General Universitari d'Elx (Alicante). El diagnóstico diferencial se basa en las evidencias recogidas en pruebas bioquímicas y analíticas (niveles bajos de ceruloplasmina, niveles altos de cobre en orina recogida durante 24 horas, cuantificación intrahepática de cobre elevada, alteración de la función hepática), presencia de depósitos de cobre en la córnea (anillo de Kayser-Fleischer) y otras pruebas de imagen del hígado. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de ambos centros hospitalarios y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

Se reclutaron pacientes (N=34) y familiares a riesgo (N=32) a propósito para este estudio con el fin de realizar una evaluación clínica más exhaustiva, independientemente de su forma de presentación clínica (hepática o neurológica), por facultativos de ambas especialidades. Se recogieron datos demográficos (sexo, edad de debut y de diagnóstico) y seguimiento de la enfermedad a partir de la información recogida en la historia clínica.

Se tomaron muestras de sangre periférica de todos los participantes para los estudios genéticos a realizar, en diferentes tubos según el tipo de material genético objeto de análisis: tubos BD Vacutainer® con EDTA-K2 para la extracción de DNA genómico y de plasma, y tubos *PAXgene* con líquido estabilizante (Qiagen) para la extracción de RNA a partir de sangre total. Los tubos EDTA se procesaron inmediatamente tras su recepción, mientras que los tubos *PAXgene* se dejaron reposar a temperatura ambiente al menos dos horas antes de ser almacenados a -80 °C hasta su procesamiento.

### 1.2 Otros pacientes estudiados

Se analizaron muestras de pacientes con diagnóstico sugestivo de EW y familiares a riesgo, remitidos de otros centros hospitalarios de la Comunitat Valenciana así como de otras regiones de España. A través de las Unidades de Genética y/o Laboratorios de Diagnóstico Clínico correspondientes se gestionó la recepción de muestra de los individuos (sangre periférica en tubo BD Vacutainer® con EDTA-K2, frotis de la mucosa bucal o alícuota de DNA genómico) junto con el consentimiento informado. En función del centro de

procedencia y/o del número total de muestras recibidas de una misma región, se distinguen dos grupos de pacientes:

- Grupo I, compuesto por 21 casos índice y 88 muestras totales, que son seguidos en el H. Materno-Infantil y en el H. Dr. Negrín en la isla de Gran Canaria.
- Grupo II, compuesto por 27 casos índice y 48 muestras totales recibidas de diferentes centros hospitalarios: Hospital General Universitario de Alicante; Hospital Clínico Universitario, Hospital Universitario Dr. Peset y Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Unidad de Medicina Digestiva Pediátrica) de Valencia; Hospital Universitario del Vinalopó de Elche; y Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Aquí se incluyen casos índice adultos procedentes de las Unidades de Medicina Digestiva y Neurología del H. U. i P La Fe informados con posterioridad a Marzo 2018

### 1.3 Obtención de DNA genómico desde muestra biológica

Para el aislamiento y purificación de DNA genómico a partir de muestra biológica de los individuos participantes en el estudio, se siguieron diferentes procedimientos según el tipo de muestra recogida:

- Sangre periférica (2,5-3 ml en tubo EDTA): se utilizó el kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Células de la mucosa bucal: Se tomó la muestra de mucosa bucal mediante frotis con torunda e inmediatamente se resuspendió en solución PBS. La mezcla se centrifugó a 2200 rpm (400 g) durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. A partir del *pellet* de células resultante, se procedió a la extracción de DNA genómico utilizando el kit *QIAamp DNA Micro Kit* (Qiagen), siguiendo las mismas instrucciones que indica el fabricante para muestras de orina.

La pureza y cantidad de DNA genómico obtenido se evaluaron mediante espectrofotometría UV/Visible en un equipo Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) para comprobar que se cumplían los estándares de calidad (ratio de absorbancias a 260/280 nm entre 1,80-2,00 y ratio de absorbancias a 260/230 > 2,00). Además, se comprobó la integridad del DNA genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE con tinción de *GelRed* (Biotium) empleando un marcador de tamaños moleculares (*1 kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen). Todas las muestras de DNA genómico han sido etiquetadas y almacenadas a -20 °C hasta su uso.

## 2. Análisis mutacional del gen *ATP7B* y otros genes implicados en enfermedades hepáticas relacionadas

### 2.1 Estudios genéticos basados en secuenciación directa (Sanger) y MLPA

#### 2.1.1 Diseño de *primers* para amplificación por PCR y secuenciación directa

De forma general, los criterios que se tuvieron en cuenta para el diseño de *primers* incluyen longitud (entre 15 y 25 pb), porcentaje en contenido de GC (entre 40 y 60 %), temperatura de *melting* ( $T_m$ ; entre 55-65 °C) y que la secuencia escogida no presentara SNP frecuentes en la población que pudieran afectar la hibridación. Se seleccionaron parejas de secuencias con  $T_m$  similares que permitieran amplificar regiones exónicas e intrónicas flanqueantes entre 200-700 pb, y para regiones de mayor tamaño, se procuró aumentar el número de amplicones, solapados entre ellos para poder cubrir el total de la secuencia de interés. Por último, se descartó la posibilidad de que pudiesen amplificar otras regiones repetitivas del genoma humano con herramientas de PCR *in silico* (NCBI Primer-BLAST y UCSC In Silico PCR).

Para el análisis mutacional del gen *ATP7B* mediante secuenciación directa (Sanger), se diseñaron *primers* frente a la secuencia de referencia de su transcrito canónico, que comprende los 21 exones codificantes del gen. Se comprobó que la secuencia y anotación de este transcrito no presentan variaciones entre las versiones 37 (GRCh37/hg19) y 38 (GRCh38/hg38) del genoma humano de referencia. Adicionalmente, conforme a estrategias de cribado genético para diagnóstico de EW aplicadas por otros autores previamente (Coffey *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2014), se diseñaron *primers* para estudiar también la región promotora de *ATP7B*, que se extiende 1438 pb *upstream* desde el inicio de la región 5'UTR. Para el análisis mutacional de *CCDC115* y *TMEM199* mediante secuenciación directa, se siguió el mismo procedimiento para diseñar *primers* frente a la secuencia de referencia del transcrito canónico correspondiente a cada uno de ellos, que comprenden cuatro y cinco exones codificantes, respectivamente.

La amplificación de los productos de PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE con tinción de *GelRed<sup>TM</sup>* (Biotium) empleando un marcador de tamaños moleculares (*1 kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen). Finalmente, los productos de PCR se secuenciaron mediante el método de Sanger, en un equipo ABI 3730xl (Applied Biosystems) en el Servicio de Genómica y Genética Traslacional (SGGT).

Las secuencias de los *primers* y las condiciones estándar de amplificación por PCR utilizadas en este trabajo se detallan en el Anexo V.

### 2.1.2 Estudio de la dosis génica mediante MLPA

Se analizó la dosis o variantes de número de copia (CNV) en los exones del gen *ATP7B* mediante ensayo MLPA, utilizando el kit de sondas (*probemix*) *SALSA MLPA P098 Wilson disease* versión C2 (MRC Holland), siguiendo el protocolo del fabricante. Esta versión del producto incluye 22 sondas específicas para detectar cambios de dosis en regiones exónicas, además de otras 4 sondas para detectar mutaciones puntuales patológicas frecuentes en diferentes poblaciones (p.R778L en exón 8, p.A874V en exón 11, p.H1069Q en exón 15 y p.N1270S en exón 18). Las sondas de este kit están marcadas con el fluoróforo FAM.

Los fragmentos obtenidos tras la hibridación de las sondas al DNA genómico, ligación y posterior amplificación por PCR se separaron mediante electroforesis capilar en un equipo ABI 3730xl (Applied Biosystems), en el Servicio de Genómica y Genética Traslacional (SGGT), utilizando el marcador de tamaños moleculares GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems).

## 2.2 Estudios genéticos basados en técnicas NGS

### 2.2.1 Análisis de *ATP7B* mediante enriquecimiento dirigido y secuenciación masiva

Con el fin de identificar mutaciones en regiones no incluidas en el análisis genético mediante secuenciación directa, se planteó el estudio del gen *ATP7B* completo, esto es, incluyendo todos los exones, intrones, regiones 5' y 3' UTR así como la región promotora (1438 pb *upstream* desde el inicio de la región 5' UTR), en torno a 80 kb en total. Para ello, se desarrolló una herramienta de diagnóstico de diseño propio, basada en un sistema de captura por hibridación que emplea la tecnología *SureSelectQXT* (Agilent Technologies) y secuenciación masiva en un equipo MiSeq de Illumina.

Para el diseño del panel de captura se utilizó la herramienta *SureDesign* (Agilent Technologies). Debido a que las regiones intrónicas de este gen son especialmente ricas en elementos repetitivos de tipo *Alu*, para conseguir incluirlas todas en el diseño, se llevaron a cabo tres rondas de selección de sondas para las regiones a capturar, disminuyendo progresivamente la restricción aplicada a los parámetros en cada una:

- Primera ronda: se escogió una densidad de sondas 2x, enmascaramiento moderado de elementos repetitivos (sólo aquellos anotados en la base de datos RepeatMasker), con extensión máxima de 20 pb de las sondas hacia este tipo de secuencias, y un aumento de réplicas de sondas controlado en regiones ricas en GC. De esta forma, se logró cubrir el 82 % del gen *ATP7B*.



- Segunda ronda: se recuperaron las coordenadas cromosómicas de 64 regiones no cubiertas por el diseño (*missed regions*) en la primera ronda y se realizó un nuevo subgrupo de sondas para rescatar las regiones pérdidas. En esta ocasión, se optó por una enmascaramiento bajo de elementos repetitivos (sólo aquellos coincidentes entre la bases de datos RepeatMasker y las predicciones de la herramienta NCBI WindowMasker), con extensión máxima de 30 pb de las sondas hacia estas secuencias; el resto de parámetros no se modificaron. Se consiguió cubrir el 50 % de las regiones introducidas en este paso.
- Tercera ronda: se repitió el mismo procedimiento para recuperar e introducir en la herramienta las 22 regiones *missed* restantes. No se aplicó enmascaramiento de elementos repetitivos (parámetro *no masking*), para forzar que la herramienta seleccionase sondas sobre ellos. Como esto favorece enormemente la captura y secuenciación de regiones no deseadas inespecíficas (*off-target*), para minimizarlo se aplicó una densidad de sondas 1x que evita que las sondas se repliquen.

Para poder optimizar el diseño de esta herramienta y asimismo poder abarcar el diagnóstico de otras enfermedades, en el panel de capturas se incluyeron otros tres genes completos que no son objeto de estudio en esta tesis. Se generó por tanto un diseño final para los 4 genes con un tamaño de captura de las regiones de interés (*targets*) de 286 kb, y compuesto por 5341 sondas.

Se obtuvieron librerías siguiendo el protocolo de *SureSelectQXT* compatibles con la plataforma de secuenciación Illumina. Durante el proceso, se realizaron controles de calidad de la fragmentación del DNA genómico y de las librerías finales indexadas individualmente, mediante electroforesis capilar automatizada en un equipo Agilent Bioanalyzer 2100. Por último, se secuenció el conjunto de librerías (*pool*) en la plataforma Illumina MiSeq (2x75 pb, versión 3), y se utilizó el programa FastQC para comprobar que los ficheros FASTQ no contenían restos de secuencias de adaptador de librería (éstas son eliminadas por el proceso de *adaptor trimming* que realiza el propio *software* del secuenciador) y que la calidad de las secuencias era adecuada.

### 2.2.2 Secuenciación de exoma

Para el estudio del exoma completo, se seleccionaron casos con una información clínica detallada pero sin mutación patológica identificada en *ATP7B* en las dos aproximaciones de análisis genético previas, que en su totalidad abarcaban la secuenciación completa del gen *ATP7B* (promotor, regiones codificantes y no codificantes). De cada familia candidata, junto con la muestra de DNA genómico del probando, se seleccionaron un total de 2-3 muestras de familiares (hermanos sanos y/o enfermos; padre, madre y/o hijos sanos).

El procedimiento que comprende la preparación de librerías desde DNA genómico, enriquecimiento mediante captura de regiones exónicas, secuenciación masiva y análisis de datos primario, se llevó a cabo en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG). Se escogió la tecnología de *Nimblegen SeqCap EZ MedExome* (Roche), cuyo panel de captura de 47 Mb de tamaño cubre las regiones codificantes (CDS) de los genes humanos anotados en las siguientes bases de datos: CCDS versión 17, RefSeq versión 66, Ensembl versión 76, VEGA versión 56 y GENCODE versión 20. Además, su diseño ha sido mejorado para conseguir una mayor cobertura (>20x) en alrededor de 5000 genes considerados de interés clínico. Las librerías obtenidas fueron secuenciadas en la plataforma Illumina HiSeq 4000 (2x100 pb, versión 4).

### 2.3 Análisis bioinformáticos

#### 2.3.1 Análisis de las secuencias obtenidas mediante secuenciación directa (Sanger)

De cada producto de PCR secuenciado, se obtuvo el cromatograma en formato ab1 y su lectura en formato FASTA (.fa), la cual se alineó frente a la secuencia de referencia con la herramienta *bl2seq* (NCBI BLAST suite). De forma manual, se revisaron en paralelo el resultado del alineamiento y el cromatograma, con el fin de evaluar la calidad de la secuenciación y de identificar variantes en la muestra problema tras descartar artefactos.

Las variantes detectadas se investigaron manualmente según su posición cromosómica en la base de datos *Ensembl* para el genoma humano de referencia versión 37 (GRCh37/hg19), para rescatar la información necesaria para anotarlas a nivel de transcrito y proteína con la nomenclatura estándar recomendada por la *Human Genome Variation Society* (HGVS) para determinar el tipo de alteración que en ellos causarían. Finalmente, se consultaron las bases de datos dbSNP, gnomAD, ClinVar, HGMD Professional y PubMed, para incorporar la anotación referente a su frecuencia alélica poblacional, significado clínico o estudios funcionales previamente publicados, entre otros.

#### 2.3.2 Identificación de variantes en número de copia (CNVs) mediante análisis de fragmentos

El equipo utilizado para la electroforesis capilar recoge, para cada muestra, datos de intensidad de señal de fluorescencia (picos), en función del tiempo y entre longitudes de onda determinadas, de cada fragmentos de DNA amplificado en el protocolo de MLPA junto con los del marcador de tamaños moleculares (en este caso, marcados con los fluoróforos FAM y LIZ, respectivamente). Esta información queda almacenada como datos numéricos para cada muestra en un fichero fsa.

Se procesaron los ficheros fsa con el programa Coffalyser (MRC Holland) con los parámetros por defecto para análisis de fragmentos. Para la determinación de

duplicaciones y/o deleciones, en primer lugar este programa identifica los patrones electroforéticos de cada muestra, compuestos por picos que se corresponden con los fragmentos de DNA amplificados. A continuación, compara las intensidades de fluorescencia normalizadas de cada fragmento de DNA con los de una muestra de referencia procedente de un individuo sano. Se obtiene un ratio o coeficiente de dosis, cuyo valor debe ser inferior a 0,65 para una deleción (será 0 si en homocigosis) y superior a 1,30 para una duplicación (en torno a 2 si en homocigosis). En caso de detectar alguna variante, se consultó en la bibliografía (HGMD Professional y PubMed) y en bases de datos específicas de CNVs y/o variaciones estructurales (DGV y gnomAD SVs) si había sido anotada previamente.

### **2.3.3 Pipeline para análisis primario de datos de secuenciación masiva de *ATP7B***

Las lecturas generadas en la secuenciación y almacenadas en ficheros de texto en formato FASTQ, se alinearon frente al genoma humano de referencia (hg19) con el algoritmo BWA-MEM (versión 0.7.5a-r405). Se utilizó el conjunto de programas que componen Picard Tools (versión 1.14) para la obtención de ficheros BAM del alineamiento, marcar duplicados y evaluar el rendimiento en la captura y enriquecimiento en las regiones de interés. A continuación, se pasó a trabajar únicamente con la región del genoma que comprende el gen *ATP7B*, cuyas coordenadas cromosómicas son proporcionadas en un fichero en formato BED. Siguiendo el protocolo de GATK *Best Practices*, se realizó un realineamiento de *indels* y recalibración de bases previos a la identificación de variantes (*variant calling*) con HaplotypeCaller (versión 3.4) (Van der Auwera *et al.*, 2013), obteniéndose así el fichero VCF que recoge SNVs e *indels* detectados en cada muestra.

Se evaluó el rendimiento en la captura y enriquecimiento y la cobertura obtenidos en cada muestra en la región de interés con Picard Tools (versión 1.14) y la herramienta DepthOfCoverage incluida en GATK (versión 3.4), a partir de los ficheros BAM con duplicados marcados. Además, se revisó si posiciones con cobertura <20x pertenecían a elementos repetitivos anotados en la base de datos *RepeatMasker*.

Se desarrollaron *scripts* en R para el manejo de las tablas obtenidas y para la detección de CNVs mediante el estudio de la cobertura. En concreto, por cada muestra, se normalizó la cobertura en cada base capturada y secuenciada y se comparó con el promedio de la normalización del resto de muestras del *pool*, obteniéndose un ratio relativo de la cobertura. Para una posible deleción o duplicación, este ratio debe ser inferior a 0,7 o superior a 1,3, respectivamente. Se inspeccionaron visualmente los posibles CNVs con el programa IGV en los ficheros BAM con duplicados marcados. Se consideraron más plausibles aquellos en los que se podían determinar puntos de *breakpoint* en base a la

presencia de alineamiento *soft-clipped* flanqueante en las lecturas y/o tamaño de inserto mayor del esperado entre lecturas emparejadas.

### 2.3.4 Pipeline para anotación de variantes identificadas en secuenciación masiva

Sobre los ficheros VCF generados en el análisis primario de los datos generados en la secuenciación masiva de *ATP7B* y del exoma, se aplicó el protocolo de *Hard Filtering* de variantes descrito en *GATK Best Practices* (Van der Auwera *et al.*, 2013).

Este protocolo consiste en etiquetar las variantes según parámetros de calidad registrados en el *variant calling* y, por tanto, indicados en los ficheros VCF para cada una de ellas. Brevemente, se distinguen SNVs de *indels*, y se evalúan por separado los parámetros de calidad propios a cada tipo de variación conforme a unos valores umbral (*threshold*) dirigidos a establecer la probabilidad de que la variante sea real o artefactual. En la Tabla M1 se especifican los parámetros a evaluar. Si la variante cumple las condiciones fijadas para todos los parámetros será etiquetada como “PASS”, en caso contrario, será etiquetada conforme al nombre de los parámetros por los cuales ha fallado. En ningún caso se eliminaron del fichero VCF las variantes no etiquetadas como “PASS”, ya que podían ser de interés biológico y/o clínico en las siguientes fases de análisis.

**Tabla M1: Filtros de calidad aplicados a variantes de tipo SNPs y a pequeñas inserciones/deleciones (*indels*)**

Parámetro	Descripción	SNPs	<i>indels</i>
QualByDepth (QD)	Calidad en función de la cobertura	<2	<2
FisherStrand (FS)	<i>P</i> valor expresado en escala Phred para estimar la probabilidad de sesgo entre hebras de DNA ( <i>strand bias</i> ) aplicando el test de Fisher	>60	>200
RMSMappingQuality (MQ)	Raíz cuadrada de la calidad de mapeo de las <i>reads</i> que cubre la posición en la que se localiza la variante	<40	-
HaplotypeScore (HS)	<i>Score</i> para cada posición en la que segregan dos haplotipos (es decir, sólo alberga genotipo 0/0, 1/1 o 0/1)	>13	-
MQRankSum	<i>Z-score</i> que compara calidad de mapeo de <i>reads</i> con alelo alternativo frente al de <i>reads</i> con alelo de referencia	< -12,5	-
ReadPosRankSum	<i>Z-score</i> que penaliza el que el alelo alternativo se encuentre mayoritariamente en los extremos de la <i>read</i> , en donde se suelen acumular los errores de secuenciación	< -8	< -20

Una vez etiquetadas las variantes por calidad en los ficheros VCF, se procedió a su anotación con el programa *Variant Effect Predictor* (VEP, versión 94), que de manera automatizada incorpora a cada variante la información contenida en la base de datos *Ensembl* para dicha posición en el genoma humano de referencia versión 37

(GRCh37/hg19). Entre la información incorporada se encontraría la anotación funcional a nivel de gen, transcrito y proteína con la alteración que en ellos causarían, predicciones *in silico*, frecuencias alélicas poblacionales y otros datos de interés documentados en bases de datos específicas (dbSNP y ClinVar). Se desarrollaron distintos scripts en Bash, Python y R para filtrar y combinar la información de los ficheros.

