

Diagnóstico de la enfermedad de Wilson y sus fenotipos usando inteligencia artificial

Diagnosis of Wilson disease and its phenotypes by using artificial intelligence

Valentina Medici , Anna Czlonkowska , Tomasz Litwin 
y Cecilia Giulivi[†] 

Acceso Abierto

Correspondencia:

cgiulivi@ucdavis.edu
Department of Molecular
Biosciences, School of Veterinary
Medicine, University of California
Davis, Davis,
CA 95616, USA
Medical Investigation of
Neurodevelopmental Disorders
(MIND) Institute, School of Medicine,
University of California Davis,
Sacramento, CA 95817, USA.

Sometido: 16-01-2023

Aceptado para publicación:

12-06-2023

Publicado en línea: 01-07-2023

Palabras clave:

Ciclo de Krebs; ciclo de la
urea; cobre; hígado;
metabolismo intermediario;
mitocondria; red neuronal
artificial.

Key words:

Artificial neural network;
copper; intermediary
metabolism; liver;
mitochondria; urea cycle;
Krebs' cycle.

Citación:

Medici, V.; Czlonkowska,
A.; Litwin, T.; Giulivi, C. Diagnóstico
de la enfermedad de Wilson y sus
fenotipos usando inteligencia
artificial. *Magna Scientia UCEVA*
2023; 3:1 54-64.
<https://doi.org/10.54502/msuceva.v3n1a5>

Resumen

La EW es causada por las variantes de ATP7B que alteran el eflujo de cobre y provocan una acumulación excesiva de cobre, principalmente en el hígado y el cerebro. El diagnóstico de la EW se ve dificultado por su evolución clínica variable, su aparición, su morbilidad y el tipo de variante ATP7B. Actualmente se diagnostica mediante una combinación de síntomas/signos clínicos, parámetros aberrantes del metabolismo del cobre (por ejemplo, niveles séricos bajos de ceruloplasmina y concentraciones elevadas de cobre urinario y hepático) y cuando están disponibles, a través de pruebas genéticas de mutaciones ATP7B. Dado que el diagnóstico y el tratamiento precoces son clave para obtener resultados favorables, es fundamental identificar a los sujetos antes de la aparición de manifestaciones clínicas manifiestamente perjudiciales. Con este fin, tratamos de mejorar el diagnóstico de la EW mediante algoritmos de redes neuronales artificiales (parte de la inteligencia artificial) integrando los parámetros clínicos y moleculares disponibles. Sorprendentemente, el diagnóstico de la EW se basó en los niveles plasmáticos de glutamato, asparagina, taurina y el cociente de Fischer. Dado que estos aminoácidos están relacionados con los ciclos urea-Krebs, nuestro estudio no sólo subraya el papel central de las mitocondrias hepáticas en la patología de la EW, sino también que la mayoría de los pacientes con EW presentan una disfunción hepática subyacente. Nuestro estudio aporta pruebas novedosas de que la inteligencia artificial utilizada para el análisis integrado de la EW puede dar lugar a un diagnóstico más precoz y a tratamientos mecánicamente relevantes para los pacientes con EW.

Abstract

WD is caused by ATP7B variants disrupting copper efflux resulting in excessive copper accumulation mainly in liver and brain. The diagnosis of WD is challenged by its variable clinical course, onset, morbidity, and ATP7B variant type. Currently it is diagnosed by a combination of clinical symptoms/signs, aberrant copper metabolism parameters (e.g., low ceruloplasmin serum levels and high urinary and hepatic copper concentrations), and genetic evidence of ATP7B mutations when available. As early diagnosis and treatment are key to favorable outcomes, it is critical to identify subjects before the onset of overtly detrimental clinical manifestations. To this end, we sought to improve WD diagnosis using artificial neural network algorithms (part of artificial intelligence) by integrating available clinical and molecular parameters. Surprisingly, WD diagnosis was based on plasma levels of glutamate, asparagine, taurine, and Fischer's ratio. As these amino acids are linked to the urea-Krebs' cycles, our study not only underscores the central role of hepatic mitochondria in WD pathology but also that most WD patients have underlying hepatic dysfunction. Our study provides novel evidence that artificial intelligence utilized for integrated analysis for WD may result in earlier diagnosis and mechanistically relevant treatments for patients with WD.



Introducción

La enfermedad de Wilson (OMIM 277900) está causada por variantes homocigotas o heterocigotas compuestas que afectan al gen ATP7B (OMIM 606882) en el cromosoma 13q14 que afectan al gen ATP7B (OMIM 606882) en el cromosoma 13q14. Este gen codifica para un polipéptido que, cuando actúa como dímero, muestra una actividad de la membrana plasmática [1,2]. La proteína tiene varios dominios de membrana, una secuencia consenso ATPasa, un dominio bisagra, un sitio de fosforilación y al menos dos sitios putativos de unión al cobre situados principalmente en el aparato de Golgi. Al funcionar como monómero, exporta cobre fuera de las células, garantizando el eflujo de cobre hepático a la bilis. Se han caracterizado variantes de empalme transcripcional que codifican diferentes isoformas con distintas localizaciones celulares.

El diagnóstico de la EW se complica por dos factores: el tipo de variante ATP7B y la evolución clínica de la enfermedad. La mayoría de las variantes del gen ATP7B observadas en pacientes incluyen mutaciones nonsense y frameshift junto con las deleciones, pero muy pocas proteínas tipo ATP7B truncadas o modificadas, conservan parte de su actividad nativa. Esto podría constituir la razón principal que subyace a los intentos no concluyentes de correlacionar el genotipo con el fenotipo [3,4] cuando se incluyen los parámetros del cobre [5].

La EW se presenta con una variable de curso clínico. Por ejemplo, los adultos jóvenes manifiestan con más frecuencia los primeros síntomas de la EW [6,7], pero algunos pacientes presentan un inicio tardío de la enfermedad mientras que otros, pueda que no muestren signos evidentes de toxicidad por cobre. Además, la EW suele clasificarse en tres fenotipos: *i*) principalmente hepático (40%); *ii*) neurológico (40%) y *iii*) psiquiátrico o asintomático (20%). Sin embargo, esta clasificación no se ajusta exactamente a los pacientes que presentan EW, ya que los signos neurológicos (por ejemplo, temblor, ataxia, distonía y parkinsonismo) a menudo se observan a menudo de forma concomitante con defectos metabólicos hepáticos [6-10].

Además, los signos neurológicos suelen presentarse más tarde que los asociados a la patología hepática [7,9-11]. Estas dificultades a la hora de reconocer los signos de la EW pueden dificultar la capacidad de los clínicos para realizar un diagnóstico preciso, lo que repercute en la administración de tratamientos

personalizados que pueden minimizar la progresión de la enfermedad.