### 2.3.5 Filtrado, priorización e interpretación de variantes

La información obtenida de la anotación de la variante, independientemente de la técnica por la que haya sido identificada, ayuda a establecer una interpretación sobre su posible patogenicidad y/o significado clínico. Mediante técnicas convencionales (secuenciación directa y MLPA), el número de variantes identificadas por muestra es menor y se limitan a unos pocos genes, sin embargo es mucho mayor en secuenciación masiva. Por ello, se establecieron unos criterios de filtrado y priorización aplicables a ambas aproximaciones, si bien sirven para reducir notablemente el número de variantes identificadas en secuenciación masiva y determinar las candidatas en cada caso estudiado:

- I. Se clasificaron las variantes por el efecto que causan en la proteína o sobre el procesamiento del mRNA, seleccionándose para análisis inicial aquellas que resultan potencialmente deletéreas [cambio de aminoácido, de pauta de lectura y/o generación de un codón de parada, y que alterarían el sitio de *splicing* 5' (*splicing donor site*) o 3' (*splicing acceptor site*) del mRNA]. En segundo lugar, también se tuvieron en cuenta los cambios sinónimos y las variantes en las regiones 5'-3' UTR, que también podrían alterar el procesado o expresión del mRNA, respectivamente.
- II. Las variantes seleccionadas se filtraron según su frecuencia poblacional. La base de datos de referencia utilizada ha sido *gnomAD* (versión 2.1); se consideraron todos aquellos cambios con una frecuencia alélica menor (*Minor Allele Frequency*; MAF) global inferior a 0,5 % y también inferior al 1 % por subpoblaciones.
- III. Se consultaron bases de datos que recogen y clasifican variantes causantes de enfermedades (HGMD Professional y ClinVar) con el fin de conocer si existen evidencias de patogenicidad, en cuanto si ha sido previamente descrita o hay otras similares a lo largo de la proteína o en el mismo dominio. Adicionalmente, se revisó en la bibliografía si existe algún fenotipo clínico asociado al gen en el que se localiza la variante y que pudiera correlacionarse con el caso en estudio. En cualquier caso, todo ello contribuye a una mayor probabilidad de que una variante dada sea causante de la enfermedad, y por tanto, de que quede priorizada frente al resto.
- IV. Sobre aquellas variantes cuya frecuencia alélica menor por subpoblaciones era inferior al 1 %, se realizaron diferentes estudios *in silico* y se profundizó la búsqueda

de información sobre la funcionalidad del gen y/o proteína para evaluar el posible impacto que podría tener:

- a) En el caso de tratarse de variantes en genes nuevos, sin asociación conocida hasta la fecha con la patología en estudio, se tuvieron en cuenta otros factores como la participación en la misma ruta o función que otros ya descritos, su interacción con ellos o su patrón de expresión en diferentes tejidos. Para ello, principalmente se estudió la bibliografía asociada en *PubMed*. En paralelo, se consultó la base de datos *NCBI Gene*, ya que este portal centraliza la información mencionada a distintos niveles para cada gen y los enlaces a múltiples bases de datos en las que consultarla.
- b) Para determinar si el aminoácido afectado por el cambio y su entorno forman parte de un clúster conservado o dominio funcional en la proteína, se seleccionaron proteínas homólogas en especies cercanas en las bases de datos *UniProtKB* y *NCBI HomoloGene* para realizar un alineamiento múltiple de sus secuencias aminoacídicas con la herramienta *web Clustal Omega*.
- c) Para las variantes de cambio de aminoácido, se utilizaron las herramientas de predicción de patogenicidad SIFT, Polyphen-2 y PROVEAN. En ellas se han implementado algoritmos que, basándose principalmente en la homología de secuencia aminoacídica con otras especies y la conservación de la estructura de la proteína, calculan una puntuación que se interpreta como la probabilidad de que la variante sea patológica.
- d) Para las variantes que pudiesen alterar el *splicing* del mRNA, se utilizaron diferentes programas de predicción de alteración de sitios de reconocimiento canónicos (secuencias consenso de los extremos 5' y 3' de exones e intrones) de la maquinaria que participa en este proceso (spliceosoma) o de elementos activadores o silenciadores (ESE and ESS, respectivamente). Se utilizaron *NNSplice*, *Human Splicing Finder (HSF)*, *NetGene2* y *SpliceView*. En el caso de variantes intrónicas profundas o *splicing* en sitio no canónico, se evaluó la posible activación de un sitio de *splicing* críptico y/o la creación de un pseudoexón con los algoritmos para reconocimiento de sitios potenciales de *splicing* de la herramienta HSF (el suyo propio y MaxEnt) y *branch points*.
- e) Para variantes que pudieran estar implicadas en regulación génica, se revisó en el visualizador genómico UCSC Genome Browser si en la posición en la que se encuentra esta variante en el GRCh37/hg19 pertenece a una región reguladora, con los *tracks* de anotación del proyecto ENCODE. En el caso de variantes en la

región promotora, también se consultó en la base de datos TRANSFAC si se localizaba en torno a un motivo conservado de unión de factores de transcripción.

Se seleccionaron para validación por secuenciación directa (Sanger) las variantes priorizadas en función de las evidencias recogidas que apoyan su posible patogenicidad. Se revisaron sus etiquetas de calidad recogidas en los ficheros VCF; aquellas de mala calidad se inspeccionaron visualmente en IGV para descartarlas en caso de que se tratara de un artefacto, y sólo si el gen era de interés clínico y/o funcional se proseguía con la validación. Se siguieron los mismos criterios para el diseño de *primers*, amplificación por PCR y su comprobación previa a la secuenciación directa descritos en el apartado 2.1.1.

En los casos de los que se disponía de muestra de DNA de familiares, se llevaron a cabo análisis de segregación familiar. En su defecto, en algunos casos, para investigar la configuración alélica *cis/trans*, se optó por clonar el fragmento amplificado por PCR con las dos mutaciones en un plásmido, si el tamaño del fragmento no superaba las 4000 pb. Dependiendo del tamaño del fragmento a clonar, los plásmidos utilizados fueron pCR2.1-TOPO (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen) o pcDNA3.1 (Clontech). Mediante secuenciación directa se comprobaba de cuántas mutaciones era portador cada clon.

Finalmente, todas las variantes identificadas se clasificaron en función de su grado de patogenicidad aplicando los criterios propuestos por la *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards *et al.*, 2015).

### 3. Caracterización funcional de variantes en *ATP7B*

#### 3.1 Cultivos celulares

Para el estudio *in vitro* de variantes de *splicing* y en la región promotora de *ATP7B*, se utilizaron las siguientes líneas celulares inmortalizadas de crecimiento en monocapa:

- **HeLa**: línea celular epitelial, procedente de carcinoma cervical humano.
- **HEK293T**: línea celular embrionaria de riñón humano. Deriva de la inserción del antígeno T largo SV40 en la línea HEK293, y se caracteriza por su alta transfectabilidad.

Ambas líneas celulares se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *High Glucose* (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % (v/v) de FBS inactivado, 2 mM de glutamina y penicilina/estreptomicina al 1% (100 U.I./mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina) en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Para su mantenimiento, se realizaron pases de tripsinización, utilizando Tripsina-EDTA 0,05 % (Gibco), al alcanzar el cultivo una confluencia del 80 %.

### 3.2 Análisis de la expresión de variantes de *splicing* en mRNA de pacientes

Para estudiar el efecto de mutaciones en *ATP7B* que pudieran alterar el procesamiento del mRNA, se aisló RNA total a partir de muestra de sangre periférica de pacientes portadores de los cambios, así como de controles sanos. Para el aislamiento del mRNA, se recuperaron los tubos *PAXgene* del almacenamiento a -80 °C para su descongelación a temperatura ambiente durante 12-16 horas, y se prosiguió con la extracción con el kit *PAXgene Blood RNA* (Qiagen). Mediante transcripción reversa se obtuvo el cDNA, empleando al menos 250 ng de RNA total como molde, utilizando el kit *qScript cDNA SuperMix* (Quantabio).

Debido a la baja expresión del mRNA de *ATP7B* en linfocitos, se llevaron a cabo PCRs anidadas para el análisis del patrón de *splicing* generado por las distintas variantes. Brevemente, se realizó una primera PCR en un volumen final de 25 µl con 1,5 µl de cDNA, y a continuación se utilizaron 2,5 µl de ésta como molde para una segunda PCR. Los amplicones obtenidos se testaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5-2 % con tinción de *GelRed* (Biotium) empleando un marcador de tamaños moleculares (*1 kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen). Los fragmentos de interés se cortaron y purificaron para su análisis mediante secuenciación directa con el kit *Nucleospin Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel).

Los *primers* para amplificación por PCR empleados en este análisis se recogen en el Anexo V.

### 3.3 Análisis de la expresión de variantes de *splicing* mediante ensayo de minigenes

Como alternativa para estudiar variantes de *splicing* en las que mediante análisis de mRNA de linfocitos no se apreció el efecto que podrían causar, se realizó un ensayo basado en la obtención de construcciones de minigenes a partir del vector pSPL3 (Figura M1).

Se diseñaron *primers* para obtener fragmentos de DNA que incluyeran el exón en el que se localiza la variante y secuencia intrónica flanqueante. Se amplificó por PCR desde muestra de pacientes portadores en heterocigosis con la enzima de alta fidelidad *Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase* (Agilent Technologies), y el fragmento obtenido se clonó en el vector pSPL3 en los sitios de corte *XhoI* y *NheI*. Los constructos *wild-type* y mutante generados se comprobaron mediante secuenciación directa.

Se sembraron células HeLa en placas de 6 pocillos (80.000 células por pocillo) y se transfectaron 2 µg de cada construcción *wild-type* y mutante, además de vector pSPL3 vacío, con *FuGENE HD* (Promega). A las 24 y 48 horas *post-transfección*, se recogieron las



células para la extracción de RNA total con *Qiazol* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mediante transcripción reversa se obtuvo el cDNA, empleando 1 µg de RNA total como molde, con el kit *qScript cDNA SuperMix* (Quantabio). Se amplificaron por PCR los transcritos de interés procesados a partir de la sobreexpresión de las construcciones utilizando los *primers* específicos de los exones SD6 y SA2 del vector pSPL3. Los amplicones obtenidos se testaron y purificaron para su análisis mediante secuenciación directa tal y como se indica anteriormente en el apartado 3.2.

Los *primers* para amplificación por PCR empleados para la obtención de las construcciones de minigenes, análisis de expresión y secuenciación se recogen en el Anexo V.

### **3.4 Ensayo de la actividad luciferasa de variantes en la región promotora**

Se diseñaron *primers* para obtener fragmentos de DNA que incluyeran la región promotora de *ATP7B* (1595 pb *upstream* desde el codón de inicio ATG). Se amplificó por PCR desde muestra de DNA de pacientes portadores en heterocigosis con la enzima de alta fidelidad *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent Technologies), y los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pGL4.24 [*luc2P/minP*] (Promega) en los sitios de corte *NheI* y *XhoI*. Los constructos *wild-type* y mutante generados se comprobaron mediante secuenciación directa. Los *primers* para amplificación por PCR empleados para la obtención de las construcciones y su verificación se recogen en el Anexo V.

Se sembraron células HEK293T en placas de 24 pocillos (50.000 células por pocillo), que se transfectaron con un ratio 10:1 de los vectores pGL4.24:pRL-TK control (*Renilla*), con *FUGENE HD* (Promega). A las 24 horas *post-transfección*, se evaluó la actividad promotora utilizando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). De cada experimento, se consideró el promedio de la cotransfección de los vectores por triplicado para análisis estadístico mediante T-test para muestras independientes.

## 4. Análisis de modificadores genéticos

### 4.1 Secuenciación de exoma y análisis bioinformáticos

En este estudio se incluyeron dos familias con hermanos afectos, que cuentan con diagnóstico concluyente de EW y con una clínica dispar en cuanto a gravedad y debut de las manifestaciones clínicas.

De ambas familias, se secuenció el exoma de los probandos. El procedimiento que comprende la preparación de librerías desde DNA genómico, enriquecimiento mediante captura de regiones exónicas, secuenciación masiva y análisis de datos primario, se llevó a cabo en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG). Se escogió la tecnología *SureSelect Human All Exon V5* (Agilent Technologies), cuyo panel de captura mide 50 Mb y cubre las regiones codificantes (CDS) de 21522 genes anotados en las bases de datos CCDS, RefSeq, Ensembl y GENCODE para la versión 37 del genoma humano de referencia (GRCh37/hg19). Las librerías obtenidas se secuenciaron en la plataforma Illumina HiSeq 2500 (2x100 pb, versión 3).

Sobre los ficheros VCF obtenidos en el análisis primario de los datos generados se aplicó el *pipeline* de anotación de variantes descrito en el apartado 2.3.4. A partir de las variantes identificadas en la secuenciación, se llevaron a cabo dos tipos de análisis, siguiendo los criterios del apartado 2.3.5 para la selección de variantes candidatas:

- a) Filtrado de variantes obtenidas a partir de un listado de 64 genes implicados en el metabolismo del cobre y que pudieran estar relacionados con la función de ATP7B (Anexo IV). En este filtrado no se descartaron variantes por su frecuencia poblacional, pero sí se priorizaron atendiendo a criterios de funcionalidad de la proteína y predicción *in silico* de patogenicidad.
- b) Filtrado según frecuencia en bases de datos de variantes poblacionales: El objetivo es investigar la posibilidad de que alguno de los pacientes en estudio fuera portador de algún otro cambio con una MAF inferior al 1 % en gnomAD, además de los ya detectados en *ATP7B*, que pudiera interferir en el fenotipo EW y ello agravara el cuadro clínico.

### 4.2 Cribado mutacional de genes y variantes candidatas mediante secuenciación directa

Las variantes candidatas seleccionadas a partir de los dos filtrados indicados en el apartado 4.1, se validaron mediante secuenciación directa en muestra de DNA de los probandos estudiados mediante secuenciación de exoma.

De las variantes candidatas del filtrado de genes implicados en el metabolismo del cobre, se realizó un cribado en 12 casos seleccionados de la serie clínica H. U. i P. La Fe – H. Gral. U. d' Elx. Además, para los genes *ATOX1* y *COMMD1*, también se optó por estudiar el resto de regiones codificantes en estos pacientes

Para el cribado mutacional de *ATOX1* y *COMMD1* mediante secuenciación directa (Sanger), se diseñaron *primers* frente a la secuencia de referencia del transcrito canónico correspondiente a cada uno de ellos, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.1. Las secuencias de los *primers* y las condiciones básicas de amplificación por PCR utilizadas en este trabajo se detallan en el Anexo V.

### **4.3 Estudios funcionales para la caracterización de LMNA p.R419C**

#### **4.3.1 Cultivos celulares**

En los distintos estudios llevados a cabo para la caracterización funcional de *LMNA* p.R419C se han utilizado las siguientes líneas de fibroblastos derivadas a partir de muestra de biopsia de piel:

- **EW46:** procedente de una mujer de 49 años. Paciente con EW, caso índice de la familia fEW-30. Portadora de *ATP7B* p.H580Pfs\*2/p.H1069Q (heterocigosis compuesta) y *LMNA* p.R419C (heterocigosis).
- **F1A:** procedente de una mujer de 26 años, control sano. Línea celular perteneciente a la colección del laboratorio.

Ambas líneas de fibroblastos se cultivaron en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *High Glucose* (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % (v/v) de FBS inactivado, 2 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina al 1 % (100 U.I./mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina) y normocina (100 µg/mL) (Invivogen) en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Para su mantenimiento, se realizaron pases de tripsinización, utilizando Tripsina-EDTA 0,05 % (Gibco), al alcanzar el cultivo una confluencia del 80 %. Los experimentos se realizaron entre los pases 4-5 y 12-13 en ambas líneas de fibroblastos.

#### **4.3.2 Inmunofluorescencia**

Se sembraron entre 10.000 y 15.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, con un cubre de 13 mm en cada uno. Las células se dejaron crecer entre 16 y 24 horas y posteriormente, tras ser lavadas con PBS 1X, se fijaron sobre los cubres con PFA 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS 1X sobre los cubres, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,25 % durante 15 minutos y se incubaron en solución de bloqueo (*Horse Serum* al 5 % en PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo primario

anti Lamina A/C, dilución 1:800 (sc-7292, Santa Cruz Biotechnology) a 4 °C toda la noche en solución de bloqueo. Al día siguiente, los cubres se lavaron 3 veces con PBS 1X y se realizó la incubación con anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488, dilución 1:500, Thermo Fisher) durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo.

Para la visualización de las células inmunoteñidas en el microscopio, se aplicaron tres lavados con PBS 1X sobre los cubres antes de montarlos sobre portaobjetos empleando medio de montaje *Vecta-Shield* con DAPI (Vector Laboratories). Tras dejarlos secar al menos 10 minutos en oscuridad, los cubres se sellaron sobre el portaobjetos con laca de uñas y se dejaron secar de nuevo otros 10 minutos antes de guardar los portaobjetos a 4 °C.

Se tomaron imágenes de las células mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP2) con un objetivo de inmersión 40X. Para el análisis de la circularidad o contorno nuclear (NCR, *Nuclear Contour Ratio*), se utilizó la función “*Analyze Particles*” implementada en el software ImageJ, que calcula la circularidad como  $4\pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$ .

### 4.3.3 Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ensayo de viabilidad

Se sembraron 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, que se dejaron crecer entre 16 y 18 horas. Una vez transcurrido este tiempo, para cada línea de fibroblasto, se incubaron las células por duplicado en su medio de crecimiento con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM, 75 μM y 100 μM), en paralelo con una condición de células no tratadas (basal), durante dos horas a 37 °C. A continuación, se procedió con el ensayo de viabilidad basado en la reducción del compuesto *MTS tetrazolium* (Abcam) a formazán, cuya absorbancia se mide a 490 nm. Para ello, se cambió el medio de cultivo, se añadieron 20 μl de MTS por pocillo y se incubaron las células durante cuatro horas a 37 °C. Por último, se midió la densidad óptica en un lector de placas a 490 nm. Una mayor absorbancia se correspondería con una mayor presencia de células vivas tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con capacidad de reducir el MTS a formazán.

### 4.3.4 Estudio de la respiración y producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial

Se llevó a cabo un estudio del perfil de consumo de oxígeno (*Oxygen Consumption Rate*, OCR) mediante respirometría de alta resolución en un equipo Oxygraph-2k (O2k, OROBOROS Instruments) con dos cámaras y un sensor de fluorescencia acoplado (O2k-Fluo LED2-Module) para la medición de producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Para obtener las células para el experimento, se sembraron frascos T-75, que se dejaron crecer hasta alcanzar 80-90% de confluencia. En cada experimento, se utilizaron 1·10<sup>6</sup> células por cámara, y se trabajó simultáneamente con ambas líneas de fibroblastos, una en

cada cámara del equipo. Para los experimentos en célula intacta se utilizó el medio de crecimiento de fibroblastos detallado en el apartado 4.3.1, mientras que para célula permeabilizada se utilizó el medio de respiración MiR05 (sacarosa 110 mM, potasio lactobionato 60 mM, EGTA 0.5 mM,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  3 mM, taurina 20 mM,  $KH_2PO_4$  10 mM, tampón HEPES 20 mM ajustado a pH 7.1 con KOH a 37 °C y 1 g/L de BSA). Se siguieron las versiones de los protocolos incluidos en el software de análisis DataLab 7.3, que se detallan a continuación:

- SUIT-03: para medir el consumo de  $O_2$  en célula intacta, a 37 °C en condiciones basales y tras la adición en orden secuencial de oligomicina (2,5  $\mu M$ ), carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) en incrementos de 0,5  $\mu M$  hasta alcanzar la concentración óptima para respiración máxima (5-5,5  $\mu M$ ), rotenona (0,5  $\mu M$ ) y antimicina A (2,5  $\mu M$ ).
- SUIT-06: protocolo complementario para medir simultáneamente en célula intacta el consumo de  $O_2$  y la producción de  $H_2O_2$ , a 37 °C en condiciones basales y tras la adición en orden secuencial de los compuestos indicados en SUIT-03. Además, como control de integridad de la membrana mitocondrial interna durante el experimento, se añadió succinato (10 mM). Este sustrato sería capaz de acceder a la matriz mitocondrial si la integridad de la membrana interna estuviera afectada. Por tanto, sólo en ese caso se observaría consumo de  $O_2$ .
- SUIT-09: para medir simultáneamente el consumo de  $O_2$  y la producción de  $H_2O_2$  a 37°C, tras permeabilizar las células con digitonina (4  $\mu g/ml$ ) y la adición en orden secuencial de succinato (10 mM), adenosín difosfato (ADP) (2,5 mM), piruvato (5 mM), rotenona (0,5  $\mu M$ ) y antimicina A (2,5  $\mu M$ ).

Para la medición de la producción de  $H_2O_2$  se utilizó la sonda *Amplex UltraRed* (AmR) a una concentración final de 10  $\mu M$ , junto con la adición de ácido penténico (DTPA) (15  $\mu M$ ), superóxido dismutasa (SOD) (5 U/ml) y *horseradish peroxidase* (HRP) (1 U/ml) previamente a la inyección de las células en la cámara. El  $H_2O_2$  registrado en los experimentos es el procedente de la conversión del anión superóxido ( $O_2^-$ ) que se genera en la respiración, y la conversión total de todo el  $O_2^-$  presente en el medio se facilita por la adición de SOD. En presencia de HRP, la sonda AmR reacciona con el  $H_2O_2$ , dando lugar a un producto fluorescente llamado resorufina. Para obtener la recta de calibrado de  $H_2O_2$ , se añadió 0,1  $\mu M$  de este compuesto en los puntos indicados a lo largo del protocolo. El flujo de  $H_2O_2$  registrado durante el experimento a tiempo real es calculado por el software DataLab a partir de la derivada positiva de la señal de resorufina, que convierte a concentración de  $H_2O_2$  a partir de la recta de calibrado.

El flujo de consumo de O<sub>2</sub> registrado en cada experimento se normalizó para cada línea de fibroblastos con respecto al número de copias de DNA mitocondrial (mtDNA), determinadas mediante PCR cuantitativa (qPCR) con *FastStart Essential DNA Green Master* en un equipo LightCycler 480 II (Roche). Para ello, a partir del lisado de células recuperadas al finalizar el experimento, se aisló DNA total con el kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche), del que se utilizaron 10 ng totales para amplificar el gen nuclear de referencia *SDHA* y el gen mitocondrial *MT-CO2*. El número de copias de mtDNA en fibroblastos EW46 con respecto a fibroblastos F1A se expresó como  $2^{-(\Delta Ct_{EW46} - \Delta Ct_{F1A})}$ , asumiendo un valor de 1 para fibroblastos F1A. Los *primers* utilizados para amplificación por qPCR se recogen en el Anexo V.

De cada protocolo, se consideró el promedio de todas las réplicas para análisis estadístico mediante T-test para muestras independientes.

### **4.3.5 Análisis de expresión de genes con función antioxidante mediante PCR cuantitativa (qPCR)**

Se aisló RNA total a partir del lisado de fibroblastos cultivados en condiciones basales con el kit *RNeasy Mini* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares utilizados corresponden a tres pases distintos de cada línea de fibroblastos. A partir de 300 ng de RNA total se obtuvo cDNA mediante transcripción reversa con el kit *qScript cDNA SuperMix* (Quantabio).