Teniendo en cuenta los retos anteriores, el objetivo de este estudio fue aplicar la inteligencia artificial para ayudar en el proceso de diagnóstico de la EW y sus manifestaciones hepáticas o neurológicas. En este sentido, una red neuronal es una simulación de un cerebro biológico (también conocida como red neuronal artificial o RNA) y una rama de la inteligencia artificial. La RNA se "entrena" primero haciéndola procesar varios patrones de entrada y mostrando qué salida resulta de cada patrón de entrada. Una vez entrenada, la RNA puede reconocer similitudes cuando se le presenta un nuevo patrón de entrada, el resultado es un patrón de salida predicho. De este modo, la RNA detecta señales de alerta temprana provenientes de transiciones críticas definidas como transiciones de estado repentinas y a gran escala que ocurren en sistemas complejos [12,13].

En el caso de la EW, se puede especular que la RNA podría contribuir tanto al diagnóstico precoz de la enfermedad como a la caracterización y predicción de los fenotipos de la enfermedad. En este caso, se utilizará la amplitud de los resultados clínicos y moleculares para detectar similitudes de entrada, permitiendo así que la RNA construya un modelo predictivo para los fenotipos de la EW considerando el diagnóstico de la EW y sus fenotipos como puntos críticos de transición [12,14-19]. Esto puede lograrse incluso con una variabilidad entre sujetos relativamente mayor, como la observada en humanos en comparación con los modelos EW en animales isogénicos/clónicos mantenidos en condiciones controladas y rigurosas.

Métodos

Muestras biológicas

Los datos demográficos y clínicos de los pacientes (edad, sexo e IMC; diagnóstico de EW y subclasificación en hepática, neurológica o asintomática [5]) se recogieron en un único centro, el Segundo Departamento de Neurología del Instituto de Psiquiatría y Neurología de Varsovia, Polonia. Todos los pacientes fueron reclutados cuando estaban en pretratamiento (es decir, no recibían ningún tratamiento contra el cobre). Todos los pacientes fueron diagnosticados con EW tomando como base los criterios de Leipzig, incluyendo niveles bajos de ceruloplasmina, aumento de los niveles de cobre

hepático y urinario en 24 h, presencia de anillos de Kayser-Fleischer, presencia de síntomas neurológicos, anemia hemolítica Coombs-negativa, y eventuales resultados de pruebas genéticas si estaban disponibles, tal y como se había descrito previamente [20,21]. Otras pruebas hepáticas básicas de laboratorio (por ejemplo, la bilirrubina total) se realizaron en el laboratorio del hospital utilizando métodos estándar. Se obtuvieron muestras de sujetos sanos de control de la misma comunidad de Polonia. El estudio fue aprobado por el comité local de bioética y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito antes de participar siguiendo la Declaración de Helsinki.

El número de copias y las deleciones de ADN mitocondrial (ADNmt) con determinación total en sangre, se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente [22]. Cabe destacar que los sujetos incluidos en el presente análisis son los mismos descritos en nuestro anterior estudio de ADNmt [22]. Los metabolitos séricos se determinaron por espectrometría de masas como se ha descrito anteriormente [23,24]. Los metabolitos séricos se normalizaron con respecto a la media de los valores de control y se expresaron como el pliegue de cambio \log_2 (\log_2 PC). Los valores perdidos se sustituyeron utilizando el algoritmo de aproximación de características del vecino k-más cercano.

Red neuronal artificial (RNA) para el diagnóstico

El diseño de la red neuronal para el algoritmo SFAM consistió en una red de tres capas: una capa de entrada, con cuatro unidades para los criterios de diagnóstico definidos como control, EW asintomática o EWA, EW hepática o EWH y EW neurológica o EWN; sexo, edad e IMC; 66 unidades para metabolitos relevantes para el metabolismo hepático, 3 unidades para ratios de metabolitos y 2 unidades para datos asociados al ADNmt; una capa oculta, con 11 unidades; y una capa de salida para el diagnóstico de EW. Para la predicción de la EW y sus fenotipos se utilizó el algoritmo SFAM del software NeuNet Pro (CorMac Technologies Inc., Thunder Bay, ON, Canadá). Las variables de capacitación no supervisada incluyeron todas las indicadas anteriormente. Para seleccionar el tamaño del conjunto de capacitación, se realizó un análisis de la curva de aprendizaje [25].

Básicamente, se extrajo una muestra aleatoria

relativamente pequeña de los datos para capacitar una RNA y se utilizó este set de capacitación para predecir un conjunto de prueba muestreado aleatoriamente. A continuación, el tamaño de la muestra de capacitación se incrementó de forma iterativa manteniendo el mismo conjunto de pruebas. Mediante el seguimiento del grado en que la precisión predictiva en el conjunto de prueba, aumentaba con el tamaño del conjunto de entrenamiento, se obtuvieron los datos necesarios de capacitación hasta que las diferencias entre las clasificaciones de la red y los diagnósticos clínicos se tornen aceptables (41 muestras de capacitación y 21 de prueba). También se replicó el análisis de la curva de aprendizaje varias veces con diferentes muestras del conjunto de pruebas para reducir aún más la variación en la precisión predictiva. Por último, los patrones de los hechos de entrada asociados a los diagnósticos, se capacitaron con 41 sujetos seleccionados al azar del conjunto 62 con estado clínico conocido. Una vez capacitada la red, se "probaron" los 21 sujetos restantes mediante la RNA capacitada.

A continuación, las clasificaciones de la red neuronal se compararon con los diagnósticos clínicos conocidos para observar si la red era capaz de clasificar el estado de la enfermedad con fiabilidad. Los mismos datos se analizaron con la Extracción Visual de Reglas, que es una versión altamente optimizada del algoritmo C4.5 publicado por Ross Quinlan [26] para generar un árbol de decisión con poda de árbol ajustable. La extracción inductiva de reglas, relacionada con los campos del aprendizaje automático, el descubrimiento de conocimientos, los sistemas expertos y la inteligencia artificial, suele denominarse "clasificación de árboles de decisión". El método depende del concepto de entropía, introducido en el campo de la teoría de la información por el Dr. Shannon hace más de 70 años [27]. Nuestro análisis incluyó una poda del 75% con mínimo 4 sujetos.

Resultados

Un total de 62 sujetos fueron incluidos en el análisis. De ellos, 47 fueron diagnosticados con EW (23 mujeres/24 varones) con manifestaciones hepáticas prevalentes (EWH; n=18; 11 mujeres/7 varones) y neurológicas prevalentes (EWN; n=18; 7 mujeres/11 varones) o eran asintomáticos (EWA; n=11; 5 varones/6 mujeres). La edad media de los 15 sujetos de control sanos (10 mujeres/5 varones) era de 36 ± 9 años (media \pm DE), que no difiere con la de los

pacientes con EW (34±11 años).