Se amplificó mediante qPCR el cDNA de los genes de interés (*CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4, TRX1, TRX2, PRDX3, PRDX5, HMOX, NQO1* y *UCP2*) con *FastStart Essential DNA Green Master* en un equipo LightCycler 480 II (Roche), en placas de 384 utilizando 1 µl de una dilución 1/4 de cDNA y escalando el resto de componentes de la reacción a un volumen final de 10 µl. Se escogió *GAPDH* como gen de referencia. El nivel de expresión de cada gen en fibroblastos EW46 con respecto a fibroblastos F1A se calculó como  $2^{-(\Delta Ct_{EW46} - \Delta Ct_{F1A})}$ , siendo  $\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{GAPDH}$ . Los *primers* utilizados para amplificación por qPCR se recogen en el Anexo V.

## 5. Estudio de miRNAs circulantes en plasma

### 5.1 Población de estudio

En la primera fase del estudio, se realizó un cribado de miRNAs circulantes en plasma mediante secuenciación masiva para identificar aquellos que pudieran estar diferencialmente expresados en pacientes con EW. Con este fin, se reclutó una **primera cohorte de investigación**, en la que se incluyeron muestras de un grupo de pacientes procedente del Hospital U. i P. La Fe de Valencia y del Hospital Gral. U. d'Elx. Este grupo incluye 20 pacientes con diagnóstico genético de EW y en terapia con quelantes. No se incluyeron pacientes con trasplante de hígado. El reclutamiento de muestras de plasma y recogida de datos clínicos tuvo lugar durante las visitas para seguimiento clínico rutinarias en consulta de Medicina Digestiva entre 2016-2018.

En la segunda fase del estudio, con el fin de validar mediante qPCR el resultado de los estudios de miRNAs circulantes en plasma de la primera fase, se reclutó una **segunda cohorte de validación**. Siguiendo los mismos criterios de inclusión que para la primera cohorte, se incluyeron muestras de un grupo de 21 pacientes con EW, que pertenecen a un amplia serie clínica publicada por García-Villarreal *et al.* (2020). El reclutamiento de muestras de plasma y recogida de datos clínicos tuvo lugar en 2019 en el Complejo Hospitalario Insular Materno Infantil de Gran Canaria.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de todos los centros hospitalarios participantes. Asimismo, se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en los diferentes análisis.

En el reclutamiento de muestras de pacientes de ambas cohortes, se siguió el mismo procedimiento para la separación de plasma a partir de muestra de sangre periférica (6 ml) en tubo BD Vacutainer® con EDTA-K2. En primer lugar, tras la venopunción se dejó reposar el tubo en posición vertical al menos 30 minutos, y a continuación, en un plazo de máximo 2-3h durante el cual se mantuvo en condiciones de refrigeración, se centrifugó a 1900 g (3000 rpm; rotor oscilante) durante 10 minutos a 4 °C. La fracción de plasma (sobrenadante) se alicuotó en tubos estériles con rosca de 2 mL (entre 2-3 alicuotas de 500 µl/tubo) que se etiquetaron y almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para poder determinar que miRNAs están diferencialmente expresados en la cohorte de pacientes, se emplearon muestras de plasma de una cohorte de población control independiente. En ellas, se incluyeron individuos control sanos pareados por sexo y edad con el grupo de pacientes correspondiente. Estas muestras se solicitaron al Biobanco para la Investigación Biomédica y en Salud Pública de la Comunidad Valenciana (IBSP-CV) y fueron cedidas tras recibir la aprobación del Comité Ético y Científico de dicha institución.

Junto con la colección de muestras de plasma, fue proporcionada la información registrada en cuestionarios de salud de los individuos reclutados. En ella, se recogieron datos demográficos (sexo, edad, peso y talla) y se descartaron aquellas que asociaban neoplasias u otras enfermedades cardiovasculares, respiratorias, óseas, mentales y/o endocrinas.

### 5.2 Extracción de RNA total circulante

Para el aislamiento de RNA total circulante a partir de muestra de plasma y en particular para enriquecer la fracción de miRNAs, se utilizó el kit *miRNeasy Mini* (Qiagen). Se siguió el protocolo del fabricante para muestras de suero/plasma pero con algunas modificaciones para procesar 400 µl de plasma por individuo y columna de purificación del kit.

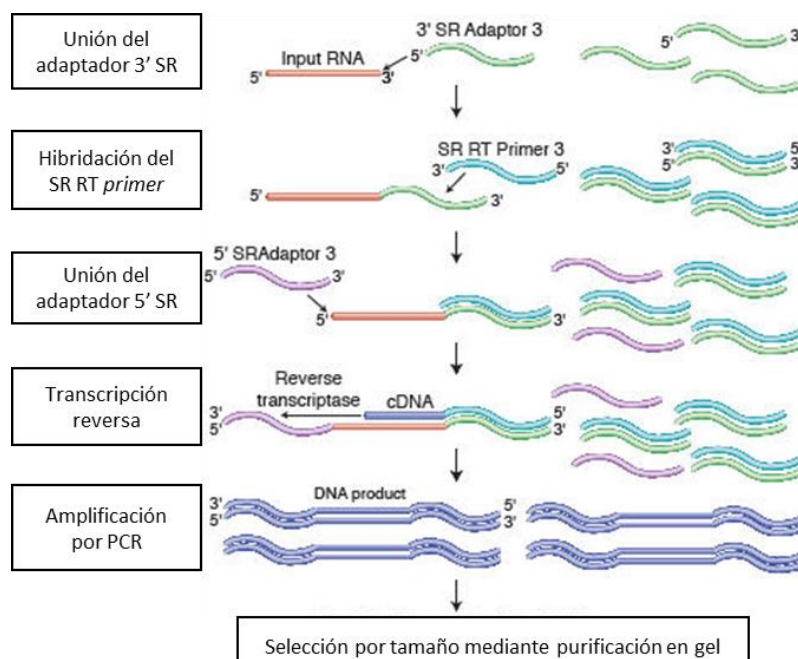
Por individuo, se descongela una alícuota de 500 µl de plasma en hielo, que se centrifuga a 16.000 g durante 5 minutos a 4 °C para descartar restos de células dañadas que puedan haber sido arrastrados de la separación de plasma. Evitando tocar el *pellet*, se recogen dos alícuotas de 200 µl de plasma que se tratan en paralelo con 1 ml de *Qiazol* (Qiagen) y 200 µl de cloroformo cada una, y se centrifugan a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. De cada tubo, se obtienen aproximadamente 600 µl de sobrenadante (fase acuosa), a la que se le añaden 900 µl de etanol absoluto. Tras mezclar bien con vortex, se pasan por la misma columna y se continúa con el protocolo de lavados y elución final indicado por el fabricante.

### 5.3 Preparación de librerías de small-RNA y secuenciación masiva

Se obtuvieron librerías individuales de RNAs de pequeño tamaño (small-RNA) con el kit *NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep* (New England Biolabs) compatibles con la plataforma de secuenciación Illumina.

En la Figura M1 se resumen los pasos a seguir para la preparación de librerías con este kit. En primer lugar se adiciona el adaptador 3' SR, seguido por un paso de hibridación del SR RT *primer* para la retrotranscripción y otro de ligación del adaptador 5' SR. Por último, tras retrotranscribir las moléculas de RNA a cDNA, se amplifican por PCR para aumentar su cantidad. En esta etapa tiene lugar la identificación de librerías con la introducción de índices, esto son secuencias cortas conocidas de 6 pb que forman parte de los *primers* empleados para la PCR. Se utilizaron 6 µl de muestra de RNA total circulante aislada de plasma de cada individuo. En general, se asume que este tipo de muestras presentan una cantidad total de RNA igual o inferior a 10 ng, por lo que es necesario optimizar el protocolo de preparación de librerías para minimizar la formación de dímeros de adaptadores y obtener un buen rendimiento de secuenciación de miRNAs. Las modificaciones que se llevaron a cabo con respecto al protocolo del fabricante consistieron en la dilución 1:5 de los adaptadores 3' y 5' SR y del SR RT *primer* así como el aumento de ciclos de PCR finales (16 ciclos en lugar de los 15 ciclos máximos recomendados).





**Figura M1: Esquema del protocolo de NEBNext para preparación de librerías de small-RNA.** El paso intermedio de hibridación del SR RT *primer* es una de las mejoras incluidas por el fabricante para evitar la formación de dímeros. Este *primer*, además de unirse a las moléculas de RNA, es capaz de capturar el exceso de moléculas de adaptador 3' SR libres para evitar que formen dímeros posteriormente con la adición del adaptador 5' SR.

Una vez amplificadas e indexadas las librerías por PCR, se realizó la selección por tamaño mediante electroforesis en geles *TBE PAGE 6% Novex* (Invitrogen) empleando el marcador de tamaños moleculares *Quick-Load pBR322 DNA-MspI Digest* (New England Biolabs). La electroforesis se llevó a cabo a 120 V durante una hora a temperatura ambiente en dilución 1X de tampón *TBE Novex* (Invitrogen). Tras la tinción del gel con *GelRed* (Biotium), se cortaron en un transiluminador las bandas correspondientes al tamaño de inserto de librería esperado, esto es, en torno a 140 pb para miRNAs y 150 pb para otros small-RNAs, que orientativamente migran a la misma altura que la banda de 147 pb del marcador de tamaños moleculares utilizado.

Tanto para la purificación de las librerías indexadas pre-gel y post-gel se empleó el kit *Nucleospin Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel) siguiendo los protocolos del fabricante para *clean-up* de PCR y purificación de DNA desde gel de poliacrilamida, respectivamente. Asimismo, se realizaron controles de calidad de las librerías indexadas pre y post-gel mediante electroforesis capilar automatizada en un equipo TapeStation 4200 con el kit *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Agilent Technologies).

Para generar el *pool* de librerías para secuenciación masiva, se cuantificaron individualmente las librerías indexadas y purificadas post-gel mediante qPCR con *KAPA Library Quantification Kit* (Kapa Biosystems) en un equipo LightCycler 480 II (Roche).

Finalmente, se envió el *pool* de librerías al Centro de Regulación Genómica (CRG) para su secuenciación en la plataforma Illumina HiSeq 2500 (1x50 pb, versión 4).

## 5.4 Análisis bioinformáticos

### 5.4.1 Análisis primario

De las lecturas generadas en la secuenciación y almacenadas en ficheros FASTQ, se eliminaron restos de adaptadores de librería y se realizó una selección por tamaño de lectura compatible con miRNAs maduros (entre 16-28 pb) con el programa Cutadapt. Con el programa FastQC se realizaron controles de calidad de los datos de secuenciación brutos y tras la eliminación de adaptadores, en este último caso para comprobar que la distribución y cantidad de lecturas en torno al tamaño esperado para miRNAs maduros era adecuada. Las lecturas seleccionadas se alinearon frente a las secuencias de referencia de miRNAs precursores (*hairpin*) anotados en la miRBase versión 22 mediante el algoritmo de Bowtie (versión 1.1.2). Para ello, se fijaron los siguientes parámetros descritos en la Tabla M2 para conseguir alineamientos únicos.

**Tabla M2: Parámetros utilizados para el alineamiento con Bowtie de lecturas de 16-28 pb frente a miRNAs precursores.**

Parámetro	Descripción
--best --strata	De entre los alineamientos identificados reportar sólo el mejor, es decir, aquel que contenga menor número de <i>mismatches</i> (bases no apareadas) en la secuencia semilla.
-y	Incrementar sensibilidad del alineamiento
-n 3 -l 15	No permitir alineamientos con más de 3 <i>mismatches</i> en las primeras 15 pb
-m 5	Descartar lecturas en las que se hayan identificado 5 o más alineamientos posibles.

Con el programa Subread (versión 1.6.0) se obtuvieron los recuentos de lecturas alineadas frente a los brazos 5p y 3p de cada miRNA precursor que corresponden al miRNA maduro. Para ello, se generó un fichero GFF customizado con la anotación de los miRNAs maduros recogidas en miRBase versión 22, con el fin de proporcionar al programa las coordenadas de las regiones en las que debe realizar el recuento.

#### 5.4.2 Análisis de representación diferencial y enriquecimiento funcional

Para la identificación de miRNAs maduros que pudieran estar diferencialmente representados en plasma entre los grupos experimentales establecidos (pacientes y controles) se utilizó el paquete *edgeR* (Robinson *et al.*, 2010). A partir del recuento de lecturas alineadas correspondientes a miRNAs maduros, se filtraron aquellos con baja representación, tras lo cual se definió el tamaño de librería de cada muestra, esto es, la suma total de conteos de miRNAs maduros de cada una. Dado que el tamaño de librería fluctúa entre muestras, se realizó un paso de normalización con el método TMM (*Trimmed Mean of M values*), en el que se definió un factor para escalar los tamaños de cada una para que fueran comparables entre sí. A continuación, se llevó a cabo un análisis exploratorio de los datos, consistente en la obtención de diferentes gráficos MDS (*Multidimensional Scaling*) y PCA (*Principal Component Analysis*), con el fin de comprobar que las muestras se agrupaban correctamente según el diseño experimental establecido y descartar así posible efecto *batch*. Para determinar qué miRNAs se encontraban diferencialmente representados entre pacientes y controles, se utilizaron los métodos QLF (*Quasi-Likelihood F Test*) y LRT (*Likelihood Ratio Test*), ambos basados en modelos lineales generalizados (GLM, *Generalized Linear Model*), que permiten incluir covariables experimentales para ajustar las comparaciones. En cada una de las comparaciones realizadas, se determinó como significativamente desregulados aquellos miRNAs con FDR (*False Discovery Rate*) <0,05.

Cada miRNA es capaz de regular la expresión de varios genes, y a su vez la expresión de un gen puede ser modulada por diferentes miRNAs. En este sentido, el análisis de enriquecimiento funcional surge como una estrategia que permite resumir la información acerca de las interacciones miRNA-gen, identificando mediante test de Fisher grupos de genes significativamente sobrerrepresentados implicados en una misma ruta o proceso biológico. Se utilizaron las herramientas web mirPath y miRWalk para análisis de enriquecimiento funcional en rutas y procesos biológicos anotados en la base de datos KEGG. En el caso de mirPath, se escogió el algoritmo microT-CDS para el que se fijó un umbral de 0,70 en la predicción de interacciones miRNA-gen, mientras que en miRWalk se tuvieron en cuenta las predicciones del algoritmo TargetScan con una probabilidad de unión del 95 %.

#### 5.5 Validación de miRNAs circulantes en plasma mediante qPCR

Para la obtención de cDNA molde mediante transcripción reversa, se utilizó el kit *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis* (Applied Biosystems). Este kit presenta la ventaja de que, a partir de una pequeña cantidad de RNA total circulante aislado de suero o plasma (2  $\mu$ l), se lleva a cabo un procedimiento de amplificación universal que permite la detección

de un amplio repertorio de miRNAs maduros presentes en la muestra. Para ello, se basa en la unión de colas poli-A y adaptador 5' a las moléculas de RNA previos al paso de transcripción reversa utilizando un *primer* universal. Por último, desde el cDNA sintetizado, se realiza una pre-amplificación para aumentar uniformemente el número de moléculas y mejorar la detección mediante qPCR.

Para cada miRNA seleccionado para validación, se llevó a cabo la amplificación por qPCR con las sondas (Tabla M3) y *master mix* de *TaqMan Advanced* (Applied Biosystems) en un equipo LightCycler 480 II (Roche). Los experimentos de qPCR se diseñaron para placas de 384, utilizando 2,5 µl de una dilución 1/10 del cDNA pre-amplificado en tampón TE 0,1X, y escalando el resto de componentes de la reacción a un volumen final de 10 µl. El programa de qPCR indicado por el fabricante se adaptó al equipo utilizado, y consistió en una pre-incubación inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 50 ciclos de amplificación, con desnaturalización a 95 °C de 10 segundos e hibridación de sonda y *primers* y extensión en un único paso a 60 °C de 30 segundos.

**Tabla M3: Sondas *TaqMan Advanced* utilizadas para la validación de miRNAs circulantes mediante qPCR**

miRNA	Referencia	Secuencia
hsa-miR-122-5p	477855_mir	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
hsa-miR-192-5p	478262_mir	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
hsa-miR-885-5p	478207_mir	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
hsa-miR-885-3p	479188_mir	AGGCAGCGGGGUGUAGUGGAUA
hsa-miR-485-3p	478125_mir	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU
hsa-miR-340-3p	478041_mir	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC
hsa-miR-193b-5p	478742_mir	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA
hsa-miR-455-5p	478113_mir	UAUGUGCCUUUGGACUACAUCG
hsa-miR-16-5p	477860_mir	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-484	478308_mir	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU
hsa-miR-191-5p	477952_mir	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG

Inicialmente, se escogieron miR-191-5p, miR-16-5p y miR-484 como miRNAs de referencia, ya que en diversas publicaciones han sido utilizados con dicha finalidad. Se comprobó su estabilidad en las muestras analizadas con los algoritmos *NormFinder* y *geNorm* incluidos en el paquete de R *NormqPCR*. El análisis mostró que la combinación miR-16-5p y miR-484 era la más estable, por lo que se utilizó la media de Ct (*cycle threshold*) de ambos para la normalización de la expresión de los miRNAs a validar. El nivel de expresión

relativa de cada miRNA en muestra de cada paciente con respecto a controles se calculó como  $2^{-(\Delta Ct \text{ Paciente} - \text{Media } \Delta Ct \text{ Controles})}$ , siendo  $\Delta Ct = Ct_{miRNA \text{ de interés}} - \text{Promedio } Ct_{miRNAs \text{ referencia}}$ .

## 5.6 Análisis estadísticos

Se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk si las variables bioquímicas seguían una distribución normal. Como no cumplían este criterio, se aplicó el test de Wilcoxon para establecer si existían diferencias significativas entre medias de cada variable entre grupos de pacientes. Siguiendo el mismo criterio, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman ( $R_s$ ) para determinar si existía asociación entre variables bioquímicas, la edad y la expresión relativa de cada miRNA.

En el caso de la expresión relativa de cada miRNA detectada mediante qPCR, para todos los análisis estadísticos ejecutados, ésta se expresó como logaritmo en base 2 ( $\log_2$ ). Para establecer comparaciones entre pacientes y controles, se aplicó el T-test para muestras pareadas. Cuando las comparaciones se establecían dentro de cada grupo (entre hombres y mujeres o pacientes con riesgo de progresión o no), se aplicaba el T-test para muestras independientes.

Con el fin de analizar la capacidad predictora de los miRNAs validados en el perfil para clasificar a los pacientes según si presentan factores riesgo de progresión de enfermedad hepática, se utilizaron modelos de regresión logística binaria. En ellos, se calcula la probabilidad de cada paciente de pertenecer a una de las categorías indicadas por la variable categórica en función de los valores indicados por la variable predictora. Posteriormente, se evaluó el rendimiento de cada modelo con el análisis de la curva ROC.



## ANEXOS





**Tabla 1:** Descripción clínica de pacientes de la serie H.U. i P. La Fe – H. Gral. U. Elx con mutaciones patológicas (P) / probablemente patológicas (PP) en *ATP7B*

Familia	Genotipo <i>ATP7B</i>	Paciente	Sexo	Edad		Presentación inicial	Signos clínicos	Seguimiento clínico	L1	L2
				Inicio	Diagnóstico					
fEW-08	p.R778W / p.S921N	EW08 <sup>a</sup>	W	22	23	Hepatic	Acute hepatic failure	Liver-transplanted	NA	NA
fEW-14	p.M645R / p.T977M	EW20	W	7	7	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission	8	4
		EW21	M	7	7	Hepatic	Hypertransaminasemia	No biochemical remission	7	3
fEW-15	c.4022G>T / c.(?-1627)_(51+1_52-1)del	EW24 <sup>a</sup>	W	22	23	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission	7	3
fEW-16	p.A1135Qfs*13 (homozygous)	EW25 <sup>a</sup>	W	11	13	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission	6	2
fEW-17	p.Q111* / p.L1120*	EW26 <sup>a</sup>	M	9	10	Hepatic	Hypertransaminasemia	No biochemical remission	10	6
		EW44 <sup>a</sup>	M	9	10	Hepatic	Hypertransaminasemia	No biochemical remission	10	6
fEW-19	p.Q111* / p.R778G	EW28	M	7	7	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission.	7	3
fEW-20	p.M645R / c.4124+5G>A	EW29	M	6	6	Hepatic	Hypertransaminasemia.	Biochemical remission	8	4
fEW-29	p.M645R / c.2447+1G>T	EW45 <sup>a</sup>	M	7	7	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission	10	6
fEW-30	p.H580Pfs*2 / p.H1069Q	EW46 <sup>a</sup>	W	21	22	Neurologic	Dystonia, postural tremor, dysarthria, dystonic gait, psychiatric symptoms.	Neurological improvement	9	5
		EW47	W	32	32	Family screening	Asymptomatic	Alive without complications		
fEW-31	p.M645R / c.4125-1G>C	EW49	W	9	17	Hepatic	Hypertransaminemia	Biochemical remission	10	6

**Tabla 1** (continuación)

Familia	Genotipo <i>ATP7B</i>	Paciente	Sexo	Edad		Presentación inicial	Signos clínicos	Seguimiento clínico	L1	L2
				Inicio	Diagnóstico					
fEW-33	c.1708-1G>A (homozygous)	EW54 <sup>a</sup>	M	33	35	Neurologic	Parkinsonian syndrome	Neurological improvement	8	4
fEW-36	p.I1311T / p.G1086Rfs*32+p.L1120*	EW58	M	33	33	Neurologic	Tremor, dystonia, dysarthria	No neurological improvement	12	8
fEW-37	c.1708-1G>A (homozygous)	EW62	M	16	18	Neurologic	Dystonia, psychiatric symptoms	No neurological improvement	11	7
fEW-38	p.M645R / p.R778W	EW65	M	45	48	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission	8	4
fEW-39	p.R778G / p.N1324S	EW66	W	15	15	Family screening	Asymptomatic	Asymptomatic	7	3
		EW67	M	7	7	Family screening	Asymptomatic	Asymptomatic	7	3
		EW68	W	9	9	Family screening	Asymptomatic	Asymptomatic	7	3
		EW69	W	5	5	Hepatic	Mild hypertransaminasemia	No biochemical remission	7	3
fEW-40	c.51+4A>T / p.L1120*	EW70	W	2	2	Family screening	Asymptomatic	Asymptomatic	7	3
		EW71	M	8	8	Hepatic	Hypertransaminasemia	No biochemical remission	9	5
fEW-44	p.G85V / p.H1069Q	EW77	W	17	18	Mixed	Acute hepatic failure Dystonia, psychiatric symptoms	Biochemical remission Neurological improvement	11	7
		EW90	W	25	27	Mixed	Hypertransaminasemia Dystonia, instability, dysarthria, dysphagia, psychiatric symptoms	Biochemical remission Neurological improvement	11	7
fEW-59	p.M645R / c.3061-12T>A	EW106	M	31	34	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission	8	4