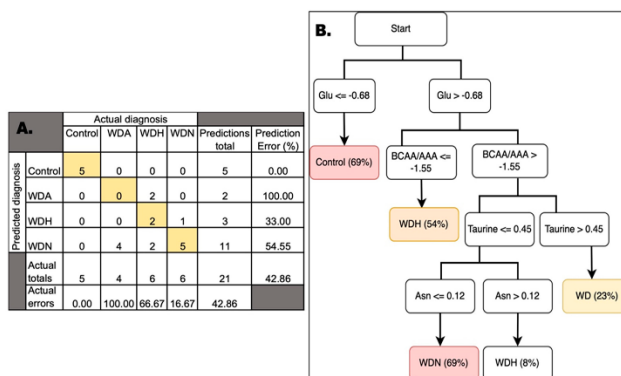
Con el fin de aplicar la RNA, se utilizó dos tercios de las muestras seleccionadas aleatoriamente (de las 62) para capacitar la RNA utilizando como datos de entrada el diagnóstico de EW (control sano, EWA, EWH y EWN), la edad, el sexo, el IMC, la bilirrubina total, los niveles de ceruloplasmina, el número de copias y deleciones de ADNmt de la muestra total en sangre y 66 metabolitos séricos relevantes para la fisiología hepática, todos ellos evaluados a través de espectrometría de masas. También se incluyeron las siguientes tres relaciones de metabolitos relevantes: lactato-piruvato, como característica de la disfunción mitocondrial [28]; los niveles de cistina normalizados a la suma de cistina y cisteína, como marcador del estrés oxidativo [29,30] y la relación de Fischer (que es la relación entre los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y los aminoácidos aromáticos (AAA) [31]), como biomarcador de fibrosis avanzada.

Utilizando un mapa simplificado de teoría de resonancia adaptativa difusa para predecir una clase (en nuestro caso, el diagnóstico de EW), la clasificación RNA identificó a los sujetos con EW frente a los que no la padecían con una precisión del 100% (IC del 95% = 83.89 al 100%) y una sensibilidad y especificidad del 100% (IC del 95%, respectivamente, 79.41% al 100% y 47.82% al 100%). En conjunto, cuando se consideran los diferentes fenotipos, la RNA mostró una precisión del 57.14% (Figura 1A). Los diagnósticos de control y EWN presentaron los menores errores (0% y 16.67%, respectivamente), mientras que los diagnósticos de EWA y EWN presentaron errores del 100% y 66.67%. Los desajustes entre los diagnósticos previstos y los reales se debieron principalmente a la reclasificación del 60% de los sujetos afectados por la enfermedad de Wilson (los cuatro diagnosticados con EWA y dos de los seis diagnosticados con EWH), lo que sugiere la posible existencia de problemas neurológicos subclínicos o no detectados en pacientes diagnosticados con la enfermedad EW bien sea EWA o EWH.

Se analizó la misma configuración a través de un algoritmo de extracción de reglas visuales para determinar qué resultados debían recogerse y en qué orden para llegar a un diagnóstico fiable, qué pacientes necesitaban una segunda opinión respecto a su diagnóstico y, por último, qué combinación de factores era importante para llegar a un diagnóstico

(Figura 1B). Nuestros resultados muestran que el diagrama de flujo resultante para determinar el diagnóstico se construyó básicamente sobre valores de nueve aminoácidos y derivados (glutamato, asparagina, taurina, aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos; Figura 1B).

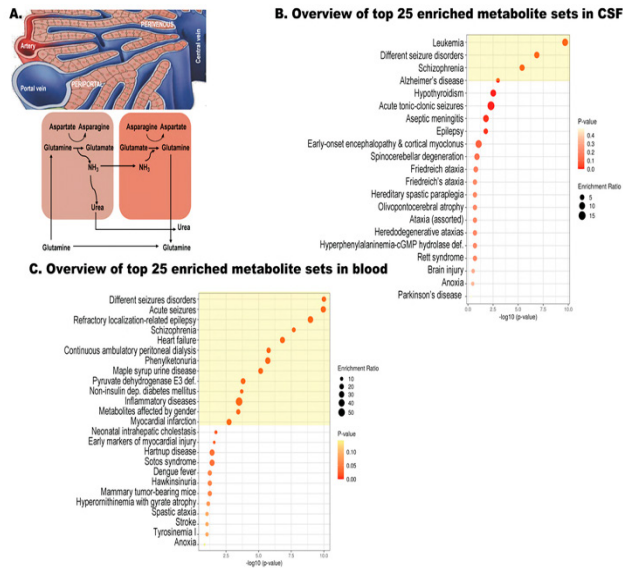
Figura 1. Matriz de confusión y árbol de decisión para el diagnóstico de la EW y sus manifestaciones mediante el uso de redes neuronales artificiales



(A) Las muestras de prueba (n = 21) se "capacitaron" utilizando la RNA obtenida a partir del set de capacitación. Aplicando un mapa simplificado de teoría de resonancia adaptativa difusa, la parte superior de la tabla muestra el diagnóstico real frente al predicho. Los números de las casillas representan el número de sujetos, excepto los errores, que se expresan en porcentajes. Las casillas coloreadas son las que coinciden con los diagnósticos reales y los predichos. (B) Árbol de decisión que muestra los principales resultados necesarios para llegar al diagnóstico de la EW y sus fenotipos. Las confianzas diagnósticas (en porcentaje) se indican entre paréntesis. Otros detalles se encuentran en el texto.

El subgrupo de control sano se identificó con un 69% de confianza considerando únicamente los niveles del aminoácido glutamato ($\log_2FC \leq -0,68$; Figura 1B). En pacientes con enfermedad hepática, como los hepatocitos no pueden convertir el amoníaco en urea y glutamina con suficiente rapidez, el nivel de amoníaco en sangre, aumenta. La desviación de la sangre del hígado -como se observa en la hipertensión portal con interferencia en el ciclo intercelular de la glutamina (Figura 2A)- provoca un aumento de los niveles de amoníaco y glutamato. Estos cambios son la probable explicación metabólica subyacente de nuestros hallazgos, lo que indica que los niveles de glutamato podrían ser un factor discriminatorio entre los controles sanos y los pacientes con EW.

Figura 2. Análisis de enriquecimiento de los resultados identificados por RNA y el ciclo intercelular de la glutamina en EW

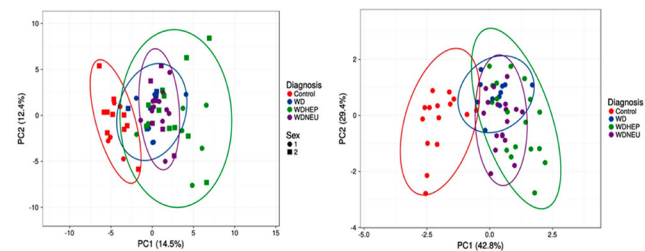


(A) Diagrama que muestra el ciclo intercelular de la glutamina tal como se produce entre las células periportales y las perivenosas que rodean la vena central. La acumulación de cobre induce toxicidad hepática, lo que provoca una disminución de la función del ciclo de la urea que socava la eliminación segura del exceso de amoníaco en forma de urea. El exceso de amoníaco, formado por la acción de la glutaminasa sobre la glutamina (entre otros), se utiliza entonces para generar glutamato a expensas del intermediario del ciclo de Krebs alfa-cetoglutarato, así como aumentos de asparagina a expensas de aspartato. La menor actividad del ciclo de Krebs se traduce en una menor producción de ATP, lo que puede cuestionar la generación de glutamina a partir de glutamato impulsada por el ATP. Los análisis de enriquecimiento se realizaron utilizando los aminoácidos y derivados identificados en la Figura 1B como entrada frente a una base de datos de firmas de enfermedades en LCR (B) y sangre (C). Aquellos resaltados en amarillo tenían un FDR < 0,05. El análisis se realizó con el software MetaboAnalyst® [33].