Abreviaturas: W, *Woman*; M, *Man*; L1: Puntuación Leipzig con resultado genética, L2: Puntuación Leipzig sin resultado genética. <sup>a</sup> Descripción clínica previamente reportada en Rodríguez *et al.* (2012)

Tabla 1 (continuación)

Familia	Genotipo <i>ATP7B</i>	Paciente	Sexo	Edad		Presentación inicial	Signos clínicos	Seguimiento clínico	L1	L2
				Inicio	Diagnóstico					
fEW-65	c.4022G>T (homozygous)	EW178	M	13	14	Neurologic	Dystonia, tremor, dysarthria	Neurological improvement	11	7
fEW-66	c.-447C>T (homozygous)	EW182	W	3	3	Hepatic	Hypertransaminasemia	Biochemical remission	7	3
fEW-72	p.T935M / p.L1088*	EW190 <sup>a</sup>	M	39	40	Neurologic	Dystonia, dysphagia, instability, dysarthria	Neurological improvement	10	6
fEW-74	p.L1120* (homozygous)	EW193	M	3	4	Mixed	Hypertransaminasemia Dystonia, dysphagia, instability, dysarthria,	Liver transplantation Neurological improvement	NA	NA

Tabla 2: Descripción clínica de pacientes de la serie H.U. i P. La Fe – H. Gral. U. Elx sin mutaciones P/PP en *ATP7B*

Familia	Paciente	Sexo	Edad		Presentación inicial	Signos clínicos	Seguimiento clínico	Biopsia hepática	Comorbilidades	L2
			Inicio	Diagnóstico						
fEW-12	EW13	M	22	22	Hepatic	Hypertransaminasemia. Mild abdominal pain. Asthenia.	Improvement of tests related to hepatic function but without a full remission.	Minimal inflammatory changes. Copper: 465 µg/g	---	6
fEW-18	EW27	M	9	33	Hepatic	Hypertransaminasemia	Improvement of tests related to hepatic function but without a full remission.	Diffuse hepatic steatosis. Copper: 781 µg/g	Dyslipidemia	4
fEW-60	EW110	M	5	29	Mixed	Hypertransaminasemia Extrapiramidalism	Almost full remission of the neurological signs. Hypertransaminasemia.	Minimal histological changes of inflammation. Copper: 2,057 µg/g	Hypertension	5
	EW111	W	8	35	Mixed	Hypertransaminasemia Hepatomegaly Extrapiramidalism	Remission of hepatic and neurological manifestations. Mild psychiatric disturbances.	Mild steatosis. No anatomopathologic changes associated with WD	Coeliac disease	2

Abreviaturas: W, *Woman*; M, *Man*; L2: Puntuación Leipzig sin resultado genética.

**Tabla 1:** Variantes detectadas en *ATP7B* mediante secuenciación directa (Sanger) y MLPA, con posible efecto deletéreo y MAF <1 % en gnomAD

Variantes de cambio de aminoácido, cambio de pauta de lectura y/o generación de codón de parada temprano											
Exon/ Intron	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Dominio	dbSNP	Frecuencia alélica gnomAD	Polyphen-2	SIFT	PROVEAN	Bibliografía	ACMG	Criterios ACMG
E2	c.98T>C	p.M33T	Before Cu1	rs184868522	180/280858	0,025	0,13	-1,64	(Squitti <i>et al.</i> , 2014)	VUS - PB	PM3,BP4
E2	c.254G>T	p.G85V	Cu1	rs786204643	-	1	0,001	-6,90	(Loudianos <i>et al.</i> , 1998)	P	PS3,PM1,PM2, PM3,PP1,PP3
E2	c.331C>T	p.Q111*	Cu1	rs774221179	3/246096	-	-	-	(Loudianos <i>et al.</i> , 1998)	P	PVS1,PM2,PM3
E2	c.482T>C	p.I161T	Cu2	rs531199827	19/249424	1	0,011	-4,21	Este estudio	VUS - PP	PM1,PM3,PP3
E5	c.1739delA	p.H580Pfs*2	Cu6	rs1555293357	-	-	-	-	(Lepori <i>et al.</i> , 2012)	P	PVS1,PM1,PM2, PM3,PP1
E6	c.1922T>C	p.L641S	Before TM2	rs186924074	130/280986	1	0	-4,76	(Loudianos <i>et al.</i> , 1998)	PP	PS3,PM3,PP3, PP5
E6	c.1934T>G	p.M645R	Before TM2	rs121907998	133/280976	0	0,58	0,43	(Margarit <i>et al.</i> , 2005)	PP	PM3,PP1-S,PP5
E7	c.1993A>G	p.M665V	Before TM2	rs146303208	184/280588	0,16	0,041	-2,64	-	VUS - sin evidencias suficientes	PM2,PP3
E7	c.1995G>A	p.M665I	Before TM2	rs72552259	408/280594 (1 hom)	0,16	0,021	-2,41	(Collet <i>et al.</i> , 2018)	PB	PM3,BP4,BS1
E7	c.2069C>T	p.P690L	TM2	rs1555291809	-	1	0,001	-8,22	(Margarit <i>et al.</i> , 2005)	PP	PM1,PM2,PM3,P P3
E8	c.2123T>C	p.L708P	TM2	rs121908000	1/31400	0,74	0,001	-3,56	(García-Villarreal <i>et al.</i> , 2000)	P	PM1,PM2,PM3, PP1-S,PP3
E8	c.2126delT	p.L709Pfs*14	TM2	Novel	-	-	-	-	Este estudio	P	PVS1,PM1,PM2, PM3
E8	c.2218G>C	p.A740P	TM3	Novel	-	1	0,003	-3,72	Este estudio	PP	PM1, PM2, PM3, PP3

P: patológica, PP: probablemente patológica, VUS: *Variant of Unknown Significance*, B: benigna, PB: probablemente benigna; Polyphen-2: 1 (probablemente deletérea), 0 (benigna); SIFT: 0 (deletérea), > (tolerada); PROVEAN: < -2,5 (deletérea); ACMG: *American College of Medical Genetics*; HGVS: *Human Genome Variation Society*; Hom: homocigoto

Tabla 1 (continuación)

Variantes de cambio de aminoácido, cambio de pauta de lectura y/o generación de codón de parada temprano											
Exon/ Intron	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Dominio	dbSNP	Frecuencia alélica gnomAD	Polyphen-2	SIFT	PROVEAN	Bibliografía	ACMG	Criterios ACMG
E8	c.2303C>T	p.P768L	TM4	rs1057516844	-	1	0	-8,06	(Brage <i>et al.</i> , 2007)	PP	PM1,PM2,PP3,PP5
E8	c.2304dupC	p.M769Hfs*26	TM4	rs193922103	32/280946	-	-	-	(Cocoş <i>et al.</i> , 2014)	P	PVS1,PM1,PM3,PP1
E8	c.2305A>G	p.M769V	TM4	rs193922103	20/280946	1	0	-3,23	(Thomas <i>et al.</i> , 1995)	P	PS3,PM1,PM3,PP3,PP5
E8	c.2332C>T	p.R778W	TM4	rs137853284	13/246100	1	0	-6,45	(Shah <i>et al.</i> , 1997)	P	PS3,PM1,PM3,PP3,PP5
E8	c.2332C>G	p.R778G	TM4	rs137853284	2/246100	1	0	-5,64	(Figus <i>et al.</i> , 1995)	P	PS3,PM1,PM2,PM3,PP1-S,PP3,PP5
E8	c.2333G>T	p.R778L	TM4	rs28942074	37/280796	1	0	-5,64	(Thomas <i>et al.</i> , 1995)	P	PS3,PM1,PM3,PP3,PP5
E8	c.2335T>G	p.W779G	TM4	rs751798708	-	1	0,001	-10,48	(Hofer <i>et al.</i> , 2012)	PP	PM1,PM2,PM3,PP3,PP5
E12	c.2762G>A	p.S921N	TM5	rs1230241288	-	1	0,002	-2,68	(Loudianos <i>et al.</i> , 1998)	PP	PM1,PM2,PM3,PP3,PP5
E12	c.2804C>T	p.T935M	TM5	rs750019452	45/276934	1	0	-5,56	(Lepori <i>et al.</i> , 2007)	PP	PM1,PM3,PP3,PP5
E13	c.2930C>T	p.T977M	TM6	rs72552255	25/277122	1	0,001	-5,18	(Margarit <i>et al.</i> , 2005)	P	PS3,PM1,PM3,PP1,PP3,PP5
E13	c.2998G>A	p.G1000R	TM6	rs751078884	9/244084	1	0	-7,15	(Cox <i>et al.</i> , 2005)	P	PS3,PM1,PM2,PM3,PP3,PP5
E14	c.3092C>T	p.T1031I	P-domain	Novel	-	1	0	-5,62	Este estudio	PP	PM1,PM2,PM5,PP3
E14	c.3139G>T	p.D1047Y	P-domain	rs1441316018	1/249224	1	0,004	-5,55	Este estudio	PP	PM1,PM2,PM3,PM5,PP3
E14	c.3190G>A	p.E1064K	N-domain	rs376910645	1/249354	1	0	-3,75	(Figus <i>et al.</i> , 1995)	P	PS3,PM1,PM2,PM3,PP3,PP5
E14	c.3207C>A	p.H1069Q	N-domain	rs76151636	286/280766	1	0	-7,50	(Tanzi <i>et al.</i> , 1993)	P	PS3,PM1,PM3,PP1-M,PP3,PP5

Anexo II

Variantes de cambio de aminoácido, cambio de pauta de lectura y/o generación de codón de parada temprano											
Exon/ Intron	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Dominio	dbSNP	Frecuencia alélica gnomAD	Polyphen-2	SIFT	PROVEAN	Bibliografía	ACMG	Criterios ACMG
E15	c.3254dupC	p.E1086Rfs*32	N-domain	Novel	-	-	-	-	Este estudio	P	PVS1,PM1,PM2, PM3
E15	c.3263T>A	p.L1088*	N-domain	rs753250853	2/246216	-	-	-	(Deguti <i>et al.</i> , 2004)	P	PVS1,PM1,PM2,PM 3,PP5
E15	c.3295G>A	p.G1099S	N-domain	rs761632029	2/249584	0,94	0,017	-5,12	(Loudianos <i>et al.</i> , 2000)	PP	PM1,PM2,PM3, PP1,PP3,PP5
E15	c.3359T>A	p.L1120*	N-domain	-	-	-	-	-	(Margarit <i>et al.</i> , 2005)	P	PVS1,PM1,PM2,PM 3,PP1-M
E15	c.3402delC	p.A1135Qfs*13	N-domain	rs137853281	18/276956	-	-	-	(Paradisi <i>et al.</i> , 2015)	P	PVS1,PM1,PM3
E16	c.3451C>T	p.R1151C	N-domain	rs755554442	14/249588	1	0	-7,09	(Lepori <i>et al.</i> , 2007)	P	PS3,PM1,PM3, PP3,PP5
E16	c.3556G>A	p.G1186S	N-domain	rs786204547	2/249580	0,99	0,045	-3,50	(Yamaguchi <i>et al.</i> , 1998)	P	PS2,PM1,PM2, PM3,PP3,PP5
E17	c.3646G>A	p.V1216M	N-domain	rs776280797	24/280998	1	0,001	-2,64	(Loudianos <i>et al.</i> , 1998)	PP	PM1,PM3,PP3, PP5
E17	c.3694A>C	p.T1232P	N-domain	rs568009639	1/249572	0,93	0,12	-2,93	(Deguti <i>et al.</i> , 2004)	PP	PM1,PM2,PM3, PP3,PP5
E18	c.3809A>G	p.N1270S	N-domain	rs121907990	55/280972	1	0	-4,54	(Tanzi <i>et al.</i> , 1993)	P	PS3,PM1,PM3, PP3,PP5
E19	c.3932T>C	p.I1311T	TM7	-	-	1	0,001	-4,37	(Huarte-Muniesa <i>et al.</i> , 2014)	PP	PM1,PM2,PM3, PP3,PP5
E19	c.3938T>G	p.L1313R	TM7	-	-	1	0	-5,45	(Huarte-Muniesa <i>et al.</i> , 2014)	PP	PM1,PM2,PM3, PM5,PP3,PP5
E19	c.3971A>G	p.N1324S	TM7	rs760285767	1/246252	1	0	-4,54	(Bost <i>et al.</i> , 2012)	P	PM1,PM2,PM3, PP1-S,PP3,PP5
E20	c.4085C>T	p.S1362F	TM8	Novel	-	1	0	-5,33	Este estudio	PP	PM1,PM2,PM3, PM5,PP3
E21	c.4135C>T	p.P1379S	After TM8	rs181250704	311/278336 (1 hom)	1	0,003	-5,06	(Cox <i>et al.</i> , 2005)	B	PM3,PP3,BS1,BS3

Tabla 1 (continuación)

Variantes de cambio de aminoácido, cambio de pauta de lectura y/o generación de codón de parada temprano											
Exon/ Intron	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Dominio	dbSNP	Frecuencia alélica gnomAD	Polyphen-2	SIFT	PROVEAN	Bibliografía	ACMG	Criterios ACMG
E21	c.4301C>T	p.T1434M	3'-COOH	rs60986317	581/280930 (1 hom)	0,89	0,093	-1,62	(Hsi <i>et al.</i> , 2004)	B	BS1,BS3,BP4
Variantes de sitio de <i>splicing</i>											
Exon/ Intron	HGVS cDNA	Dominio	dbSNP	Frecuencia alélica gnomAD	NetGene2	Human Splicing Finder	NNSplice	SpliceView	Bibliografía	ACMG	Criterios ACMG
I1	c.51+4A>T	Before Cu1	rs369488210	4/249336	No reconoce <i>WT/cryptic donor site</i>	Pérdida <i>WT donor site</i>	No reconoce <i>WT/cryptic donor site</i>	Puntuación <i>WT donor site</i> disminuye a 81	(Lovicu <i>et al.</i> , 2009)	P	PS3,PM2,PM3, PP1,PP3,PP5
I2	c.1285+5G>T	After Cu4	rs370579582	16/280466	Pérdida <i>WT donor site</i>	Pérdida <i>WT donor site</i>	Pérdida <i>WT donor site</i>	Puntuación <i>WT donor site</i> disminuye a 77	(Loudianos <i>et al.</i> , 1998)	PP	PM2,PM3,PP3,PP5
I4-E5	c.1708-1G>A	Cu6	rs137853280	2/249468	Pérdida <i>WT acceptor site</i>	Pérdida <i>WT acceptor site</i>	Reconoce <i>cryptic acceptor site</i>	Pérdida <i>WT acceptor site</i>	(Margarit <i>et al.</i> , 2005)	PP	PM2,PM3,PP3, PP5
I9	c.2447+1G>T	Before Td	rs1057516732	-	Pérdida <i>WT acceptor site</i>				(Loudianos <i>et al.</i> , 2003)	PP	PM1,PM2,PM3, PP3,PP5
I13-E14	c.3061-12T>A	P-domain	rs1045194246	1/245682	Puntuación <i>WT acceptor site</i> disminuye a 47	Pérdida <i>WT acceptor site</i>	Puntuación <i>WT acceptor site</i> disminuye a 18	Puntuación <i>WT acceptor site</i> disminuye a 78	(Loudianos <i>et al.</i> , 2002)	P	PS3,PM1,PM2, PM3,PP1-S,PP5
E20	c.4022G>T	TM7	-	-	Sin cambios	Pérdida <i>ESE site/Reconoce nuevo ESS site</i>	Puntuación <i>WT donor site</i> disminuye a 95	Puntuación <i>WT donor site</i> disminuye a 87	(Cox <i>et al.</i> , 2005)	P	PS3,PM1,PM2, PM3,PP3,PP5
I20	c.4124+5G>A	TM8	rs1321980462	-	Puntuación <i>WT donor site</i> disminuye a 24	Pérdida <i>WT donor site</i>	Puntuación <i>WT donor site</i> disminuye a 43	Pérdida <i>WT acceptor site</i>	(Li <i>et al.</i> , 2011)	PP	PM1,PM2,PM3, PP3
I20-E21	c.4125-1G>C	TM8	Novel	-	Pérdida <i>WT acceptor site</i>				Este estudio	PP	PM1,PM2,PM3, PP3

*Donor site*: sitio de *splicing* 5', *Acceptor site*: sitio de *splicing* 3', *Cryptic donor site*: sitio de *splicing* 5' alternativo, *Cryptic acceptor site*: sitio de *splicing* 3' alternativo, ESE: elemento activador de *splicing* (*Exonic Splicing Enhancer*), ESS: elemento silenciador de *splicing* (*Exonic Splicing Silencer*); Hom: homocigoto

**Tabla 1** (continuación)

Otras variantes regulatorias						
Exon/ Intron	HGVS cDNA	dbSNP	Frecuencia alélica gnomAD	Bibliografía	ACMG	Criterios ACMG
promotor	c.-1059G>A	rs201534348	184/282542	-	VUS - sin evidencias suficientes	PM2
promotor	c.-447C>T	Novel	-	Este estudio	PP	PM1,PM2,PM3
promotor	c.-436_-422del15	rs1484840087	-	(Loudianos <i>et al.</i> , 1999b)	P	PS3,PM2,PM3,PP1-S,PP5
promotor	c.-412G>T	rs1041288679	-	-	VUS - sin evidencias suficientes	PM2,PP3
promotor	c.-362C>T	rs1448203832	-	-	VUS - sin evidencias suficientes	PM2
E1	c.(?_-1627)_(51+1_52-1)del	-	1/21694	(Badenas Orquin, 2011)	P	PVS1,PM2,PM3

ACMG: American College of Medical Genetics; HGVS: Human Genome Variation Society; P: patológica, PP: probablemente patológica, VUS: Variant of Unknown Significance, B: benigna, PB: probablemente benigna; Polyphen-2: 1 (probablemente deletérea), 0 (benigna); SIFT: 0 (deletérea), > (tolerada); PROVEAN: < -2,5 (deletérea); Donor site: sitio de splicing 5', Acceptor site: sitio de splicing 3', Cryptic donor site: sitio de splicing 5' alternativo, Cryptic acceptor site: sitio de splicing 3' alternativo, ESE: elemento activador de splicing (Exonic Splicing Enhancer), ESS: elemento silenciador de splicing (Exonic Splicing Silencer)



**Tabla 1:** Variantes candidatas identificadas en secuenciación de exoma de la familia fEW-12

Genotipo					Posición cromosómica	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Gen	dbSNP	Frecuencia gnomAD	HPA expression data	OMIM & Bibliografía	SIFT	Polyphen-2	PROVEAN
EW13	EW14	EW15	EW16	EW17											
0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1:110882829	c.802C>T	p.P268S	<i>RBM15</i>	-	Novel	Broad expression, only high in bone marrow	Megakaryoblastic leukemia, acute	0.243 (tolerated)	0.024 (benign)	-0.65 (neutral)
0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1:112319850	c.1564G>A	p.E522K	<i>KCND3</i>	rs749559538	3/282704	Low-no expression in liver	Brugada syndrome 9, Spinocerebellar ataxia 19	0.128 (tolerated)	0.037 (benign)	-0.30 (neutral)
0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	1:155792148	c.817C>T	p.L273F	<i>GON4L</i>	rs763400614	3/251484	Ubiquitous expression	-	0.047 (damaging)	1 (prd)	-2.05 (neutral)
0/1	0/0	0/0	0/1	0/0	7:150725631	c.29T>C	p.I10T	<i>ABC88</i>	rs147666778	24/281388	Ubiquitous expression	-	0.082 (tolerated)	0.008 (benign)	-0.05 (neutral)
0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	7:150731655	c.679A>G	p.M227V		rs548650554	Novel			0.058 (tolerated)	0.031 (benign)	-1.91 (neutral)
0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	10:47700943	c.1519C>T	p.P507S	<i>ANTXRL</i>	rs1270550810	Novel	Biased expression in testis	-	0.583 (tolerated)	-	-1.90 (neutral)
0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	11:6290931	c.184G>A	p.A62T	<i>CCKBR</i>	rs141038981	13/282670	Biased expression in brain, pancreas and stomach	-	0.084 (tolerated)	0.016 (benign)	-1.04 (neutral)
0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	11:6292446	c.1017T>C	p.V339=		rs767203414	6/250954			-	-	-
0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	15:92706069	c.1837G>A	p.A613T	<i>SLCO3A1</i>	rs747357449	3/251374	Broad expression	-	0.074 (tolerated)	1 (PrD)	-2.37 (neutral)
0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	16:1263908	c.4906A>G	p.M1636V	<i>CACNA1H</i>	rs371096587	7/276042	Low expression in liver	Epilepsy (susceptibility to), Hyperaldosteronism familial type IV	0.129 (tolerated)	0 (benign)	-2.85 (deleterious)
0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	16:15719419	c.1763A>C	p.E588A	<i>KIAA0430</i>	rs779224434	6/249534	Low-no expression in liver	-	0.103 (tolerated)	1 (PrD)	-1.40 (neutral)

Tabla 1 (continuación)

Genotipo					Posición cromosómica	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Gen	dbSNP	Frecuencia gnomAD	HPA <i>expression data</i>	OMIM & Bibliografía	SIFT	Polyphen-2	PROVEAN
EW13	EW14	EW15	EW16	EW17											
0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	19:13035338	c.1198A>G	p.I400V	FARSA	rs759410011	11/250754	Ubiquitous expression		0.365 (tolerated)	0.226 (benign)	-0.74 (neutral)
0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	19:16178448	c.14A>G	p.K5R	TPM4	rs753304129	3/250434	Ubiquitous expression, medium expression in hepatocytes	-	0.010 (damaging)	1 (PrD)	-1.71 (neutral)
0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	20:7982177	c.304C>G	p.R102G	TMX4	rs781211047	Novel	Low expression in liver	-	0.002 (damaging)	1 (PrD)	-6.59 (deleterious)

Abreviaturas: HPA, *Human Protein Atlas*; OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; PrD, *Probably Damaging*; Genotipos: 0/1, heterocigosis; 0/0, ausente.

**Tabla 2:** Variantes candidatas identificadas en secuenciación de exoma de la familia fEW-18

Genotipo			Posición cromosómica	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Gen	dbSNP	Frecuencia gnomAD	HPA <i>expression data</i>	OMIM & bibliografía	HSF	NNSplice	NetGene2	SpliceView
EW27	EW195	EW196												
0/1	0/0	0/0	7:155094129	c.704+2T>G	-	<i>INSIG1</i>	-	Novel	High expression in liver	-	Broken WT donor site	Broken WT donor site	Broken WT donor site	NA
Genotipo			Posición cromosómica	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Gen	dbSNP	Frecuencia gnomAD	HPA <i>expression data</i>	OMIM & bibliografía	SIFT	Polyphen-2	PROVEAN	
EW27	EW195	EW196												
0/1	0/0	0/0	1:152191878	c.2227G>A	p.G743R	<i>HRNR</i>	rs370605400	2/251496	Low expression in liver	-	0.883 (tolerated)	0.74 (PoD)	-1.60 (neutral)	
0/1	0/0	0/0	3:100455465	c.626G>A	p.S209N	<i>TFG</i>	-	Novel	Liver not detected, gallbladder detected protein	HSP57 (AR) HSMN (AD)	0.063 (tolerated)	0.98 (PrD)	-1.27 (neutral)	
0/1	0/0	0/0	3:120067631	c.460C>G	p.Q154E	<i>LRRC58</i>	rs748624560	3/231870		-	0.069 (tolerated)	0.028 (benign)	-1.23 (neutral)	
0/1	0/0	0/0	3:122134284	c.92A>G	p.Y31C	<i>WDR5B</i>	rs1485909198	3/251480	Hepatocytes medium expression protein	-	0 (damaging)	1 (PrD)	-6.72 (deleterious)	
0/1	0/0	0/0	4:89378683	c.263C>T	p.P88L	<i>HERC5</i>	rs770615525	8/47708	Low expression in liver	-	0.020 (damaging)	0.01 (benign)	-3.98 (deleterious)	
0/1	0/0	0/0	4:156874920	c.80C>A	p.A27D	<i>CTSO</i>	rs938408508	3/35954	Hepatocytes low protein, bile ducts medium protein, gallbladder high protein	-	0.024 (damaging)	0.42 (benign)	0.08 (neutral)	
0/1	0/0	0/0	5:13737504	c.11312C>T	p.T3771I	<i>DNAH5</i>	rs545183484	3/251446	Very low expression in liver	Ciliary dyskinesia type 3, Kartagener syndrome (AR)	0.053 (tolerated)	0.572 (PoD)	-4.66 (deleterious)	
0/1	0/0	0/0	6:43033379	c.565A>T	p.T189S	<i>KLC4</i>	-	Novel	Medium-high expression in liver, hepatocyte low protein, bile duct medium protein, gallbladder high protein	HSP (1 family, AR)	0.719 (tolerated)	0 (benign)	0.4 (neutral)	

Anexo III  
**Tabla 2** (continuación)

Genotipo			Posición cromosómica	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Gen	dbSNP	Frecuencia gnomAD	HPA <i>expression data</i>	OMIM & bibliografía	SIFT	Polyphen-2	PROVEAN
EW27	EW195	EW196											
0/1	0/0	0/0	6:43266179	c.83G>C	p.R28P	<i>SLC22A7</i>	-	Novel	Biased expression in liver and kidney, hepatocytes high protein	-	0.006 (damaging)	1 (PrD)	-4.97 (deleterious)
0/1	0/0	0/0	6:52761627	c.646G>A	p.A216T	<i>GSTA3</i>	rs1031250782	2/251348	Low-no expression in liver	-	0.040 (damaging)	0.017 (benign)	-1.89 (neutral)
0/1	0/0	0/0	6:54208093	c.694C>T	p.H232Y	<i>TINAG</i>	rs371620355	4/269568	Biased expression in kidney	Chronic renal failure (childhood-onset)	0.003 (damaging)	0.983 (PrD)	-3.16 (deleterious)
0/1	0/0	0/0	9:32550885	c.85C>T	p.R29W	<i>TOPORS</i>	rs376234365	3/243156	Ubiquitous expression	Retinitis pigmentosa 31 (AD)	0 (damaging)	1 (PrD)	-0.39 (neutral)
0/1	0/0	0/0	11:64937723	c.17C>T	p.P6L	<i>SPDYC</i>	-	Novel	Biased expression in liver	-	0.003 (damaging)	0.90 (PoD)	-1.45 (neutral)
0/1	0/0	0/0	16:71483474	c.454G>A	p.D152N	<i>ZNF23</i>	-	Novel	Ubiquitous expression	-	0.558 (tolerated)	0.027 (benign)	1.18 (neutral)
0/1	0/0	0/0	17:80933374	c.85C>T	p.P29S	<i>C17orf59</i>	rs907306609	4/180082	Hepatocytes low protein, gallbladder medium protein	-	0.099 (tolerated)	0.352 (benign)	-1.21 (neutral)
0/1	0/0	0/0	17:56343597	c.1603C>T	p.R535C	<i>LPO</i>	rs372987674	8/251412	Biased expression in salivary gland	-	0.001 (damaging)	1 (PrD)	-5.55 (deleterious)
0/1	0/0	0/0	17:77758461	c.1219G>A	p.D407N	<i>CBX2</i>	rs782222190	8/244196	Low-no expression in liver	-	0.112 (tolerated)	0.017 (benign)	-1.00 (neutral)
0/1	0/0	0/0	18:28991212	c.2213A>T	p.Y738F	<i>DSG4</i>	-	Novel	Low-no expression in liver	Hypotrichosis (AR)	0.102 (tolerated)	1 (PrD)	-2.45 (neutral)
0/1	0/1	0/0	20:10622221	c.2803G>C	p.E935Q	<i>JAG1</i>	-	Novel	Ubiquitous expression	Allagile syndrome (AD)	0.037 (damaging)	0.80 (PoD)	-1.62 (neutral)
0/Y	0/1	0/1	X:86773180	c.284A>C	p.N95T	<i>KLHL4</i>	-	Novel	Low expression in liver	-	0.139 (tolerated)	0.002 (benign)	-0.61 (neutral)

Abreviaturas: HPA, *Huma Protein Atlas*; OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; HSF, *Human Splicing Finder*; AR, Autosómico recesivo; AD, Autosómico dominante; PrD, *Probably Damaging*; PoD, *Possibly Damaging*; NA, No disponible; Genotipos: 0/1, heterocigosis; 0/0, ausente; 1/Y, hemicigosis.

**Tabla 1:** Lista de 64 genes relacionados con *ATP7B*, metabolismo del cobre y otros metales, incluidos en el filtrado de variantes de exoma para estudio de modificadores genéticos.

<b>Metabolismo del cobre y estrés oxidativo</b>
<i>ABCB1, APP, ATOX1, ATP7A, CAT, CCS, COMMD1, COX17, CP, GCLC, GCLM, GPX1, GSR, GSS, GSTP1, HMOX, HSPA1A, HSPA6, MAT1A, MAT2A, MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1H, MT1L, MT1X, MT2A, MTF1, SLC11A2, SLC30A1, SLC31A1, SLC31A2, SOD1, SOD2</i>
<b>Tráfico intracelular de <i>ATP7B</i></b>
<i>ACTB, C16orf62, CCDC22, CCDC93, COPA, CTTN, MYH14, MYH6, MYH9, MYO1B, MYO5A, MYO5B, PACSIN3, SNX18, SNX9</i>
<b>Transportadores de metales</b>
<i>ABCA12, ABCC1, ABCC2, SCO1, SLC22A1, SLC22A3, SLC47A1</i>
<b>Otros genes estudiados como posibles modificadores genéticos en enfermedad de Wilson</b>
<i>AP1S1, APOE, XIAP, MTHFR, PNPLA3, SLC30A10, SLC33A1</i>



**Tabla 1: Primers diseñados para amplificar y secuenciar la región promotora, exones codificantes y regiones intrónicas flanqueantes de *ATP7B* (NM\_000053.3).** Condiciones estándar de amplificación con la *Taq BIOTOOLS* excepto para amplificar la región promotora, para la cual se añade  $MgCl_2$  (1 mM) y DMSO al 5%.

Amplificación	Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	T <sub>a</sub> (°C)	Primer secuenciación
Promotor 1	525	GTAACAGATTATCAAAAAGCAGAGG TGCCTGTGCAAGTTGTTG	60	Directo y reverso
Promotor 2	593	TAGATTCATGACAAGGAAGGCCATT GTCCCAAAGGAAGCAACCG	60	Reverso
Promotor 3	488	CACCTCCCCACTAGAAGC AGTGCCACCCTGGAAC	60	Reverso
Promotor 4	414	AGACCGCGGAGGAGGACA CGAATTCTTCTGATCTGGCTCA	60	Directo
Exón 1	510	ACTCTCCCCTCACGCTCT AACATCAGTTGACGGCACA	60	Reverso
Exón 2.1	545	TGACACCAGTGGCATTGT TGCCTTCAATGGAGCTGA	55	Reverso
Exón 2.2	560	CAGATTGCAGAAGGAAAGG CCACTGGGCTGGTACAAGAAG	60	Reverso
Exón 2.3	568	GCATTGTAAGTCTTGCGTCTTG CCTATACCACCATCCAGGAGC	60	Reverso
Exón 3	473	GGACAATGAACCCCTACCAA TGAACTTGCTACCTGGTTATCAG	60	Reverso
Exón 4	530	GGATTCTGGGAAGATGTGTTTC ACTCCTGCAGCTCACCATCT	60	Directo
Exón 5_2	690	TTGGCTGTCTCTGTACCTGT CCTATGTACAGGGTATCTTGACAA	55	Con primer E5-d
Exón 6	321	CCACAAAGTCTACTGAGGCACTT AGCTAATCCAGGAGGAAGGC	62	Reverso
Exón 7	632	TCAGATGGCCAGTGTGAGA CAAGGAGGTTGCTATTCCA	60	Directo
Exón 8	567	ATAAACGCCATCACAGAGG GGGATTTGAGAAGTAGTGACCAA	60	Directo
Exón 9	308	TCTCGCACCAGCTGTCTCTA TCTCTGCCACACTCACAAG	62	Directo
Exón 10	353	CAGCTGGCCTAGAACCTGAC CAATTACAGTGCTTCCGGGT	60	Directo
Exón 11	592	TACCATGGCTGATGAGTCC TCCATACCACCAACGTCAA	60	Directo

T<sub>a</sub>: temperatura de *annealing*

Tabla 1 (continuación)

Amplicón	Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	T <sub>a</sub> (°C)	Primer secuenciación
Exón 12	478	TGTGAAGAGTTCTGGGAAATCA CCTGCAGAAGGAGAGTGACTG	60	Directo
Exón 13	537	GACTCTGCTCTGTAATGCCT ACTGCTGTCTTGAGTGGCTCT	60	Directo
Exón 14	592	TTGAACGACAGAGGATCACG TCCCACTCCTGTTGTTCTCC	60	Directo
Exón 15	413	TTCTCTCAGTTCCCGCTTTC CTTAGCCATGAACCGTCTGC	60	Directo
Exón 16	649	GACAAAGACGGACATTGCCT CAAGGAGACTGAGGCCAGAC	62	Con primer E16_seq-d
Exón 17	655	TCACTCGTAATCCTATTCTTGG ATTGCAAAGACTGGGAAACG	60	Reverso
Exón 18	528	CAGGAGCCAGGGATAAACTG AGGTTGATGCGTATCCTTCG	60	Reverso
Exón 19	514	CAGGCAGACATGGGTGTG AGCCAAGCATCTCCACTAGC	60	Directo
Exón 20	405	CACTCAACAGCATCCCACAC GAATGGGAAATGAGAGGCAA	60	Directo
Exón 21	485	AGATGGATGAGAGGCCTTCA TATCCAGGGAGCGGAAGTC	60	Reverso

T<sub>a</sub>: temperatura de *annealing*

**Tabla 2: Primers diseñados para amplificar y secuenciar región 5'UTR, exones codificantes y regiones intrónicas flanqueantes de *CCDC115* (NM\_032357.3) y *TMEM199* (NM\_152464.2).** Condiciones estándar de amplificación con la *Taq BIOTOOLS* excepto para amplificar región 5'UTR y Exón 1 de *TMEM199*, para lo cual se añade MgCl<sub>2</sub> (1 mM) y DMSO al 3%.

Amplicones <i>CCDC115</i>	Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	T <sub>a</sub> (°C)	Primer secuenciación
5'UTR y Exón 1	544	CCACTCTCCCTCAACCAAA GGAGAGGAAAGCGGTGAGA	60	Directo
Exón 2 y Exón 3	675	CAGATCTGGAGGTGTGTCCA CCCAGTGTAAGCAACTCACC	60	Reverso
Exón 4	373	GTTTCCTGGAACCCCAAAG CCTTTCACAGACTAACCCAG	60	Directo
Exón 5	577	TAAGGCCTCAGAGGTTCTGG GTGATCCAAGAGGCAGTTCC	60	Directo



Tabla 2 (continuación)

Amplicones <i>TMEM199</i>	Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	T <sub>a</sub> (°C)	Primer secuenciación
5'UTR y Exón 1	623	GCTGTACAGGCTGCCATGT CACGAGAAATCCCATGGG	60	Reverso
Exón 2 y Exón 3	870	CAGGATAATTGAGAGCTGACAGC GAGATGGGAACTGTGTTGTTT	60	Con primers reverso y E2seq-r
Exón 4 y Exón 5	579	GGGGAGGGCAGAGTTAATATG CGTGACTGCTGGAAAGCTC	60	Directo
Exón 6	380	GGAGGTTAGGTAATAACCCAGG CTGGGCTGGTCTTCTGACTAAC	60	Reverso

T<sub>a</sub>: temperatura de *annealing*

Tabla 3: *Primers* diseñados para amplificar y secuenciar región 5'UTR, exones codificantes y regiones intrónicas flanqueantes de *ATOX1* (NM\_004045.3) y *COMMD1* (NM\_152516.3). Condiciones estándar de amplificación con la *Taq BIOTOOLS* excepto para amplificar la región 5'UTR y Exón 1 de *ATOX1*, para la cual se añade MgCl<sub>2</sub> (1 mM) y DMSO al 5%.

Amplicones <i>ATOX1</i>	Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	T <sub>a</sub> (°C)	Primer secuenciación
5'UTR y Exón 1	592	GAAGTAGGCGTTCTGAAAAAGGC GGTTCTGTTTCTCTGTGTACGCAG	60	Directo o Reverso
Exón 2	624	GTGCCAGACACTGCTAAAGG CAGCTCTGCCATTTACTGACC	60	Directo
Exón 3	550	GCCGATCCCTGCTCTAGAG CTGAAAGAGGACTCTGGGAGAC	60	Directo
Exón 4	632	GCA GTGATTGGCTTAGCAAGG GGTGAAAAGAAAGGGGATCACTG	60	Directo

Amplicones <i>COMMD1</i>	Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	T <sub>a</sub> (°C)	Primer secuenciación
5'UTR y Exón 1	695	GTGGTGGTTTTGCACAGG GATGTCCTCGGGCTAAGC	60	Directo
Exón 2	669	GTGTGAGCCATTGTGTCTG GTCAGCTTCTGAGCAATCAC	60	Directo
Exón 3	404	TTGCTGGATTGGGACCCT GAGAACCCTGCACTGGAACAA	60	Directo

T<sub>a</sub>: temperatura de *annealing*

**Tabla 4:** *Primers* diseñados para el análisis de transcritos de *ATP7B* y para la obtención de construcciones para los ensayos de minigenes y de la actividad promotora.

<b>Primer</b>	<b>Dirección</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
WD_cDNA_E2	Directo	GACATGGGATTTGAGGCTTC
WD_cDNA_E3	Directo	CACCGCAGAAGTGCTTCTTA
WD_cDNA_E6	Reverso	TGGTCCAAGTGATGAGCGT
WD_cDNA_E8	Directo	GACACAGGTCAGCCAACAT
WD_cDNA_E8E9	Directo	GAGGAGCCCTGTGACATTC
WD_cDNA_E11	Reverso	GTGGGTAGCTTTAATGAGCACA
WD_cDNA_E12	Reverso	ACCGATTACAATCCATACCACC
WD_cDNA_E10	Directo	GGAAGGCAATACCATGGCT
WD_cDNA_E13	Reverso	GATGAGGATGCCGTTCTG
WD_cDNA_E14	Reverso	AGTATTTGGTGACTGCCACG
WD_cDNA_E17	Directo	GTGGACGTGGTTCTGATCA
WD_cDNA_E18	Reverso	CAGGCAGACATGGGTGTG
WD_cDNA_3UTR	Reverso	TATCCAGGGAGCGGAAGTC
GAPDH_h.m.r (RT-PCR, 362 pb)	Directo	CATTGACCTCAACTACATGG
	Reverso	CAAAGTTGTCATGGATGACC
ATP7B_E9_XhoI	Directo	GGAACTCGAGCTGTGCATCACTGTGGAAG
ATP7B_E9_NheI	Reverso	GCGCGCTAGCCACCACCTACAAATCTTGCTAG
ATP7B_E12PE_XhoI	Directo	GGAACTCGAGGTGGTTAAATGAAGGAGATTATCCC
ATP7B_E12PE_NheI	Reverso	GCGCGCTAGCCTAATACGGTGAAACCCCATCTC
SD6	Directo	TCTGAGTCACCTGGACAACC
SA2	Reverso	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC
pSPL3_seq-F	Directo	CATGCTCCTGGGATGTTGATG
pSPL3_seq-R	Reverso	ACTGTGCGTTACAATTTCTGG
PromATP7B_NheI	Directo	GGAAGCTAGCAAGCTTTATATTTAAGTGACGTGTT
PromATP7B_XhoI	Reverso	GCGCCTCGAGCGTCCCGCACGGACACCGAA

**Tabla 5:** *Primers* diseñados para estudios de amplificación por qPCR (expresión génica y número de copias)

<b>Amplicón</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
COXII/qPCR_mtDNA	69	CGATCCCTCCCTTACCATCA CCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGT
SDHA/qPCR_gDNA	72	TCTCCAGTGCCAACAGTG GCCCTCTGTGCCATCAAC
HMOX/qPCR_E2_F	129	AACTTTCAGAAGGGCCAGGT
HMOX/qPCR_E3_R		GTAGACAGGGGCGAAGACTG
TRX1/qPCR_E1_F	105	GAAGCAGATCGAGAGCAAGAC
TRX1/qPCR_E2_R		ATTTTGCAAGGCCACAC
SOD1/qPCR_E1_F	139	GGCATCATCAATTTGAGC
SOD1/qPCR_E3_R		GACCTGCACTGGTACAGCC
SOD2/qPCR_E4_F	164	AAGGAGAAGCTGACGGCTG
SOD2/qPCR_E5_R		TCCCACACATCAATCCCC
GPX1/qPCR_5UTR_F	115	CCTCCCCTTACAGTGCTTGT
GPX1/qPCR_E1_R		GAGAAGGCATACACCGACTG
TRX2/qPCR_E2_F	109	CGCATTGAGTATGAGGTGTC
TRX2/qPCR_E3_R		GAAGGCCTCCAAGTATCCT
PRDX5/qPCR_E5_F	127	CGCTGGTGTCCATCTTTG
PRDX5/qPCR_E6_R		ATATTGGGTGCCAGGCTG
NQO1/qPCR_E2_F	144	GCAGCGCTTTGAAGAAG
NQO1/qPCR_E3_R		CAGAACAGACTCGGCAGGA
GPX4/qPCR_E2_F	104	GTTTTCCGCCAAGGACATC
GPX4/qPCR_E3_R		CTTCGGTCTGCCTCACTG
GRX2/qPCR_E3_F	127	GGAAGTGGACCTGCTTGAAT
GRX2/qPCR_E4_R		CCTATGAGTGTGAGTTGCACCT
UCP2/qPCR_E1_F	135	CCTATGAGTGTGAGTTGCACCT
UCP2/qPCR_E2_R		CCGGTTACAGATCCAAGGAG
PRDX3/qPCR_E2_F	108	GCAACCAGCCCATTGTAGA
PRDX3_E3/4_R		CGATCCCTCCCTTACCATCA
CAT/qPCR_E7/8_F	143	GAAGATCCTGACTATGGCATCC
CAT/qPCR_E7/8_R		CAAACCTTGGTGAGATCGAA
hGAPDH FW	126	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC
hGAPDH RV		CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA



## BIBLIOGRAFÍA



- Abdel Ghaffar TY, Elsayed SM, Elnaghy S, Shadeed A, Elsobky ES, Schmidt H. Phenotypic and genetic characterization of a cohort of pediatric Wilson disease patients. *BMC Pediatr* 2011; 11: 56.
- Aggarwal A, Bhatt M. Neurological Wilson Disease. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 195–214
- Amir AZ, Frydman M, Shteyer E. Wilson Disease in Israel and Vicinity. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 319–25
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. In: *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 11.10.1-11.10.33
- Badenas Orquin C. Avances en el diagnóstico molecular de la enfermedad de Wilson. *Gastroenterol Hepatol* 2011; 34: 428–33.
- Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. MiR-122 - A key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol* 2015; 62: 448–57.
- Bansagi B, Lewis-Smith D, Pal E, Duff J, Griffin H, Pyle A, et al. Phenotypic convergence of Menkes and Wilson disease. *Neurol Genet* 2016; 2: e119.
- Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 2–4.
- Barrowman J, Hamblet C, George CM, Michaelis S. Analysis of Prelamin A Biogenesis Reveals the Nucleus to be a CaaX Processing Compartment. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 5398–408.
- Bauwens M, Garanto A, Sangermano R, Naessens S, Weisschuh N, De Zaeytijd J, et al. ABCA4-associated disease as a model for missing heritability in autosomal recessive disorders: novel noncoding splice, cis-regulatory, structural, and recurrent hypomorphic variants. *Genet Med* 2019; 21: 1761–71.
- Bayrakli F, Poyrazoglu HG, Yuksel S, Yacicier C, Erguner B, Sagioglu MS, et al. Hereditary spastic paraplegia with recessive trait caused by mutation in KLC4 gene. *J Hum Genet* 2015; 60: 763–8.
- Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H. Performance of Serum microRNAs-122,-192 and-21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 2015; 10: 142661.
- Beinhardt S, Leiss W, Stättermayer AF, Graziadei I, Zoller H, Stauber R, et al. Long-term Outcomes of Patients With Wilson Disease in a Large Austrian Cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12: 683–9.
- Di Bella LM, Alampì R, Biundo F, Toscano G, Felice MR. Copper chelation and interleukin-6 proinflammatory cytokine effects on expression of different proteins involved in iron metabolism in HepG2 cell line. *BMC Biochem* 2017; 18: 1.
- Béréziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont M-C, Dumont S, Vantyghem M-C, et al. LMNA Mutations Induce a Non-Inflammatory Fibrosis and a Brown Fat-Like Dystrophy of Enlarged Cervical Adipose Tissue. *Am J Pathol* 2011; 179: 2443–53.
- Van Den Berghe PVE, Stapelbroek JM, Krieger E, De Bie P, Van De Graaf SFJ, De Groot RE a, et al. Reduced expression of ATP7B affected by Wilson disease-causing mutations is rescued by pharmacological folding chaperones 4-phenylbutyrate and curcumin. *Hepatology* 2009; 50: 1783–95.
- de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LWJ. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet* 2007; 44: 673–88.
- de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, van de Berghe PVE, Muller P, Berger R, et al. Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B. *Gastroenterology* 2007; 133: 1316–26.
- Boga S, Ala A. Hepatic features of Wilson disease. *Handb Clin Neurol* 2017; 142: 91–9.
- Boga S, Jain D, Schilsky ML. Presentation of Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 3 Mimicking Wilson Disease: Molecular Genetic Diagnosis and Response to Treatment. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2015; 18: 202.
- Bost M, Piguet-Lacroix G, Parant F, Wilson CMR. Molecular analysis of Wilson patients: Direct sequencing and MLPA analysis in the ATP7B gene and Atox1 and COMMD1 gene analysis. *J Trace Elem Med Biol* 2012; 26: 97–101.