Con niveles altos de glutamato, una relación baja de BCAA/AAA ($\log_2FC \leq -1.55$) indica un diagnóstico de EWH con un 54% de confianza. Si los niveles de BCAA/AAA están por encima del umbral, entonces los niveles bajos tanto de taurina ($\log_2FC \leq 0.45$) como de asparagina ($\log_2FC \leq 0.12$) dan lugar a un diagnóstico de NDM con un 69% de confianza (Figura 1B). La combinación de una proporción elevada de glutamato y BCAA/AAA con niveles de taurina por encima del umbral da lugar a un diagnóstico de EW con una confianza del 23% (Figura 1B).

El análisis de enriquecimiento realizado con los nueve aminoácidos y derivados implicados en el diagnóstico de la EW (de la Figura 1B) frente a una base de datos de firmas de enfermedades en líquido cefalorraquídeo humano (Figura 2B) y sangre (Figura 2C) indicó un solapamiento significativo con manifestaciones asociadas a la EW. Entre ellas, se identificaron convulsiones, ataxia, inflamación, trastornos aminoacídicos o metabólicos (solapamiento con diabetes, Hartnup y tirosinemia), trastornos sistémicos (solapamiento con ataxia de Friedreich), deterioro cognitivo [38] y colestasis [39]. Por último, el análisis de componentes principales realizado con todos los resultados frente a los nueve aminoácidos y derivados del árbol de decisión mostró que la separación entre controles sanos y pacientes con EW, es la más eficiente. Por el contrario, tanto los diagnósticos de EWA como de EWN parecen ser subconjuntos del grupo más amplio de EWH, lo que sugiere que todos los pacientes pueden presentar diversos grados de alteración de la función hepática subyacente y potencialmente infradiagnosticada o infravalorada (Figura 3).

Figura 3. Análisis de componentes principales de los cuatro grupos de diagnóstico basados en todos los resultados y los nueve aminoácidos y derivados seleccionados del árbol de decisión



El PCA (utilizando ClustVis 2.0 [40]) se aplicó al conjunto de datos de prueba utilizando todos los resultados como entrada (panel superior; n = 62 puntos). Se aplicó el escalado de varianza unitaria a las filas; se utilizó la descomposición de valor singular con imputación para calcular el análisis de componentes principales (a los paneles superior e inferior). Otras opciones se establecieron de la siguiente manera: no se realizó ninguna transformación de datos y no se realizó ningún colapso de columnas con anotaciones similares; el porcentaje máximo de datos no disponibles permitidos tanto en filas como en columnas se estableció en 99.99; el centrado de filas; la no eliminación de columnas constantes y el escalado de filas, se basó en el escalado de varianza unitaria; el método PCA se calculó utilizando la descomposición de valor singular. Los ejes x e y muestran el componente principal 1 y el componente principal 2, que explican el 14.5% y el 12.4% de la varianza total, respectivamente. Las elipses de predicción poseen una probabilidad de 0,95, y una nueva observación del mismo grupo caerá dentro de la elipse (ambos paneles). El panel inferior se realizó utilizando sólo la relación BCAA/AAA y los niveles de glutamato, asparagina y taurina.

Discusión

En particular, la enfermedad hepática avanzada se asocia a trastornos metabólicos, especialmente en los niveles de aminoácidos, la mayoría de los cuales están directa o indirectamente relacionados con los ciclos de la urea (eliminación de nitrógeno) y de Krebs. Estos resultados también ponen de relieve el papel crítico de las mitocondrias hepáticas en la morbilidad de la EW, como demostraron nuestros propios estudios anteriores [22,32].

Si los niveles de asparagina están por encima del umbral, el diagnóstico es EWH con un 8% de confianza. Aunque la mayoría de los aminoácidos son metabolizados por el hígado, los BCAA son metabolizados exclusivamente por el músculo esquelético. Por lo tanto, en la insuficiencia hepática progresiva y la hepatopatía terminal, como se observa en asociación con la acumulación de cobre, el metabolismo de estos últimos aminoácidos no se ve afectado, mientras que el metabolismo de otros aminoácidos, especialmente los aromáticos, se ve gravemente afectado. Por lo tanto, las concentraciones sanguíneas de BCAA son normales, mientras que las de AAA aumentan, incrementando así la proporción BCAA/AAA. Dado que ambos tipos de aminoácidos se transportan al cerebro a través del mismo portador, el cambio en la relación de concentración aumenta la cantidad de AAA que entra en el cerebro.

Teniendo en cuenta que estos aminoácidos (tirosina y triptófano) son los precursores de aminas biogénicas cruciales, dopamina, noradrenalina y serotonina (5-hidroxitriptamina) y dado que la síntesis de serotonina en el cerebro no contiene un paso generador de flujo, estos cambios en los niveles sanguíneos de aminoácidos aumentan las concentraciones de aminas en el cerebro. Como los niveles de serotonina en el cerebro promueven el sueño, grandes cantidades de triptófano y serotonina podrían explicar los problemas neurológicos y el letargo observados en algunos pacientes afectados por la EW [34]. Estos desequilibrios en los neurotransmisores, junto con los déficits en la eliminación de nitrógeno a través del ciclo de la urea y el desvío de alfa-cetoglutarato del ciclo de Krebs,

pueden contribuir aún más al fallo energético y a la toxicidad por amoníaco en el SNC.

Los niveles elevados de taurina parecen proteger de algún modo a los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer de entrar en una vía que desemboque en el diagnóstico de esta enfermedad. La taurina es un aminoácido libre intracelular abundante que tiene un papel central en el desarrollo del cerebro, y es el segundo neurotransmisor inhibitorio más importante después del GABA. También forma conjugados con ácidos biliares y puede mejorar el flujo biliar y aumentar la eliminación del colesterol por el hígado. La taurina, en el contexto del estrés oxidativo inducido por el cobre, también puede desempeñar un papel en la recuperación de intermediarios tóxicos (véase [35] y referencias sucesivas). Curiosamente, la taurina en adultos puede obtenerse de la dieta o de la síntesis a partir de la cisteína cuando la vitamina B6 está presente.

Aunque la deficiencia de vitamina B6 no parece asociarse con frecuencia a las nuevas formulaciones de penicilamina, se ha propuesto que algunos de los efectos secundarios del quelante del cobre D-penicilamina pueden ser el resultado de la interferencia con el metabolismo de la vitamina B6, favoreciendo así problemas neurológicos [36,37]. Dado que los pacientes estudiados no estaban recibiendo ningún tratamiento en el momento de la extracción de sangre, resulta tentador proponer que los aumentos del estrés oxidativo mediados por el cobre pueden reducir los niveles de cisteína, así como los de B6, lo que da lugar a una disminución de la taurina que desencadena algunos de los síntomas neurológicos debido a un desequilibrio entre los neurotransmisores excitatorios e inhibitorios.