- Brady GF, Kwan R, Bragazzi Cunha J, Elenbaas JS, Omary MB. Lamins and Lamin-Associated Proteins in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology* 2018
- Brage A, Tomé S, García A, Carracedo A, Salas A. Clinical and molecular characterization of Wilson disease in Spanish patients. *Hepatol Res* 2007; 37: 18–26.
- Braiterman L, Nyasae L, Guo Y, Bustos R, Lutsenko S, Hubbard A. Apical targeting and Golgi retention signals reside within a 9-amino acid sequence in the copper-ATPase, ATP7B. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G433–44.
- Braiterman LT, Murthy A, Jayakanthan S, Nyasae L, Tzeng E, Gromadzka G, et al. Distinct phenotype of a Wilson disease mutation reveals a novel trafficking determinant in the copper transporter ATP7B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E1364-73.
- Brewer GJ, Askari F, Lorincz MT, Carlson M, Schilsky M, Kluin KJ, et al. Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate - IV. Comparison of tetrathiomolybdate and trientine in a double-blind study of treatment of the neurologic presentation of Wilson disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 521–7.
- Broers JL V, Ramaekers FCS, Bonne G, Yaou R Ben, Hutchison CJ. Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing. *Physiol Rev* 2006; 86: 967–1008.
- Bull PC, Cox DW. Long Range Restriction Mapping of 13q14.3 Focused on the Wilson Disease Region. *Genomics* 1993; 16: 593–8.
- van de Bunt M, Gaulton KJ, Parts L, Moran I, Johnson PR, Lindgren CM, et al. The miRNA Profile of Human Pancreatic Islets and Beta-Cells and Relationship to Type 2 Diabetes Pathogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e52722.
- Burstein E, Ganesh L, Dick RD, Van De Sluis B, Wilkinson JC, Klomp LWJ, et al. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *EMBO J* 2004; 23: 244–54.
- Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2018; 1859: 940–50.
- Cai X, Deng L, Ma X, Guo Y, Feng Z, Liu M, et al. Altered diversity and composition of gut microbiota in Wilson's disease. *Sci Rep* 2020; 10: 21825.
- Calkins KL, Thamocharan S, Ghosh S, Dai Y, Devaskar SU. MicroRNA 122 reflects liver injury in children with intestinal failure-associated liver disease treated with intravenous fish oil. *J Nutr* 2020; 150: 1144–50.
- Calucho M, Bernal S, Alías L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, et al. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord* 2018; 28: 208–15.
- Calvopina D, Coleman M, Lewindon P, Ramm G. Function and Regulation of MicroRNAs and Their Potential as Biomarkers in Paediatric Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1795.
- Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, et al. Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1489–502.
- Caron M, Auclair M, Donadille B, Béréziat V, Guerci B, Laville M, et al. Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1759–67.
- Cater M a., La Fontaine S, Shield K, Deal Y, Mercer JFB. ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: Insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology* 2006; 130: 493–506.
- Cedikova M, Pitule P, Kripnerova M, Markova M, Kuncová J. Multiple roles of mitochondria in aging processes. *Physiol Res* 2016; 65: S519–31.
- Chang IJ, Hahn SH. The genetics of Wilson disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 19–34
- Chang IJ, Jung S, Hahn SH. Population Screening for Wilson Disease. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 287–96
- Chen H-L, Li H-Y, Wu J-F, Wu S-H, Chen H-L, Yang Y-H, et al. Panel-Based Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Cholestatic Genetic Liver Diseases: Clinical Utility and Challenges. *J Pediatr* 2019; 205: 153-159.e6.



Chen HI, Jagadeesh KA, Birgmeier J, Wenger AM, Guturu H, Schelley S, et al. An MTF1 binding site disrupted by a homozygous variant in the promoter of ATP7B likely causes Wilson Disease. *Eur J Hum Genet* 2018; 26: 1810–8.

Chen R, Shi L, Hakenberg J, Naughton B, Sklar P, Zhang J, et al. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. 2016

Chen Y-C, Yu H, Wang R-M, Xie J-J, Ni W, Zhang Y, et al. Contribution of intragenic deletions to mutation spectrum in Chinese patients with Wilson’s disease and possible mechanism underlying ATP7B gross deletions. *Parkinsonism Relat Disord* 2019; 62: 128–33.

Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008; 48: 1810–20.

Cocoş R, Şendroiş A, Schipor S, Bohîltea LC, Şendroiş I, Raicu F. Genotype-phenotype correlations in a mountain population community with high prevalence of wilson’s disease: Genetic and clinical homogeneity. *PLoS One* 2014; 9

Coffey AJ, Durkie M, Hague S, McLay K, Emmerson J, Lo C, et al. A genetic study of Wilson’s disease in the United Kingdom. *Brain* 2013; 136: 1476–87.

Collet C, Laplanche J-L, Page J, Morel H, Woimant F, Poujois A. High genetic carrier frequency of Wilson’s disease in France: discrepancies with clinical prevalence. *BMC Med Genet* 2018; 19: 143.

Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Creţoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* 2020; 9: 276.

Cox DW, Prat L, Walshe JM, Heathcote J, Gaffney D. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly European ancestry. *Hum Mutat* 2005; 26: 280.

Cummings J. The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepato-lenticular degeneration. *Brain* 1948; 71: 410–5.

Członkowska A, Gromadzka G, Chabik G. Monozygotic female twins discordant for phenotype of Wilson’s disease. *Mov Disord* 2009; 24: 1066–9.

Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Prim* 2018; 4: 21.

Darling A, Tello C, Martí MJ, Garrido C, Aguilera-Albesa S, Tomás Vila M, et al. Clinical rating scale for pantothenate kinase-associated neurodegeneration: A pilot study. *Mov Disord* 2017; 32: 1620–30.

Dastsooz H, Dehghani SM, Imanieh MH, Haghighat M, Moini M, Fardaei M. A new ATP7B gene mutation with severe condition in two unrelated Iranian families with Wilson disease. *Gene* 2013; 514: 48–53.

Davies KM, Hare DJ, Cottam V, Chen N, Hilgers L, Halliday G, et al. Localization of copper and copper transporters in the human brain. *Metallomics* 2013; 5: 43–51.

Deguti MM, Genschel J, Cancado ELR, 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: 398.

Denoyer Y, Woimant F, Bost M, Edan G, Drapier S. Neurological Wilson’s disease lethal for the son, asymptomatic in the father. *Mov Disord* 2013; 28: 402–3.

Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet* 2015; 31: 613–26.

Dhekne HS, Pylypenko O, Overeem AW, Ferreira RJ, van der Velde KJ, Rings EHHM, et al. MYO5B, STX3, and STXBP2 mutations reveal a common disease mechanism that unifies a subset of congenital diarrheal disorders: A mutation update. *Hum Mutat* 2018; 39: 333–44.

De Domenico I, Ward DMV, Di Patti MCB, Jeong SY, David S, Musci G, et al. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J* 2007; 26: 2823–31.

Dong Y, Shi S-S, Chen S, Ni W, Zhu M, Wu Z-Y. The discrepancy between the absence of copper deposition and the presence of neuronal damage in the brain of Atp7b  $-/-$  mice. *Metallomics* 2015; 7: 283–8.

Dongiovanni P, Meroni M, Longo M, Fargion S, Fracanzani A. miRNA Signature in NAFLD: A Turning Point for a Non-Invasive Diagnosis. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 3966.

Dopazo J, Amadoz A, Bleda M, Garcia-Alonso L, Aleman A, García-García F, et al. 267 Spanish Exomes Reveal Population-Specific Differences in Disease-Related Genetic Variation. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 1205–18.

Dufernez F, Lachaux A, Chappuis P, De Lumley L, Bost M, Woimant F, et al. Wilson disease in offspring of affected patients: Report of four French families. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37: 240–5.

Dusek P, Bahn E, Litwin T, Jabłonka-Salach K, Łuciuk A, Huelnhagen T, et al. Brain iron accumulation in Wilson disease: a post mortem 7 Tesla MRI – histopathological study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017

Dusek P, Skoloudik D, Maskova J, Huelnhagen T, Bruha R, Zahorakova D, et al. Brain iron accumulation in Wilson’s disease: A longitudinal imaging case study during anticopper treatment using 7.0T MRI and transcranial sonography. *J Magn Reson Imaging* 2018; 47: 282–5.

Dziężyc-Jaworska K, Litwin T, Członkowska A. Clinical manifestations of Wilson disease in organs other than the liver and brain. *Ann Transl Med* 2019; 7: S62–S62.

El-Diwany R, Wasilewski LN, Witwer KW, Bailey JR, Page K, Ray SC, et al. Acute Hepatitis C Virus Infection Induces Consistent Changes in Circulating MicroRNAs That Are Associated with Nonlytic Hepatocyte Release. *J Virol* 2015; 89: 9454–64.

Erhardt A, Hoffmann A, Hefter H, Häussinger D. HFE gene mutations and iron metabolism in Wilson’s disease. *Liver* 2002; 22: 474–8.

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3: 87–98.

Espinós C, Ferenci P. Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? *JHEP Reports* 2020; 2: 100114.

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson’s disease. *J Hepatol* 2012; 56: 671–85.

De Fabregues O, Viñas J, Palasí A, Quintana M, Cardona I, Auger C, et al. Ammonium tetrathiomolybdate in the decoppering phase treatment of Wilson’s disease with neurological symptoms: A case series. *Brain Behav* 2020; 10: 1–7.

Fabrizi R, Bocedi A, Pallottini V, Canuti L, De Canio M, Urbani A, et al. Nuclear Shield: A Multi-Enzyme Task-Force for Nucleus Protection. *PLoS One* 2010; 5: e14125.

Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* 2003; 23: 139–42.

Ferenci P, Członkowska A, Merle U, Ferenc S, Gromadzka G, Yurdaydin C, et al. Late-Onset Wilson’s Disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 1294–8.

Ferenci P, Stremmel W, Członkowska A, Szalay F, Viveiros A, Stättermayer AF, et al. Age and Sex but Not ATP7B Genotype Effectively Influence the Clinical Phenotype of Wilson Disease. *Hepatology* 2019; 69: 1464–76.

Figus a, Angius a, Loudianos G, Bertini C, Dessi V, Loi a, et al. Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1318–24.

Florwick A, Dharmaraj T, Jurgens J, Valle D, Wilson KL. LMNA sequences of 60,706 unrelated individuals reveal 132 novel missense variants in A-type lamins and suggest a link between variant p.G602S and type 2 diabetes. *Front Genet* 2017

Gao J, Brackley S, Mann JP. The global prevalence of Wilson disease from next-generation sequencing data. *Genet Med* 2019; 21: 1155–63.

García-Giménez JL, Rubio-Belmar PA, Peiró-Chova L, Hervás D, González-Rodríguez D, Ibañez-Cabellos JS, et al. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis. *Sci Rep* 2018; 8: 2646.

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: 1329–36.

- García-Villarreal L, Hernández-Ortega A, Sánchez-Monteagudo A, Peña-Quintana L, Ramírez-Lorenzo T, Riaño M, et al. Wilson disease: revision of diagnostic criteria in a clinical series with great genetic homogeneity. *J Gastroenterol* 2021; 56: 78–89.
- García Gabarra A, Castellà Soley M, Calleja Fernández A. Ingestas de energía y nutrientes recomendadas en la Unión Europea: 2008-2016. *Nutr Hosp* 2017; 34: 490.
- García García de Paredes A, Manicardi N, Tellez L, Ibañez L, Royo F, Bermejo J, et al. Molecular Profiling of Decompensated Cirrhosis by a Novel MicroRNA Signature. *Hepatol Commun* 2021; 5: 309–22.
- Geng H, Shu S, Dong J, Li H, Xu C, Han Y, et al. Association study of gut flora in Wilson's disease through high-throughput sequencing. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e11743.
- Gialluisi A, Incollu S, Pippucci T, Lepori MB, Zappu A, Loudianos G, et al. The homozygosity index (hi) approach reveals high allele frequency for wilson disease in the sardinian population. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 1308–11.
- Giardina S, Hernández-Alonso P, Díaz-López A, Salas-Huetos A, Salas-Salvadó J, Bulló M. Changes in circulating miRNAs in healthy overweight and obese subjects: Effect of diet composition and weight loss. *Clin Nutr* 2019; 38: 438–43.
- Girard M, Lacaille F, Verkarre V, Mategot R, Feldmann G, Grodet A, et al. MYO5B and bile salt export pump contribute to cholestatic liver disorder in microvillous inclusion disease. *Hepatology* 2014; 60: 301–10.
- Girard M, Poujois A, Fabre M, Lacaille F, Debray D, Rio M, et al. CCDC115-CDG: A new rare and misleading inherited cause of liver disease. *Mol Genet Metab* 2018
- Glavind E, Gotthardt DN, Pfeiffenberger J, Sandahl TD, Bashlekova T, Willemoie GL, et al. The macrophage activation marker soluble CD163 is elevated and associated with liver disease phenotype in patients with Wilson's disease. *Orphanet J Rare Dis* 2020; 15: 173.
- Godoy-Matos AF, Silva Júnior WS, Valerio CM. NAFLD as a continuum: From obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2020; 12: 1–20.
- Gojová L, Jansová E, Kül M, Pouchlá S, Kozák L. Genotyping microarray as a novel approach for the detection of ATP7B gene mutations in patients with Wilson disease. *Clin Genet* 2008; 73: 441–52.
- Gomes A, Dedoussis G V. Geographic distribution of ATP7B mutations in Wilson disease. *Ann Hum Biol* 2016; 43: 1–8.
- Gowers W. On tetanoid chorea and its association with cirrhosis of the liver. *Rev Neurol Psychiatry* 1906; 4: 249–58.
- Gromadzka G, Rudnicka M, Chabik G, Przybyłkowski A, Członkowska A. Genetic variability in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) affects clinical expression of Wilson's disease. *J Hepatol* 2011; 55: 913–9.
- Gromadzka G, Wierzbicka D, Litwin T, Przybyłkowski A. Difference in iron metabolism may partly explain sex-related variability in the manifestation of Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2020; 62: 126637.
- Gromadzka G, Wierzbicka D, Litwin T, Przybyłkowski A. Iron metabolism is disturbed and anti-copper treatment improves but does not normalize iron metabolism in Wilson's disease [Internet]. *BioMetals* 2021[cited 2021 Feb 9] Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10534-021-00289-x>
- Gromadzka G, Wierzbicka DW, Przybyłkowski A, Litwin T. Effect of homeostatic iron regulator protein gene mutation on Wilson's disease clinical manifestation: original data and literature review. *Int J Neurosci* 2020: 1–7.
- Gu Y, Ji F, Liu N, Zhao Y, Wei X, Hu S, et al. Loss of miR-192-5p initiates a hyperglycolysis and stemness positive feedback in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2020; 39: 268.
- Gu Y, Wei X, Sun Y, Gao H, Zheng X, Wong LL, et al. miR-192-5p Silencing by Genetic Aberrations Is a Key Event in Hepatocellular Carcinomas with Cancer Stem Cell Features. *Cancer Res* 2019; 79: 941–53.
- Gui J, Tian Y, Wen X, Zhang W, Zhang P, Gao J, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sci* 2011; 120: 183–93.

Guillaud O, Brunet A-S, Mallet I, Dumortier J, Pelosse M, Heissat S, et al. Relative exchangeable copper: A valuable tool for the diagnosis of Wilson disease. *Liver Int* 2018; 38: 350–7.

Guillaud O, Dumortier J, Sobesky R, Debray D, Wolf P, Vanlemmens C, et al. Long term results of liver transplantation for Wilson's disease: Experience in France. *J Hepatol* 2014; 60: 579–89.

Guo Y, Nyasae L, Braiterman LT, Hubbard AL. NH<sub>2</sub>-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells. *Am J Physiol Liver Physiol* 2005; 289: G904–16.

Gupta A, Aikath D, Neogi R, Datta S, Basu K, Maity B, et al. Molecular pathogenesis of Wilson disease: haplotype analysis, detection of prevalent mutations and genotype-phenotype correlation in Indian patients. *Hum Genet* 2005; 118: 49–57.

Gupta A, Bhattacharjee A, Dmitriev OY, Nokhrin S, Braiterman L, Hubbard AL, et al. Cellular copper levels determine the phenotype of the Arg875 variant of ATP7B/Wilson disease protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 5390–5.

Gupta A, Chattopadhyay I, Mukherjee S, Sengupta M, Das SK, Ray K. A novel COMMD1 mutation Thr174Met associated with elevated urinary copper and signs of enhanced apoptotic cell death in a Wilson Disease patient. *Behav Brain Funct* 2010; 6: 33.

Gupta A, Das S, Ray K. A glimpse into the regulation of the Wilson disease protein, ATP7B, sheds light on the complexity of mammalian apical trafficking pathways. *Metallomics* 2018; 10: 378–87.

Gupta A, Schell MJ, Bhattacharjee A, Lutsenko S, Hubbard AL. Myosin Vb mediates Cu<sup>+</sup> export in polarized hepatocytes. *J Cell Sci* 2016; 129: 1179–89.

Gupta S. Cell therapy to remove excess copper in Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1315: 70–80.

Hafkemeyer P, Schupp M, Storch M, Gerok W, Hässinger D. Excessive iron storage in a patient with Wilson's disease. *J Mol Med* 1994; 72: 134–6.

Hahn SH. Population screening for Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1315: 64–9.

Haque WA, Oral EA, Dietz K, Bowcock AM, Agarwal AK, Garg A. Risk factors for diabetes in familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *Diabetes Care* 2003

Hayes C, Chayama K. MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 280.

Heinz Weiss K, Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Fullekrug J, Stremmel W, et al. Copper toxicosis gene MURR1 is not changed in Wilson disease patients with normal blood ceruloplasmin levels. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2239–42.

Hofer H, Willheim-Polli C, Knoflach P, Gabriel C, Vogel W, Trauner M, et al. Identification of a novel Wilson disease gene mutation frequent in Upper Austria: a genetic and clinical study. *J Hum Genet* 2012; 57: 564–7.

Homén E. Eine eigenthümliche Familienkrankheit, unter den form einer progressiven Dementia, mit besbesonderem anatomischen Befund. *Neurol Zentralblat* 1890; 9: 514–8.

Hsi G, Cullen LM, Glerum DM, Cox DW. Functional assessment of the carboxy-terminus of the Wilson disease copper-transporting ATPase, ATP7B. *Genomics* 2004; 83: 473–81.

Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis* 2014; 72: 3–12.

Huang Z, Xu Y, Wan M, Zeng X, Wu J. Mir-340: A multifunctional role in human malignant diseases. *Int J Biol Sci* 2021; 17: 236–46.

Huarte-Muniesa MP, Lacalle-Fabo E, Uriz-Otano J, Berisa-Prado S, Moreno-Laguna S, Burusco-Paternáin MJ. Dificultades en el diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Wilson en la práctica clínica: experiencia de 15 casos. *Gastroenterol Hepatol* 2014; 37: 389–96.

Hubbard AL, Braiterman LT. Could ATP7B Export Cu(I) at the Tight Junctions and the Apical Membrane? *Gastroenterology* 2008; 134: 1255–7.

Hussein NAEM, Kholy ZAE, Anwar MM, Ahmad MA, Ahmad SM. Plasma miR-22-3p, miR-642b-3p and miR-885-5p as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017; 143: 83–93.