El árbol de decisión mostró algunos fenotipos (control, EWH y EWN) que se diagnosticaron con niveles de confianza adecuados, mientras que fue menos útil para EWA. Esto sugiere que, de acuerdo con el análisis ANN, la mayoría de los sujetos afectados por EW podrían en realidad ser EWN o EWH incluso cuando todavía están clínicamente asintomáticos. En particular, cuando los niveles de taurina y asparagina son bajos y los de glutamato altos, el aumento de la proporción de BCAA/AAA

desplaza el diagnóstico de EWH a EWN, lo que sugiere que estos parámetros deberían analizarse en todos los pacientes con EWN para controlar sus manifestaciones clínicas y la posible progresión de los signos y síntomas hepáticos a neurológicos.

Conclusiones

Mediante la evaluación de nueve aminoácidos y derivados, es posible diagnosticar la EW con un nivel de confianza aceptable para aquellos que presentan manifestaciones hepáticas y neurológicas. Sorprendentemente, los resultados que suelen analizarse en la EW, como los niveles de ceruloplasmina y bilirrubina total o los parámetros demográficos y clínicos comunes, como la edad, el sexo o el IMC, no desempeñaron ningún papel en nuestro árbol de decisión. El hallazgo de que nueve aminoácidos reflejan principalmente la función hepática de la ND y la NDH, así como la interacción entre la urea y el ciclo de Krebs, es coherente con el papel de la disfunción mitocondrial tanto en pacientes como en modelos de ratón de la enfermedad [22,32,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57]. Una limitación importante de la cohorte estudiada es la falta de evaluaciones directas (biopsia hepática y análisis histológicos) o indirectas (imágenes hepáticas y cerebrales) de la morbilidad de la enfermedad.

Además, no estamos comparando los casos de EW con otras etiologías de enfermedades hepáticas, y no disponemos de una cohorte prospectiva para evaluar los riesgos longitudinales en el desarrollo de manifestaciones de EW. Algunos de nuestros hallazgos pueden no ser específicos de la EW, sino que podrían estar asociados con la fibrosis hepática y la hipertensión portal en general. Sin embargo, el algoritmo propuesto podría tener un valor incremental si se añade a los parámetros diagnósticos existentes de alteración del metabolismo del cobre (excepto la ceruloplasmina) o a los hallazgos de imágenes hepáticas o cerebrales [58], y podría agilizar el proceso diagnóstico. Podría argumentarse que añadir informes histológicos podría mejorar la precisión del algoritmo basado en RNA. Sin embargo, los diagnósticos y evaluaciones no invasivos de la enfermedad hepática se están

convirtiendo en el estándar de atención para la mayoría de las enfermedades hepáticas. Por ello, el acceso a los informes histológicos es menos habitual. Un sistema de puntuación basado en la histología hepática probablemente no ayudará a la práctica clínica actual y futura. Por otra parte, los estudios futuros deberían intentar integrar los sistemas de puntuación validados de la EWH, incluida la puntuación de Leipzig, en los enfoques de RNA para mejorar aún más su precisión clínica.

Además, nuestros hallazgos pueden tener relevancia a la hora de diseñar terapias dirigidas o de optimizar los enfoques dietéticos en el tratamiento de pacientes con EW. Los enfoques dietéticos en la EW deberían tener como objetivo reducir la sobrecarga del ciclo de la urea y, en consecuencia, la disfunción mitocondrial, asegurando al mismo tiempo una ingesta proteica adecuada para minimizar la sarcopenia asociada a la hipertensión portal. Además, el ajuste de la proporción de BCAA/AAA, que se ha estudiado ampliamente como enfoque para el tratamiento de la encefalopatía hepática [59,60,61,62,63,64,65], puede ser especialmente útil en la EW cuando coexisten manifestaciones hepáticas y neurológicas.

Financiación

Esta investigación fue financiada por los Institutos Nacionales de Salud, subvención número R01DK104770. El contenido es responsabilidad exclusiva de los autores y no representa necesariamente la opinión oficial de los NIH.

Declaración del Comité de Revisión Institucional

El Comité de Revisión Institucional de la Universidad de California (UC) Davis y el Comité para la Protección de Sujetos Humanos del Estado de California-EEUU aprobaron este estudio (Protocolo No. 818454).

Declaración de consentimiento informado

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos que participaron en el estudio. No se recogieron datos ni muestras hasta que se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes. Se ha obtenido el consentimiento informado por escrito de los pacientes para publicar este artículo.

to the design

Declaración de disponibilidad de datos

Los datos metabólicos presentados en este estudio se publicaron anteriormente [22,23,24]. En este estudio no se crearon nuevos datos metabólicos.

Agradecimientos

Deseamos dar las gracias a todos los sujetos que participaron en este estudio.

Conflicto de Interés

Los financiadores (NIH) no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio; en la recogida, análisis o interpretación de los datos; en la redacción del manuscrito o en la decisión de publicar los resultados. Valentina Medici forma parte del Consejo Asesor de Alexion Pharmaceuticals. El resto de los autores declara no tener ningún conflicto de intereses.

Consentimiento de publicación

Los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

Perfil de Autoría

Valentina Medici

Valentina Medici MD, FAASLD Profesora de la Universidad de California Davis. La Dra. Medici se licenció en medicina en la Universidad de Padua, Italia, en 2000, donde también completó su beca de gastroenterología en 2004. Es profesora de la UC Davis desde 2006. Sus intereses de investigación se centran en el metabolismo de los lípidos y la regulación epigenética de la expresión génica en diversas enfermedades hepáticas, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la enfermedad hepática asociada al alcohol y la enfermedad de Wilson.



Anna Czlonkowska

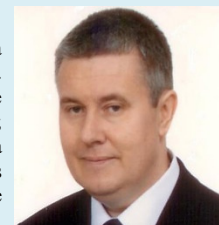
La Prof. Anna Czlonkowska MD, PhD terminó sus estudios en la Academia de Medicina de Varsovia. Desde 1985, trabaja en el 2º Departamento de Neurología del Instituto de Psiquiatría y Neurología de Varsovia (hasta finales de 2014 como jefa del departamento). Desde hace años también colabora con el Departamento de Farmacología de la Universidad Médica de



Varsovia. Sus principales intereses son: el ictus (epidemiología, tratamiento, rehabilitación), la neuroinmunología (esclerosis múltiple, inmunidad local y sistémica en la neurodegeneración) y la enfermedad de Wilson. Ha superado varias becas de investigación en neuroinmunología y neuropatología (Reino Unido, Alemania, EE.UU.) y ha participado en numerosos estudios clínicos sobre accidentes cerebrovasculares. Ha coordinado en Polonia el Programa Nacional de Prevención y Tratamiento del Ictus y la parte neurológica del Programa Nacional de Prevención y Tratamiento de las Enfermedades Cardiovasculares en los años 1997-2008. Es presidenta de la Sección Cerebrovascular de la Sociedad Neurológica Polaca. Es miembro de la junta directiva de la Sociedad de Accidentes Cerebrovasculares de Europa Central y Oriental, de la que fue presidenta durante cuatro años, organizando varios cursos de formación y congresos sobre accidentes cerebrovasculares en esta región. Durante varios años fue miembro del Consejo de la Sociedad Internacional de Accidentes Cerebrovasculares, la Organización Mundial de Accidentes Cerebrovasculares y la Organización Europea de Accidentes Cerebrovasculares.

Tomasz Litwin

Profesor Asociado del Instituto de Psiquiatría y Neurología (IPiN), Varsovia, Polonia. Entre sus intereses de investigación se encuentran: la neurodegeneración; enfermedades neurológicas; neurología clínica; las enfermedades neurodegenerativas; el tratamiento de enfermedades hepáticas, los antioxidantes, la neuroimagen; las enfermedades cerebrales y la actividad antioxidante. Tomasz Litwin ha contribuido a la investigación en temas como la Enfermedad de Wilson & Distonía. El autor tiene un h-index de 35, es coautor de 105 publicaciones que reciben 5731 citas.



Cecilia Giulivi

Profesora adscrita al Departamento de Biociencias Moleculares. Facultad de Veterinaria de la Universidad de California Davis, EEUU. Los campos de estudio por los que es más conocida son: enzimas; genes y bioquímica. Sus principales temas de investigación son la bioquímica, la mitocondria, el óxido nítrico, la óxido nítrico sintasa y el estrés oxidativo. Sus estudios de Bioquímica se centran principalmente en la citocromo c oxidasa, la proteólisis, la fosforilación oxidativa, la intracelular y la superóxido dismutasa. Su trabajo en la fosforilación oxidativa aborda cuestiones como la partícula submitocondrial, que están relacionadas con campos como la prueba de la oxidasa. Su investigación sobre mitocondrias incluye elementos de endocrinología, ataxia, medicina interna y alelo FMR1. Su investigación sobre el óxido nítrico incorpora elementos de citocromo y ATP sintasa. Cecilia R Giulivi ha investigado el estrés oxidativo en varios campos, incluida la degradación de proteínas y el peróxido de hidrógeno. Su trabajo en el campo del óxido nítrico reúne a familias de la ciencia como la partícula submitocondrial, la enzima y el oxígeno. Su estudio sobre Endocrinología integra preocupaciones de otras disciplinas, como Toxicidad, Ataxia y Alelo, FMR1. Su investigación integra cuestiones de especies reactivas del oxígeno, tirosina y degradación de proteínas en su estudio del estrés oxidativo.



Referencias

- [1] Harris, E.D. Cellular copper transport and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2000, 20, 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.291>
- [2] Jayakanthan, S.; Braiterman, L.T.; Hasan, N.M.; Unger, V.M.; Lutsenko, S. Human copper transporter ATP7B (Wilson disease protein) forms stable dimers in vitro and in cells. *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 18760–18774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807263>
- [3] Gromadzka, G.; Schmidt, H.H.-J.; Genschel, J.; Bochow, B.; Rodo, M.; Tarnacka, B.; Litwin, T.; Chabik, G.; Czlonkowska, A. Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin. Genet.* 2005, 68, 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00528.x>
- [4] Panagiotakaki, E.; Tzetzis, M.; Manolaki, N.; Loudianos, G.; Papatheodorou, A.; Manesis, E.; Nousia-Arvanitakis, S.; Kanavakis, E. Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am. J. Med. Genet.* 2004, 131A, 168–173. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30345>
- [5] Czlonkowska, A.; Litwin, T.; Dzieżyc, K.; Karliński, M.; Bring, J.; Bjartmar, C. Characteristics of a newly diagnosed Polish cohort of patients with neurological manifestations of Wilson disease evaluated with the Unified Wilson's Disease Rating Scale. *BMC Neurol.* 2018, 18, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1039-y>
- [6] Czlonkowska, A.; Litwin, T.; Dusek, P.; Ferenci, P.; Lutsenko, S.; Medici, V.; Rybakowski, J.K.; Weiss, K.H.; Schilsky, M.L. Wilson disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2018, 4, 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>
- [7] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J. Hepatol.* 2012, 56, 671–685. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.11.007>
- [8] Ferenci, P.; Czlonkowska, A.; Merle, U.; Ferenc, S.; Gromadzka, G.; Yurdaydin, C.; Vogel, W.; Bruha, R.; Schmidt, H.T.; Stremmel, W. Late-Onset Wilson's Disease. *Gastroenterology* 2007, 132, 1294–1298. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.057>
- [9] Lorincz, M.T. Neurologic Wilson's disease. *Ann. New York Acad. Sci.* 2009, 1184, 173–187. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05109.x>
- [10] Steindl, P.; Ferenci, P.; Dienes, H.P.; Grimm, G.; Pabinger, I.; Madl, C.; Dobersberger, T.M.; Hermeth, A.; Dragosics, B.; Meryn, S.; et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: A diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1997, 113, 212–218. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70097-0](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70097-0)
- [11] Czlonkowska, A.; Tarnacka, B.; Litwin, T.; Gajda, J.; Rodo, M. Wilson's disease—cause of mortality in 164 patients during 1992–2003 observation period. *J. Neurol.* 2005, 252, 698–703. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0720-4>
- [12] Chen, L.; Liu, R.; Liu, Z.-P.; Li, M.; Aihara, K. Detecting early-warning signals for sudden deterioration of complex diseases by dynamical network biomarkers. *Sci. Rep.* 2012, 2, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep00342>
- [13] Scheffer, M.; Bascompte, J.; Brock, W.A.; Brovkin, V.; Carpenter, S.R.; Dakos, V.; Held, H.; van Nes, E.; Rietkerk, M.; Sugihara, G. Early-warning signals for critical transitions. *Nature* 2009, 461, 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature08227>
- [14] Jiang, L.; Sui, D.; Qiao, K.; Dong, H.-M.; Chen, L.; Han, Y. Impaired functional criticality of human brain during Alzheimer's disease progression. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19674-7>
- [15] Liu, X.; Chang, X.; Liu, R.; Kazuyuki, A.; Chen, L.; Aihara, K. Quantifying critical states of complex diseases using single-sample dynamic network biomarkers. *PLoS Comput. Biol.* 2017, 13, e1005633. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005633>
- [16] Liu, X.; Liu, R.; Zhao, X.-M.; Chen, L.; Liu, X.; Liu, R.; Zhao, X.-M.; Chen, L. Detecting early-warning signals of type 1 diabetes and its leading biomolecular networks by dynamical network biomarkers. *BMC Med. Genom.* 2013, 6, S8. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-6-S2-S8>
- [17] Lu, L.; Jiang, Z.; Dai, Y.; Chen, L. Low-grade dysplastic nodules revealed as the tipping point during multistep hepatocarcinogenesis by dynamic network biomarkers. *Genes* 2017, 8, 268. <https://doi.org/10.3390/genes8100268>
- [18] Teschendorff, A.E.; Liu, X.; Caren, H.; Pollard, S.M.; Beck, S.; Widschwendter, M.; Chen, L. The dynamics of DNA methylation covariation patterns in carcinogenesis. *PLoS Comput. Biol.* 2014, 10, e1003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003709>
- [19] Yang, B.; Li, M.; Tang, W.; Liu, W.; Zhang, S.; Chen, L.; Xia, J. Dynamic network biomarker indicates pulmonary metastasis at the tipping point of hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* 2018, 9, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03024-2>
- [20] Czlonkowska, A.; Gajda, J.; Rodo, M. Effects of long-term treatment in Wilson's disease with D-penicillamine and zinc sulphate. *J. Neurol.* 1996, 243, 269–273. <https://doi.org/10.1007/BF00868525>
- [21] Gromadzka, G.; Chabik, G.; Mendel, T.; Wierzchowska, A.; Rudnicka, M.; Czlonkowska, A. Middle-aged heterozygous carriers of Wilson's disease do not present with significant phenotypic deviations related to copper metabolism. *J. Genet.* 2010, 89, 463–467. <https://doi.org/10.1007/s12041-010-0065-3>
- [22] Medici, V.; Sarode, G.V.; Napoli, E.; Song, G.; Shibata, N.M.; Guimarães, A.O.; Mordaunt, C.E.; Kieffer, D.A.; Mazi, T.A.; Czlonkowska, A.; et al. mtDNA depletion-like syndrome in Wilson disease. *Liver Int.* 2020, 40. <https://doi.org/10.1111/liv.14646>
- [23] Mazi, T.A.; Sarode, G.V.; Czlonkowska, A.; Litwin, T.; Kim, K.; Shibata, N.M.; Medici, V. Dysregulated choline, methionine, and aromatic amino acid metabolism in patients with Wilson Disease: Exploratory metabolomic profiling and implications for hepatic and neurologic phenotypes. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5937. <https://doi.org/10.3390/ijms20235937>
- [24] Sarode, G.V.; Kim, K.; Kieffer, D.A.; Shibata, N.M.; Litwin, T.; Czlonkowska, A.; Medici, V. Metabolomics profiles of patients with Wilson disease reveal a distinct metabolic signature. *Metabolomics* 2019, 15, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1505-6>
- [25] Perlich, C.; Provost, F.; Simonoff, J. Tree induction vs. logistic regression: A learning-curve analysis. *J. Mach. Learn. Res.* 2004, 4, 211–255. <https://www.jmlr.org/papers/volume4/perlich03a/perlich03a.pdf>
- [26] Quinlan, J.R. Induction of decision trees. In *Machine Learning*; Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, USA, 1986; pp. 81–106. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00116251.pdf>
- [27] Shannon, C.E. The mathematical theory of communication. *1963. MD Comput.* 1997, 14, 306–317. PMID: 9230594.
- [28] Giulivi, C.; Zhang, Y.-F.; Omanska-Klusek, A.; Ross-Inta, C.; Wong, S.; Hertz-Picciotto, I.; Tassone, F.; Pessah, I.N. Mitochondrial