Huster D. Structural and metabolic changes in *Atp7b*  $-/-$  mouse liver and potential for new interventions in Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1315: 37–44.

Huster D, Khne A, Bhattacharjee A, Raines L, Jantsch V, Noe J, et al. Diverse functional properties of wilson disease ATP7B variants. *Gastroenterology* 2012; 142: 12–3.

Huster D, Purnat TD, Burkhead JL, Ralle M, Fiehn O, Stuckert F, et al. High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *J Biol Chem* 2007; 282: 8343–55.

Incecik F, Bisgin A, Yilmaz M. MEDNIK syndrome with a frame shift causing mutation in AP1S1 gene and literature review of the clinical features. *Metab Brain Dis* 2018; 33: 2065–8.

Jang J-H, Lee T, Bang S, Kim Y-E, Cho E-H. Carrier frequency of Wilson's disease in the Korean population: a DNA-based approach. *J Hum Genet* 2017; 62: 815–8.

Janin A, Gache V. Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal Muscles. *Front Physiol* 2018; 9: 1–12.

Jansen JC, Cirak S, Van Scherpenzeel M, Timal S, Reunert J, Rust S, et al. CCDC115 Deficiency Causes a Disorder of Golgi Homeostasis with Abnormal Protein Glycosylation. *Am J Hum Genet* 2016; 98: 310–21.

Jansen JC, Timal S, Van Scherpenzeel M, Michelakakis H, Vicogne D, Ashikov A, et al. TMEM199 Deficiency is a Disorder of Golgi Homeostasis Characterized by Elevated Aminotransferases, Alkaline Phosphatase, and Cholesterol and Abnormal Glycosylation. *Am J Hum Genet* 2016; 98: 322–30.

Johncilla M, Mitchell KA. Pathology of the liver in copper overload. *Semin Liver Dis* 2011

Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, et al. The Nrf2-ARE pathway: An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1147: 61–9.

Jonsson H, Magnusdottir E, Eggertsson HP, Stefansson OA, Arnadottir GA, Eiriksson O, et al. Differences between germline genomes of monozygotic twins. *Nat Genet* 2021; 53: 27–34.

Jung S, Whiteaker JR, Zhao L, Yoo H-W, Paulovich AG, Hahn SH. Quantification of ATP7B Protein in Dried Blood Spots by Peptide Immuno-SRM as a Potential Screen for Wilson's Disease. *J Proteome Res* 2017; 16: 862–71.

Kakkar P, Singh BK. Mitochondria: A hub of redox activities and cellular distress control. *Mol Cell Biochem* 2007; 305: 235–53.

Kalita J, Kumar V, Misra UK, Ranjan A, Khan H, Konwar R. A study of oxidative stress, cytokines and glutamate in Wilson disease and their asymptomatic siblings. *J Neuroimmunol* 2014; 274: 141–8.

Kapoor N, Shetty S, Thomas N, Paul TV. Wilson's disease: An endocrine revelation. *Indian J Endocrinol Metab* 2014; 18: 855–7.

Kegley KM, Sellers MA, Ferber MJ, Johnson MW, Joelson DW, Shrestha R. Fulminant Wilson's Disease Requiring Liver Transplantation in One Monozygotic Twin Despite Identical Genetic Mutation. *Am J Transplant* 2010; 10: 1325–9.

Kerkar N, Roberts EA. Introduction: A Silver Jubilee for ATP7B. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. xxi–xxii

Kerkar N, Roberts EA. Wilson Disease in Infancy through Adolescence. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 179–93

Kerkhof M, Honkoop P. Never forget aceruloplasminemia in case of highly suggestive Wilson's disease score. *Hepatology* 2014; 59: 1645–7.

Kiel T, Busch A, Meyer-Rachner A, Hübner S. Laminopathy-inducing mutations reduce nuclear import of expressed prelamin A. *Int J Biochem Cell Biol* 2014

Kim B, Cho EJ, Yoon J-H, Kim SS, Cheong JY, Cho SW, et al. Pathway-Based Integrative Analysis of Metabolome and Microbiome Data from Hepatocellular Carcinoma and Liver Cirrhosis Patients. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 2705.

Kim TJ, Kim IO, Kim WS, Cheon JE, Moon SG, Kwon JW, et al. MR imaging of the brain in Wilson disease of childhood: findings before and after treatment with clinical correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1373–8.

- Kirk R. The ATP7B Gene. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 143–52
- Van Der Klift HM, Jansen AML, Van Der Steenstraten N, Bik EC, Tops CMJ, Devilee P, et al. Splicing analysis for exonic and intronic mismatch repair gene variants associated with Lynch syndrome confirms high concordance between minigene assays and patient RNA analyses. *Mol Genet Genomic Med* 2015; 3: 327–45.
- Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17: 742–53.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D68–73.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* 2005; 438: 685–9.
- Kuhn J, Miyajima H, Takahashi Y, Kunath B, Hartmann-Klosterkoetter U, Cooper-Mahkorn D, et al. Extrapyrmidal and cerebellar movement disorder in association with heterozygous ceruloplasmin gene mutation [6]. *J Neurol* 2005; 252: 111–3.
- Kumari N, Kumar A, Pal A, Thapa BR, Modi M, Prasad R. In-silico analysis of novel p.(Gly14Ser) variant of ATOX1 gene: plausible role in modulating ATOX1–ATP7B interaction. *Mol Biol Rep* 2019; 46: 3307–13.
- Lackner C, Denk H. Histopathology of Wilson Disease. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 257–70
- Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, et al. Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2007; 13: 164–70.
- Latorre M, Troncoso R, Uauy R. Biological Aspects of Copper. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 25–31
- Lee BH, Kim JH, Lee SY, Jin HY, Kim K-J, Lee J-J, et al. Distinct clinical courses according to presenting phenotypes and their correlations to ATP7B mutations in a large Wilson’s disease cohort. *Liver Int* 2011; 31: 831–9.
- Lenartowicz M, Moos T, Ogórek M, Jensen TG, Møller LB. Metal-Dependent Regulation of ATP7A and ATP7B in Fibroblast Cultures. *Front Mol Neurosci* 2016; 9: 68.
- Lepori MB, Lovicu M, Dessì 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: 328–32.
- Lepori MB, Zappu A, Incollu S, Dessì V, Mameli E, Demelia L, et al. Mutation analysis of the ATP7B gene in a new group of Wilson’s disease patients: Contribution to diagnosis. *Mol Cell Probes* 2012; 26: 147–50.
- Levy E, Brunet S, Alvarez F, Seidman E, Bouchard G, Escobar E, et al. Abnormal hepatobiliary and circulating lipid metabolism in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson’s disease. *Life Sci* 2007; 80: 1472–83.
- Levy M, Thaiss CA, Elinav E. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes Dev* 2016; 30: 1589–97.
- Li J, Ghazwani M, Zhang Y, Lu J, Li J, Fan J, et al. MiR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression. *J Hepatol* 2013; 58: 522–8.
- Li L, Dong H, Song E, Xu X, Liu L, Song Y. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling. *Chem Biol Interact* 2014; 209: 56–67.
- Li X-H, Lu Y, Ling Y, Fu Q-C, Xu J, Zang G-Q, et al. Clinical and molecular characterization of Wilson’s disease in China: identification of 14 novel mutations. *BMC Med Genet* 2011; 12: 6.
- Lim CM, Cater M a, Mercer JFB, La Fontaine S. Copper-dependent interaction of dynactin subunit p62 with the N terminus of ATP7B but not ATP7A. *J Biol Chem* 2006; 281: 14006–14.
- Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A. Gender differences in Wilson’s disease. *J Neurol Sci* 2012; 312: 31–5.
- Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A. Apolipoprotein E gene (APOE) genotype in Wilson’s disease: Impact on clinical presentation. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18: 367–9.

- Litwin T, Gromadzka G, Szpak GM, Jabłonna-Salach K, Bulska E, Członkowska A. Brain metal accumulation in Wilson's disease. *J Neurol Sci* 2013; 329: 55–8.
- Liu X, Cui X, Guan G, Dong Y, Zhang Z. microRNA-192-5p is involved in nerve repair in rats with peripheral nerve injury by regulating XIAP. *Cell Cycle* 2020; 19: 326–38.
- Liu XL, Pan Q, Cao HX, Xin FZ, Zhao ZH, Yang RX, et al. Lipotoxic Hepatocyte-Derived Exosomal MicroRNA 192-5p Activates Macrophages Through Rictor/Akt/Forkhead Box Transcription Factor O1 Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2020; 72: 454–69.
- Liu Y, Bao Z, Tian W, Huang G. miR-885-5p suppresses osteosarcoma proliferation, migration and invasion through regulation of  $\beta$ -catenin. *Oncol Lett* 2018; 17: 1996–2004.
- Lo C, Bandmann O. Epidemiology and introduction to the clinical presentation of Wilson disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 7–17
- Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab* 2017; 25: 1054-1062.e5.
- López-Riera M, Conde I, Quintas G, Pedrola L, Zaragoza Á, Perez-Rojas J, et al. Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. *Sci Rep* 2018; 8: 10606.
- Lou C, Xiao M, Cheng S, Lu X, Jia S, Ren Y, et al. MiR-485-3p and miR-485-5p suppress breast cancer cell metastasis by inhibiting PGC-1 $\alpha$  expression. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2159–e2159.
- Loudianos G, Dessì V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturniolo GC, et al. Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the Mediterranean population. *Hum Mutat* 1998; 12: 89–94.
- Loudianos G, Dessì V, Lovicu M, Angius a, Altuntas B, Giacchino R, et al. Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations. *J Med Genet* 1999; 36: 833–6.
- Loudianos G, Dessì V, Lovicu M, Angius a, Figus a, Lilliu F, et al. Molecular characterization of wilson disease in the Sardinian population--evidence of a founder effect. *Hum Mutat* 1999; 14: 294–303.
- Loudianos G, Kostic V, Solinas P, Lovicu M, Dessì V, Svetel M, et al. Characterization of the molecular defect in the ATP7B gene in Wilson disease patients from Yugoslavia. *Genet Test* 2003; 7: 107–12.
- Loudianos G, Lovicu M, Dessì V, Tzetis M, Kanavakis E, Zancan L, et al. Abnormal mRNA splicing resulting from consensus sequence splicing mutations of ATP7B. *Hum Mutat* 2002; 20: 260–6.
- Loudianos G, Lovicu M, Solinas P, Kanavakis E, Tzetis M, Manolaki N, et al. Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations. *Genet Test* 2000; 4: 399–402.
- Lovicu M, Dessì V, Lepori MB, Zappu A, Zancan L, Giacchino R, et al. The canine copper toxicosis gene MURR1 is not implicated in the pathogenesis of Wilson disease. *J Gastroenterol* 2006; 41: 582–7.
- Lovicu M, Lepori MB, Incollu S, Dessì 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: 185–91.
- Lutsenko S. Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1315: 56–63.
- Lutsenko S, Jayakanthan S, Dmitriev OY. Molecular Architecture of the Copper-Transporting ATPase ATP7B. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 33–43
- Lv H-F, Sun X-Q, Zhou H-X, Qin Z, Shi Y-Y, Wang Q, et al. Diagnostic value of miRNA-122 in Kawasaki disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24: 11222–6.
- Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53: 401–26.
- Maher B. Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature* 2008; 456: 18–21.
- Maine GN, Mao X, Muller PA, Komarck CM, Klomp LWJ, Burstein E. COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding. *J Biochem* 2009; 417: 601–9.

- Mak CM. Biochemical Diagnosis of Wilson Disease. In: Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. Elsevier; 2019. p. 237–48
- Mantilla-Escalante DC, López de las Hazas M-C, Gil-Zamorano J, del Pozo-Acebo L, Crespo MC, Martín-Hernández R, et al. Postprandial Circulating miRNAs in Response to a Dietary Fat Challenge. *Nutrients* 2019; 11: 1326.
- Manto M. Abnormal copper homeostasis: Mechanisms and roles in neurodegeneration. *Toxics* 2014; 2: 327–45.
- Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queral 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: 61–8.
- Mariño Z, Martín AO, Pocurull A, Hierro L, Bartres C, Castillo P, et al. Liver cirrhosis development and value of transient elastography among a large cohort of Wilson disease patients with a long-term follow-up in Spain. *J Hepatol* 2020; 73: S558–9.
- Martinelli D, Travaglini L, Drouin CA, Ceballos-Picot I, Rizza T, Bertini E, et al. MEDNIK syndrome: a novel defect of copper metabolism treatable by zinc acetate therapy. *Brain* 2013; 136: 872–81.
- Maselbas W, Członkowska A, Litwin T, Niewada M. Persistence with treatment for Wilson disease: A retrospective study. *BMC Neurol* 2019; 19: 278.
- Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 132.
- Mazagova M, Wang L, Anfora AT, Wissmueller M, Lesley SA, Miyamoto Y, et al. Commensal microbiota is hepatoprotective and prevents liver fibrosis in mice. *FASEB J* 2015; 29: 1043–55.
- Medici V, Kieffer DA. Epigenetics Relating to Wilson Disease. In: Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. Elsevier; 2019. p. 153–62
- Medici V, LaSalle JM. Genetics and epigenetic factors of Wilson disease. *Ann Transl Med* 2019; 7: S58–S58.
- Medici V, Weiss K-H. Genetic and environmental modifiers of Wilson disease. In: Handbook of Clinical Neurology. 2017. p. 35–41
- Méjat A. LINC complexes in health and disease. *Nucleus* 2010; 1: 40–52.
- Merico D, Spickett C, O'Hara M, Kakaradov B, Deshwar AG, Fradkin P, et al. ATP7B variant c.1934T>G p.Met645Arg causes Wilson disease by promoting exon 6 skipping. *npj Genomic Med* 2020; 5: 16.
- Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: A cohort study. *Gut* 2007; 56: 115–20.
- Merle U, Weiss KH, Eisenbach C, Tuma S, Ferenci P, Stremmel W. Truncating mutations in the Wilson disease gene ATP7B are associated with very low serum ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 8.
- Mi X, Li Z, Yan J, Li Y, Zheng J, Zhuang Z, et al. Activation of HIF-1 signaling ameliorates liver steatosis in zebrafish atp7b deficiency (Wilson's disease) models. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2020; 1866: 165842.
- Milkiewicz P, Saksena S, Hubscher SG, Elias E. Wilson's disease with superimposed autoimmune features: Report of two cases and review. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 570–4.
- Miyayama T, Hiraoka D, Kawaji F, Nakamura E, Suzuki N, Ogra Y. Roles of COMM-domain-containing 1 in stability and recruitment of the copper-transporting ATPase in a mouse hepatoma cell line. *Biochem J* 2010; 429: 53–61.
- Mohr I, Weiss KH. Biochemical markers for the diagnosis and monitoring of Wilson Disease. *Clin Biochem Rev* 2019; 40: 59–77.
- Mohr I, Weiss KH. Current anti-copper therapies in management of Wilson disease. *Ann Transl Med* 2019; 7: S69–S69.



- Møller LB, Horn N, Jeppesen TD, Vissing J, Wibrand F, Jennum P, et al. Clinical presentation and mutations in Danish patients with Wilson disease. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 935–41.
- Montaut S, Tranchant C, Drouot N, Rudolf G, Guissart C, Tarabeux J, et al. Assessment of a Targeted Gene Panel for Identification of Genes Associated with Movement Disorders. *JAMA Neurol* 2018; 75: 1234–45.
- Mooney C, McKiernan PJ, Raoof R, Henshall DC, Linnane B, McNally P, et al. Plasma microRNA levels in male and female children with cystic fibrosis. *Sci Rep* 2020; 10: 1141.
- Moreno-Marro S, Barrachina-Bonet L, Páramo-Rodríguez L, Alonso-Ferreira V, Guardiola-Villarroy S, Vicente E, et al. Enfermedad de Wilson en España: validación de fuentes utilizadas por los Registros de Enfermedades Raras [Internet]. *Gac Sanit* 2020 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2020.07.011>
- Mufti AR, Burstein E, Csomos RA, Graf PCF, Wilkinson JC, Dick RD, et al. XIAP is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Mol Cell* 2006; 21: 775–85.
- Mukherjee S, Dutta S, Majumdar S, Biswas T, Jaiswal P, Sengupta M, et al. Genetic defects in Indian Wilson disease patients and genotype–phenotype correlation. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20: 75–81.
- Muller PAJ, de Sluis B van, Groot AJ, Verbeek D, Vonk WIM, Maine GN, et al. Nuclear-Cytosolic Transport of COMMD1 Regulates NF- $\kappa$ B and HIF-1 Activity. *Traffic* 2009; 10: 514–27.
- Murillo O, Luqui DM, Gazquez C, Martínez-Espartosa D, Navarro-Blasco I, Monreal JI, et al. Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy. *J Hepatol* 2015; 64: 419–26.
- Murillo O, Moreno D, Gazquez C, Barberia M, Cenzano I, Navarro I, et al. Liver expression of a miniATP7B gene results in long-term restoration of copper homeostasis in a Wilson's disease model. *Hepatology* 2019; 0: 1–19.
- Nicastro E, Loudianos G, Zancan L, D'Antiga L, Maggiore G, Marcellini M, et al. Genotype–phenotype correlation in Italian children with Wilson's disease. *J Hepatol* 2009; 50: 555–61.
- Nielsen KO, Jacobsen KS, Mirza AH, Winther TN, Størling J, Glebe D, et al. Hepatitis B virus upregulates host microRNAs that target apoptosis-regulatory genes in an in vitro cell model. *Exp Cell Res* 2018; 371: 92–103.
- Oh WJ, Kim EK, Park KD, Hahn SH, Yoo OJ. Cloning and Characterization of the Promoter Region of the Wilson Disease Gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 206–11.
- Ohtani N, Kawada N. Role of the Gut-Liver Axis in Liver Inflammation, Fibrosis, and Cancer: A Special Focus on the Gut Microbiota Relationship. *Hepatol Commun* 2019; 3: 456–70.
- Okada T, Shiono Y, Kaneko Y, Miwa K, Hasatani K, Hayashi Y, et al. High prevalence of fulminant hepatic failure among patients with mutant alleles for truncation of ATP7B in Wilson's disease. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 1232–7.
- Ondrejkočová M, Dražilová S, Drakulová M, Siles JL, Zemjarová Mezenská R, Jungová P, et al. New mutation of the ceruloplasmin gene in the case of a neurologically asymptomatic patient with microcytic anaemia, obesity and supposed Wilson's disease. *BMC Gastroenterol* 2020; 20: 95.
- Ormerod J. Cirrhosis of the liver in a boy, with obscure and fatal nervous symptoms. *St Bartholomew' Hosp Rep* 1890; 26: 56–68.
- Ottaviani D, LeCain M, Sheer D. The role of microhomology in genomic structural variation. *Trends Genet* 2014; 30: 85–94.
- Pal A, Prasad R. Recent Discoveries on the Functions of Astrocytes in the Copper Homeostasis of the Brain: A Brief Update. *Neurotox Res* 2014; 26: 78–84.
- Panagiotakaki E, Tzetzis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, et al. Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am J Med Genet* 2004; 131 A: 168–73.
- Paradisi I, De Freitas L, Arias S. Most frequent mutation c.3402delC (p.Ala1135GlnfsX13) among Wilson disease patients in Venezuela has a wide distribution and two old origins. *Eur J Med Genet* 2015; 58: 59–65.
- Parisi S, Polishchuk E V., Allocca S, Ciano M, Musto A, Gallo M, et al. Characterization of the most frequent ATP7B mutation causing Wilson disease in hepatocytes from patient induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2018; 8: 6247.

Park J-Y, Mun JH, Lee BH, Heo SH, Kim G-H, Yoo H-W. Proteomic analysis of sera of asymptomatic, early-stage patients with Wilson's disease. *PROTEOMICS - Clin Appl* 2009; 3: 1185–90.

Park S, Park J-Y, Kim G-H, Choi J-H, Kim K-M, Kim J-B, et al. Identification of novel ATP7B gene mutations and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 2007; 28: 1108–13.

Pastukh N, Meerson A, Kalish D, Jabaly H, Blum A. Serum miR-122 levels correlate with diabetic retinopathy. *Clin Exp Med* 2019; 19: 255–60.

Paternostro R, Pfeiffenberger J, Ferenci P, Stättermayer AF, Stauber RE, Wrba F, et al. Non-invasive diagnosis of cirrhosis and long-term disease monitoring by transient elastography in patients with Wilson disease. *Liver Int* 2020; 40: 894–904.

Patil M, Sheth KA, Krishnamurthy AC, Devarbhavi H. A review and current perspective on wilson disease. *J Clin Exp Hepatol* 2013; 3: 321–36.

Pecqueur C, Bui T, Gelly C, Hauchard J, Barbot C, Bouillaud F, et al. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J* 2008; 22: 9–18.

Pei J, Sun X, Yang G, Zhang S. LncRNA KCNQ1OT1 ameliorates the liver injury induced by acetaminophen through the regulation of miR-122-5p/CES2 axis. *Mol Cell Biochem* 2020; 475: 107–18.

Penon-Portmann M, Lotz-Esquivel S, Chavez Carrera A, Jiménez-Hernández M, Alvarado-Romero D, Segura-Cordero S, et al. Wilson disease in Costa Rica: Pediatric phenotype and genotype characterization. *JIMD Rep* 2020; 52: 55–62.

Petris MJ, Voskoboinik I, Cater M, Smith K, Kim BE, Llanos RM, et al. Copper-regulated trafficking of the Menkes disease copper ATPase is associated with formation of a phosphorylated catalytic intermediate. *J Biol Chem* 2002; 277: 46736–42.

Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993; 5: 338–43.

Pfeiffenberger J, Gotthardt DN, Herrmann T, Seeßle J, Merle U, Schirmacher P, et al. Iron metabolism and the role of HFE gene polymorphisms in Wilson disease. *Liver Int* 2012; 32: 165–70.

Pfeiffer RF. Wilson's disease. *Semin Neurol* 2007; 27: 123–32.