dysfunction in autism. *JAMA* 2010, 304, 2389–2396.

<https://doi.org/10.1001/jama.2010.1706>

[29] Liang, L.-P.; Patel, M. Plasma cysteine/cystine redox couple disruption in animal models of temporal lobe epilepsy. *Redox Biol.* 2016, 9, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.05.004>

[30] Zhou, Z.; Jia, R.-X.; Zhang, G.; Wan, Y.; Zhang, Y.; Fan, Y.; Wang, Z.; Huang, P.; Wang, F. Using cysteine/cystine to overcome oxidative stress in goat oocytes and embryos cultured in vitro. *Mol. Med. Rep.* 2016, 14, 1219–1226. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5395>

[31] Fischer, J.E.; Rosen, H.M.; Ebeid, A.M.; James, J.H.; Keane, J.M.; Soeters, P.B. The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery* 1976, 80, 77–91. PMID: 818729.

[32] Medici, V.; Kieffer, D.A.; Shibata, N.M.; Chima, H.; Kim, K.; Canovas, A.; Medrano, J.F.; Islas-Trejo, A.D.; Kharbanda, K.K.; Olson, K.; et al. Wilson Disease: Epigenetic effects of choline supplementation on phenotype and clinical course in a mouse model. *Epigenetics* 2016, 11, 804–818. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1231289>

[33] Chong, J.; Wishart, D.S.; Xia, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data and analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2019, 68, e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>

[34] Nazer, H.; Ede, R.J.; Mowat, A.P.; Williams, R. Wilson's disease: Clinical presentation and use of prognostic index. *Gut* 1986, 27, 1377–1381. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.27.11.1377>

[35] Francioso, A.; Conrado, A.B.; Mosca, L.; Fontana, M. Chemistry and Biochemistry of Sulfur Natural Compounds: Key Intermediates of Metabolism and Redox Biology. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8294158>

[36] Piussan, C.; Mathieu, M. Teratogenic risk during treatment of Wilson disease. *J. Genet. Hum.* 1985, 33, 357–362. PMID: 4056754.

[37] Lheureux, P.; Penalzoza, A.; Gris, M. Pyridoxine in clinical toxicology: A review. *Eur. J. Emerg. Med.* 2005, 12, 78–85.

[38] Ortiz, J.F.; Cox, M.; Tambo, W.; Eskander, N.; Wirth, M.; Valdez, M.; Niño, M. Neurological Manifestations of Wilson's Disease: Pathophysiology and Localization of Each Component. *Cureus* 2020, 12. <https://doi.org/10.7759/cureus.11509>

[39] Packman, S. Wilson's Disease. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences*; Aminoff, M.J., Daroff, R.B., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 2003; pp. 759–763.

[40] Metsalu, T.; Vilo, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, W566–W570. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>

[41] Lough, J.; Wiglesworth, F.W. Wilson disease. Comparative ultrastructure in a sibship of nine. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1976, 100, 653–659. PMID: 1036679.

[42] Suzuki, K.; Ogura, Y. Biological regulation of copper and selective removal of copper: Therapy for Wilson disease and its molecular mechanism. *Yakugaku Zasshi* 2000, 120, 899–908. https://doi.org/10.1248/yakushii947.120.10_899

[43] Hou, G.-Q.; Liang, X.-L.; Chen, R.; Tang, L.; Wang, Y.; Xu, P.-Y.; Zhang, Y.-R.; Ou, C.-H. Copper transportation of WD protein in hepatocytes from Wilson disease patients in vitro. *World, J. Gastroenterol.* 2001, 7, 846–851. <https://doi.org/10.3748/wjg.v7.i6.846>

[44] Siordia-Reyes, A.G.; Ferman-Cano, F.; García, G.R.; Rodríguez-Velasco, A. Wilson disease. Report of a case of autopsy with copper tissue quantification and electronic microscopy. *Rev. Gastroenterol Mex* 2001, 66, 38–41. PMID: 11464628. <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-pdf-X0375090601253030>

[45] Davie, C.; Schapira, A. Wilson disease. *Int. Rev. Neurobiol.* 2002, 53, 175–190. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(02\)53007-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(02)53007-5)

[46] Shimizu, N. Wilson disease. *Nihon Rinsho* 2002, 60 (Suppl. 4), 433–436. (In Japanese). PMID: 12013905.