Phillips-Krawczak CA, Singla A, Starokadomskyy P, Deng Z, Osborne DG, Li H, et al. COMMD1 is linked to the WASH complex and regulates endosomal trafficking of the copper transporter ATP7A. *Mol Biol Cell* 2015; 26: 91–103.

Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 2015; 64: 800–12.

Pla-Martín D, Calpena E, Lupo V, Márquez C, Rivas E, Sivera R, et al. Junctophilin-1 is a modifier gene of GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 2015; 24: 213–29.

Polishchuk RS. Cellular Function of ATP7B (Wilson ATPase). In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 45–56

Polishchuk RS, Polishchuk E V. From and to the Golgi – defining the Wilson disease protein road map. *FEBS Lett* 2019; 593: 2341–50.

Poon K-S, Teo ZH, Yap JH, Koay ES, Tan K. Challenges in molecular diagnosis of Wilson disease: viewpoint from the clinical laboratory. *J Clin Pathol* 2020; 73: 231–4.

Poujois A, Sobesky R, Meissner WG, Brunet A, Broussolle E, Laurencin C, et al. Liver transplantation as a rescue therapy for severe neurologic forms of Wilson disease. *Neurology* 2020; 94: e2189–202.

Poujois A, Trocello JM, Djebrani-Oussedik N, Poupon J, Collet C, Girardot-Tinant N, et al. Exchangeable copper: a reflection of the neurological severity in Wilson's disease. *Eur J Neurol* 2017; 24: 154–60.

Poujois A, Woimant F, Samson S, Chaine P, Girardot-Tinant N, Tuppin P. Characteristics and prevalence of Wilson's disease: A 2013 observational population-based study in France. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2018; 42: 57–63.

- Przybyłkowski A, Gromadzka G, Członkowska A. Polymorphisms of metal transporter genes DMT1 and ATP7A in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2014; 28: 8–12.
- Qiu L, Wang T, Ge Q, Xu H, Wu Y, Tang Q, et al. Circular RNA signature in hepatocellular carcinoma. *J Cancer* 2019; 10: 3361–72.
- Raitoharju E, Seppälä I, Lyytikäinen L-P, Viikari J, Ala-Korpela M, Soininen P, et al. Blood hsa-miR-122-5p and hsa-miR-885-5p levels associate with fatty liver and related lipoprotein metabolism—The Young Finns Study. *Sci Rep* 2016; 6: 38262.
- Ramalho AS, Beck S, Penque D, Gonska T, Seydewitz HH, Mall M. Transcript analysis of the cystic fibrosis splicing mutation 1525-1G>A shows use of multiple alternative splicing sites and suggests a putative role of exonic splicing enhancers. *J Med Genet* 2003; 40: 88.
- Ramraj R, Finegold MJ, Karpen SJ. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 3. *Clin Pediatr (Phila)* 2012; 51: 689–91.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405–23.
- Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology* 2008; 47: 2089–111.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26: 139–40.
- Rodríguez B, Burguera J, Berenguer M. Response to different therapeutic approaches in Wilson disease. A long-term follow up study. *Ann Hepatol* 2012; 11: 907–14.
- Rose S, Frye RE, Slattery J, Wynne R, Tippett M, Pavliv O, et al. Oxidative Stress Induces Mitochondrial Dysfunction in a Subset of Autism Lymphoblastoid Cell Lines in a Well-Matched Case Control Cohort. *PLoS One* 2014; 9: e85436.
- Rosencrantz R, Schilsky M. Wilson disease: Pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment. *Semin Liver Dis* 2011; 31: 245–59.
- Ruiz García-Tevijano E, Berasain C, Rodríguez JA, Corrales FJ, Arias R, Martín-Duce A, et al. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: Mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. In: *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1217–21
- Rumpel A. Über das Wesen und die Bedeutung der Leberveränderungen und der Pigmentierungen bei den damit verbundenen Fällen von Pseudosklerose, zugleich ein Beitrag zur Lehre von der Pseudosklerose (Westphal-Strümpell). *Dtsch Z Nervenheilkd* 1913; 49: 54–73.
- Ryan A, Nevitt SJ, Tuohy O, Cook P. Biomarkers for diagnosis of Wilson's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 2019
- Saha B, Lessel D, Hisama FM, Leistriz DF, Friedrich K, Martin GM, et al. A novel LMNA mutation causes altered nuclear morphology and symptoms of familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) with progeroid features. *Mol Syndromol* 2010; 1: 127–32.
- Sánchez-Monteagudo A, Álvarez-Sauco M, Sastre I, Martínez-Torres I, Lupo V, Berenguer M, et al. Genetics of Wilson disease and Wilson-like phenotype in a clinical series from eastern Spain. *Clin Genet* 2020; 97: 758–63.
- Sandahl TD, Laursen TL, Munk DE, Vilstrup H, Weiss KH, Ott P. The Prevalence of Wilson disease. An Update. *Hepatology* 2019; hep.30911.
- Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hcpidin. *Adv Nutr An Int Rev J* 2017; 8: 126–36.
- Sangkokya C, Doss JF, Chi J-T. Iron-Responsive miR-485-3p Regulates Cellular Iron Homeostasis by Targeting Ferroportin. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003408.
- Sapuppo A, Pavone P, Praticò AD, Ruggieri M, Bertino G, Fiumara A. Genotype-phenotype variable correlation in Wilson disease: clinical history of two sisters with the similar genotype. *BMC Med Genet* 2020; 21: 128.

- Sarode G V., Kim K, Kieffer DA, Shibata NM, Litwin T, Czlonkowska A, et al. Metabolomics profiles of patients with Wilson disease reveal a distinct metabolic signature. *Metabolomics* 2019; 15: 43.
- Scheiber I, Dringen R, Mercer JFB. Copper: Effects of Deficiency and Overload. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, editor(s). *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 359–87
- Scheiber IF, Brůha R, Dušek P. Pathogenesis of Wilson disease. *Handb Clin Neurol* 2017; 142: 43–55.
- Scheiber IF, Dringen R. Copper-treatment increases the cellular GSH content and accelerates GSH export from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 2011; 498: 42–6.
- Scheinberg, I Sternlieb I. Wilson's disease (a volume in the major problems in internal medicine series). *Ann Neurol* 1984; 16: 626–626.
- Schiano TD, Rosenthal P. Liver Transplantation in Wilson Disease. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 391–8
- Schiefermeier M, Kollegger H, Madl C, Polli C, Oder W, Kühn HJ, et al. The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease. *Brain* 2000; 123: 585–90.
- Schönfeld P, Wieckowski MR, Lebedzińska M, Wojtczak L. Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: Lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2010; 1797: 929–38.
- Schwimmer JB, Johnson JS, Angeles JE, Behling C, Belt PH, Borecki I, et al. Microbiome Signatures Associated With Steatohepatitis and Moderate to Severe Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2019; 157: 1109–22.
- Seco-Cervera M, González-Rodríguez D, Ibáñez-Cabellos JS, Peiró-Chova L, González-Cabo P, García-López E, et al. Circulating miR-323-3p is a biomarker for cardiomyopathy and an indicator of phenotypic variability in Friedreich's ataxia patients. *Sci Rep* 2017; 7: 5237.
- Seessle J, Gohdes A, Gotthardt DN, Pfeiffenberger J, Eckert N, Stremmel W, et al. Alterations of lipid metabolism in Wilson disease. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 83.
- Serjeant GR. The Natural History of Sickle Cell Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3: a011783–a011783.
- Shah a B, 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.
- Sheinerman KS, Umansky SR. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 150.
- Shneider BL. ABCB4 Disease Presenting with Cirrhosis and Copper Overload-Potential Confusion with Wilson Disease. *J Clin Exp Hepatol* 2011
- Siaj R, Sauer V, Stöppeler S, Gerß J, Spiegel H-U, Köhler G, et al. Longitudinal analysis of serum miR-122 in a rat model of Wilson's disease. *Hepatol Int* 2012; 6: 770–7.
- Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS, et al. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2000; 15: 280–7.
- Sieprath T, Corne TDJ, Nooteboom M, Grootaert C, Rajkovic A, Buysschaert B, et al. Sustained accumulation of prelamin A and depletion of lamin A/C both cause oxidative stress and mitochondrial dysfunction but induce different cell fates. *Nucleus* 2015; 6: 236–46.
- Sieprath T, Darwiche R, De Vos WH. Lamins as mediators of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421: 635–9.
- Simon I, Schaefer M, Reichert J, Stremmel W. Analysis of the human Atox 1 homologue in Wilson patients. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2383–7.

- Simon J, Ouro A, Ala-Ibanibo L, Presa N, Delgado TC, Martínez-Chantar ML. Sphingolipids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma: Ceramide Turnover. *Int J Mol Sci* 2019; 21: 40.
- Singh AK, Rooge SB, Varshney A, Vasudevan M, Kumar M, Geffers R, et al. Identification of miRNAs associated with dendritic cell dysfunction during acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2020; jmv.26629.
- Singla A, Fedoseienko A, Giridharan SSP, Overlee BL, Lopez A, Jia D, et al. Endosomal PI(3)P regulation by the COMMD/CCDC22/CCDC93 (CCC) complex controls membrane protein recycling. *Nat Commun* 2019; 10: 4271.
- Sini M, Sorbello O, Civolani A, Liggi M, Demelia L. Non-invasive assessment of hepatic fibrosis in a series of patients with Wilson's Disease. *Dig Liver Dis* 2012; 44: 487–91.
- Sistare FD, DeGeorge JJ. Preclinical Predictors of Clinical Safety: Opportunities for Improvement. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 210–4.
- Sivera R, Espinós C, Vílchez JJ, Mas F, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, et al. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2010; 15: 334–44.
- Skowrońska M, Litwin T, Dzieżyc K, Wierchowska A, Cz<sup>3</sup>onkowska A. Does brain degeneration in Wilson disease involve not only copper but also iron accumulation? *Polish J Neurol Neurosurg* 2013; 47: 542–6.
- van de Sluis B. COMMD1 in Copper Homeostasis. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 57–63
- Smith-Vikos T, Liu Z, Parsons C, Gorospe M, Ferrucci L, Gill TM, et al. A serum miRNA profile of human longevity: Findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *Aging (Albany NY)* 2016; 8: 2971–87.
- Solé C, Domingo S, Ferrer B, Moliné T, Ordi-Ros J, Cortés-Hernández J. MicroRNA Expression Profiling Identifies miR-31 and miR-485-3p as Regulators in the Pathogenesis of Discoid Cutaneous Lupus. *J Invest Dermatol* 2019; 139: 51–61.
- Song M, Li X, Zhang X, Shi H, Vos MB, Wei X, et al. Dietary copper-fructose interactions alter gut microbial activity in male rats. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2018; 314: G119–30.
- Sorbello O, Sini M, Civolani A, Demelia L. HFE gene mutations and Wilson's disease in Sardinia. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 216–9.
- Squitti R, Siotto M, Bucossi S, Polimanti R. In silico investigation of the ATP7B gene: Insights from functional prediction of non-synonymous substitution to protein structure. *BioMetals* 2014; 27: 53–64.
- Stalke a., Skawran B, Auber B, Illig T, Schlegelberger B, Junge N, et al. Diagnosis of monogenic liver diseases in childhood by next-generation sequencing. *Clin Genet* 2018; 93: 665–70.
- Stalke A, Pfister E, Baumann U, Illig T, Reischl E, Sandbothe M, et al. MTF1 binds to metal-responsive element e within the ATP7B promoter and is a strong candidate in regulating the ATP7B expression. *Ann Hum Genet* 2020; 84: 195–200.
- Stapelbroek JM, Bollen CW, Ploos van Amstel JK, van Erpecum KJ, van Hattum J, van den Berg LH, et al. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol* 2004; 41: 758–63.
- Stättermayer AF, Entenmann A, Gschwantler M, Zoller H, Hofer H, Ferenci P. The dilemma to diagnose Wilson disease by genetic testing alone. *Eur J Clin Invest* 2019; e13147.
- Stättermayer AF, Traussnigg S, Dienes H-P, Aigner E, Stauber R, Lackner K, et al. Hepatic steatosis in Wilson disease--Role of copper and PNPLA3 mutations. *J Hepatol* 2015; 63: 156–63.
- Steele-Stallard HB, Pinton L, Sarcar S, Ozdemir T, Maffioletti SM, Zammit PS, et al. Modeling Skeletal Muscle Laminopathies Using Human Induced Pluripotent Stem Cells Carrying Pathogenic LMNA Mutations. *Front Physiol* 2018; 9: 1–19.
- Stirm L, Huypens P, Sass S, Batra R, Fritsche L, Brucker S, et al. Maternal whole blood cell miRNA-340 is elevated in gestational diabetes and inversely regulated by glucose and insulin. *Sci Rep* 2018; 8: 1366.

Stuehler B, Reichert J, Stremmel W, Schaefer M. Analysis of the human homologue of the canine copper toxicosis gene MURR1 in Wilson disease patients. *J Mol Med* 2004; 82: 629–34.

Südmeyer M, Saleh A, Wojtecki L, Cohnen M, Gross J, Ploner M, et al. Wilson's disease tremor is associated with magnetic resonance imaging lesions in basal ganglia structures. *Mov Disord* 2006; 21: 2134–9.

Svetel M, Kozi? D, Stefanova E, Semnic R, Draga?evi? N, Kosti? VS. Dystonia in Wilson's disease. *Mov Disord* 2001; 16: 719–23.

Szelenberger R, Kacprzak M, Saluk-Bijak J, Zielinska M, Bijak M. Plasma MicroRNA as a novel diagnostic. *Clin Chim Acta* 2019; 499: 98–107.

Taherdangkoo K, Kazemi Nezhad SR, Hajjari MR, Tahmasebi Birgani M. miR-485-3p suppresses colorectal cancer via targeting TPX2. *Bratislava Med J* 2020; 121: 302–7.

Tai CS, Wu JF, Chen HL, Hsu HY, Chang MH, Ni YH. Modality of treatment and potential outcome of Wilson disease in Taiwan: A population-based longitudinal study. *J Formos Med Assoc* 2018; 117: 421–6.

Takahara K, Schwarze U, Imamura Y, Hoffman GG, Toriello H, Smith LT, et al. Order of Intron Removal Influences Multiple Splice Outcomes, Including a Two-Exon Skip, in a COL5A1 Acceptor-Site Mutation That Results in Abnormal Pro- $\alpha$ 1(V) N-Propeptides and Ehlers-Danlos Syndrome Type I. 2002

Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Gan J. Serum MiRNA panel as potential biomarkers for chronic hepatitis B with persistently normal alanine aminotransferase. *Clin Chim Acta* 2015; 451: 232–9.

Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993; 5: 344–50.

Thomas GR, Forbes JR, Roberts E a, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet* 1995; 9: 210–7.

van Tienen FHJ, Lindsey PJ, Kamps MAF, Krapels IP, Ramaekers FCS, Brunner HG, et al. Assessment of fibroblast nuclear morphology aids interpretation of LMNA variants. *Eur J Hum Genet* 2019; 27: 389–99.

Todorov T, Balakrishnan P, Savov A, Socha P, Schmidt HHJ. Intragenic Deletions in ATP7B as an Unusual Molecular Genetics Mechanism of Wilson's Disease Pathogenesis. *PLoS One* 2016; 11: e0168372.

Trujillano D, Ramos MD, González J, Tornador C, Sotillo F, Escaramis G, et al. Next generation diagnostics of cystic fibrosis and CFTR -related disorders by targeted multiplex high-coverage resequencing of CFTR. *J Med Genet* 2013; 50: 455–62.

Tsai WC, Hsu S Da, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 2012; 122: 2884–97.

Vajro P, Zielinska K, Ng BG, Maccarana M, Bengtson P, Poeta M, et al. Three unreported cases of TMEM199-CDG, a rare genetic liver disease with abnormal glycosylation. *Orphanet J Rare Dis* 2018; 13: 3–8.

Vanegas MI, Marcé-Grau A, Martí-Sánchez L, Mellid S, Baide-Mairena H, Correa-Vela M, et al. Delineating the motor phenotype of SGCE-myoclonus dystonia syndrome. *Park Relat Disord* 2020; 80: 165–74.

Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. *Front Microbiol* 2016; 7: 1144.

Verstraeten VLRM, Caputo S, van Steensel MAM, Duband-Goulet I, Zinn-Justin S, Kamps M, et al. The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 959–71.

Vierling JM, Sussman NL. Wilson Disease in Adults. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 165–77

Vozza A, Parisi G, De Leonardi F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 960–5.

Walshe JM, Cox DW. Effect of treatment of Wilson's disease on natural history of haemochromatosis. *Lancet* 1998; 352: 112–3.

- Wan L, Su Z, Li F, Gao P, Zhang X. MiR-122-5p suppresses neuropathic pain development by targeting PDK4 [Internet]. *Neurochem Res* 2021[cited 2021 Feb 13] Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-020-03213-w>
- Wan L, Tsai C-H, Hsu C-M, Huang C-C, Yang C-C, Liao C-C, et al. Mutation analysis and characterization of alternative splice variants of the Wilson disease gene ATP7B. *Hepatology* 2010; 52: 1662–70.
- Wang J-S, Abuduxikuer K. Wilson Disease in China. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 345–53
- Wang K. Serum miR-885-5p can be used as a marker for efficacy prediction and prognosis of advanced liver cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2020; 66: 135–41.
- Wang P-W, Lin T-Y, Hung Y-C, Chang W-N, Yang P-M, Chen M-H, et al. Characterization of Fibrinogen as a Key Modulator in Patients with Wilson's Diseases with Functional Proteomic Tools. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 4528.
- Wang Y, Yang Y, Liu J, Chen X-C, Liu X, Wang C-Z, et al. Whole dystrophin gene analysis by next-generation sequencing: a comprehensive genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Mol Genet Genomics* 2014: 1013–21.
- Wang Z-Q, Zhang M-Y, Deng M-L, Weng N-Q, Wang H-Y, Wu S-X. Low serum level of miR-485-3p predicts poor survival in patients with glioblastoma. *PLoS One* 2017; 12: e0184969.
- Wei X, Ding J, Tian W, Yu Y-C. MicroRNA-122 as a diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma related to hepatitis C virus: a meta-analysis and systematic review. *J Int Med Res* 2020; 48: 030006052094163.
- Weiss KH, Członkowska A, Hedera P, Ferenci P. WTX101 – an investigational drug for the treatment of Wilson disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2018; 27: 561–7.
- Weiss KH, Runz H, Noe B, Gotthardt DN, Merle U, Ferenci P, et al. Genetic analysis of BIRC4/XIAP as a putative modifier gene of Wilson disease. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 233–40.
- Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: A familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912; 34: 295–507.
- Woimant F, Djebrani-Oussedik N, Poujois A. New tools for Wilson's disease diagnosis: exchangeable copper fraction. *Ann Transl Med* 2019; 7: S70–S70.
- Woimant F, Poujois A, Bloch A, Jordi T, Laplanche J, Morel H, et al. A novel deep intronic variant in ATP7B in five unrelated families affected by Wilson disease. *Mol Genet Genomic Med* 2020; 8: 1–9.
- Wooton-Kee CR, Robertson M, Zhou Y, Dong B, Sun Z, Kim KH, et al. Metabolic dysregulation in the *Atp7b*  $-/-$  Wilson's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci* 2020; 117: 2076–83.
- Wu P, Dong J, Cheng N, Yang R, Han Y, Han Y. Inflammatory cytokines expression in Wilson's disease. *Neurol Sci* 2019; 40: 1059–66.
- Xu A, Lv T, Zhang B, Zhang W, Ou X, Huang J. Development and evaluation of an unlabeled probe high-resolution melting assay for detection of ATP7B mutations in Wilson's disease. *J Clin Lab Anal* 2017; 31: e22064.
- Yamaguchi A, Matsuura A, Arashima S, Kikuchi Y, Kikuchi K. Mutations of ATP7B gene in Wilson disease in Japan: Identification of nine mutations and lack of clear founder effect in a Japanese population. *Hum Mutat* 1998; 11: 320–2.
- Yang L, Munck M, Swaminathan K, Kapinos LE, Noegel AA, Neumann S. Mutations in LMNA Modulate the Lamin A - Nesprin-2 Interaction and Cause LINC Complex Alterations. *PLoS One* 2013
- Yang Z, Wu W, Ou P, Wu M, Zeng F, Zhou B, et al. MiR-122-5p knockdown protects against APAP-mediated liver injury through up-regulating NDRG3. *Mol Cell Biochem* 2021; 476: 1257–67.
- Yu J, Shen J, Sun TT, Zhang X, Wong N. Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2013; 23: 483–91.
- Yubero D, Brandi N, Ormazabal A, Garcia-Cazorla À, Pérez-Dueñas B, Campistol J, et al. Targeted Next Generation Sequencing in Patients with Inborn Errors of Metabolism. *PLoS One* 2016; 11: e0156359.

van Zelm MC, Geertsema C, Nieuwenhuis N, de Ridder D, Conley ME, Schiff C, et al. Gross Deletions Involving IGHM, BTK, or Artemis: A Model for Genomic Lesions Mediated by Transposable Elements. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 320–32.

Zhang Z, Yin J, Yang J, Shen W, Zhang C, Mou W, et al. miR-885-5p suppresses hepatocellular carcinoma metastasis and inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 2016; 7: 75038–51.

Zhou X, Fang S, Wang M, Xiong A, Zheng C, Wang J, et al. Diagnostic value of circulating miRNA-122 for hepatitis B virus and/or hepatitis C virus-associated chronic viral hepatitis [Internet]. *Biosci Rep* 2019; 39[cited 2021 Feb 13] Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31427483/>

Zhuang X-H, Mo Y, Jiang X-Y, Chen S-M. Analysis of renal impairment in children with Wilson’s disease. *World J Pediatr* 2008; 4: 102–5.

Zischka H, Borchard S. Mitochondrial Copper Toxicity with a Focus on Wilson Disease. In: *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Elsevier; 2019. p. 65–75

Zischka H, Lichtmannegger J. Pathological mitochondrial copper overload in livers of Wilson’s disease patients and related animal models. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1315: 6–15.

Zmora N, Soffer E, Elinav E. Transforming medicine with the microbiome. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw1815.