[47] Page, R.A.; Davie, C.A.; MacManus, D.; Miskiel, K.A.; Walshe, J.M.; Miller, D.H.; Lees, A.J.; Schapira, A. Clinical correlation of brain MRI and MRS abnormalities in patients with Wilson disease. *Neurology* 2004, 63, 638–643. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000134793.50831.C1>

[48] Roberts, E.A.; Robinson, B.H.; Yang, S. Mitochondrial structure and function in the untreated Jackson toxic milk (tx-j) mouse, a model for Wilson disease. *Mol. Genet. Metab.* 2008, 93, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.08.127>

[49] Lee, B.H.; Kim, J.-M.; Heo, S.H.; Mun, J.H.; Kim, J.; Kim, J.H.; Jin, H.Y.; Kim, G.-H.; Choi, J.-H.; Yoo, H.-W. Proteomic analysis of the hepatic tissue of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats according to the natural course of Wilson disease. *Proteomics* 2011, 11, 3698–3705. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100122>

[50] Sauer, S.W.; Merle, U.; Opp, S.; Haas, D.; Hoffmann, G.F.; Stremmel, W.; Okun, J.G. Severe dysfunction of respiratory chain and cholesterol metabolism in *Atp7b*^{-/-} mice as a model for Wilson disease. *Biochim. et Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 2011, 1812, 1607–1615. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.08.011>

[51] Zischka, H.; Lichtmanegger, J.; Schmitt, S.; Jagemann, N.; Schulz, S.; Wartini, D.; Jennen, L.; Rust, C.; Larochette, N.; Galluzzi, L.; et al. Liver mitochondrial membrane crosslinking and destruction in a rat model of Wilson disease. *J. Clin. Investig.* 2011, 121, 1508–1518. <https://doi.org/10.1172/JCI45401>

[52] Lichtmanegger, J.; Leitzinger, C.; Wimmer, R.; Schmitt, S.; Schulz, S.; Kabiri, Y.; Eberhagen, C.; Rieder, T.; Janik, D.; Neff, F.; et al. Methanobactin reverses acute liver failure in a rat model of Wilson disease. *J. Clin. Investig.* 2016, 126, 2721–2735. <https://doi.org/10.1172/JCI85226>

[53] Zischka, H.; Einer, C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2018, 102, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.07.001>

[54] Einer, C.; Leitzinger, C.; Lichtmanegger, J.; Eberhagen, C.; Rieder, T.; Borchard, S.; Wimmer, R.; Denk, G.; Popper, B.; Neff, F.; et al. A high-calorie diet aggravates mitochondrial dysfunction and triggers severe liver damage in Wilson disease rats. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 7, 571–596. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.12.005>

[55] Polishchuk, E.V.; Merolla, A.; Lichtmanegger, J.; Romano, A.; Indrieri, A.; Ilyechova, E.Y.; Concilli, M.; De Cegli, R.; Crispino, R.; Mariniello, M.; et al. Activation of autophagy observed in liver tissues from patients with Wilson disease and from ATP7B-deficient animals, protects hepatocytes from copper-induced apoptosis. *Gastroenterology* 2019, 156, 1173–1189.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.11.032>

[56] To, U.; Schilsky, M.L. A Case for Not Going Global: “Americanization” of diet accelerates hepatic mitochondrial injury in a model of Wilson disease. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 7, 684–685. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.01.001>

[57] Zhang, J.; Tang, L.-L.; Li, L.-Y.; Cui, S.-W.; Jin, S.; Chen, H.-

Z.; Yang, W.-M.; Xie, D.-J.; Yu, G.-R. Gandouling tablets inhibit excessive mitophagy in toxic milk (TX) model mouse of Wilson disease via Pink1/Parkin pathway. Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2020, 2020, 1–11.

<https://doi.org/10.1155/2020/3183714>

[58] Agarwal, M.; Saba, L.; Gupta, S.K.; Johri, A.M.; Khanna, N.N.; Mavrogeni, S.; Laird, J.R.; Pareek, G.; Miner, M.; Sfikakis, P.P.; et al. Wilson disease tissue classification and characterization using seven artificial intelligence models embedded with 3D optimization paradigm on a weak training brain magnetic resonance imaging datasets: A supercomputer application. Med. Biol. Eng. Comput. 2021, 59, 511–533. <https://doi.org/10.1007/s11517-021-02322-0>

[59] Record, C.O.; Buxton, B.; Chase, R.A.; Curzon, G.; Murray-Lyon, I.M.; Williams, R. Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. Eur J. Clin. Investig. 1976, 6, 387–394.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1976.tb00533.x>

[60] Fabbri, A.; Magrini, N.; Bianchi, G.; Zoli, M.; Marchesini, G. Overview of randomized clinical trials of oral branched-chain amino acid treatment in chronic hepatic encephalopathy. J. Parenter. Enter. Nutr. 1996, 20, 159–164.

<https://doi.org/10.1177/0148607196020002159>

[61] Reilly, J.; Mehta, R.; Teperman, L.; Cemaj, S.; Tzakis, A.; Yanaga, K.; Ritter, P.; Rezak, A.; Makowka, L. Nutritional support after liver transplantation: A randomized prospective study. J. Parenter. Enter. Nutr. 1990, 14, 386–391.

<https://doi.org/10.1177/0148607190014004386>

[62] Amodio, P.; Canesso, F.; Montagnese, S. Dietary management of hepatic encephalopathy revisited. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 2014, 17, 448–452.

<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000084>

[63] Gluud, L.L.; Dam, G.; Borre, M.; Les, I.; Cordoba, J.; Marchesini, G.; Aagaard, N.K.; Risum, N.; Vilstrup, H. Oral branched-chain amino acids have a beneficial effect on manifestations of hepatic encephalopathy in a systematic review with meta-analyses of randomized controlled trials. J. Nutr. 2013, 143, 1263–1268.

<https://doi.org/10.3945/jn.113.174375>

[64] Park, J.G.; Tak, W.Y.; Park, S.Y.; Kweon, Y.O.; Chung, W.J.; Jang, B.K.; Bae, S.H.; Lee, H.J.; Jang, J.Y.; Suk, K.T.; et al. Effects of Branched-Chain Amino Acid (BCAA) Supplementation on the progression of advanced liver disease: A Korean nationwide, multicenter, prospective, observational, cohort study. Nutrients 2020, 12, 1429. <https://doi.org/10.3390/nu12051429>

[65] Vidot, H.; Cvejic, E.; Finegan, L.J.; Shores, E.A.; Bowen, D.G.; Strasser, S.I.; McCaughan, G.W.; Carey, S.; Allman-Farinelli, M.; Shackel, N.A. Supplementation with synbiotics and/or branched chain amino acids in hepatic encephalopathy: A pilot randomised placebo-controlled clinical study. Nutrients 2019, 11, 1810.

<https://doi.org/10.3390/nu11081810>