

CIENCIAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS
ARTÍCULO ORIGINAL**Estudio molecular del exón 3 del gen *atp7b* en pacientes cubanos con Enfermedad de Wilson****Molecular genetic analysis of exon 3 of the *ATP7B* gene in Cuban patients with Wilson's disease**

Yulia Clark Feoktistova^{1*}, Caridad Ruenes Domech², Elsa F. García Bacallao², Hilda Roblejo Balbuena³, Teresa Collazo Mesa³, Iliana Clark Feoktistova¹, Estela Morales Peralta⁴

¹Universidad de Guantánamo. Guantánamo, Cuba.

²Instituto Nacional de Gastroenterología. La Habana, Cuba.

³Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

⁴Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Facultad de Ciencias Médicas "10 de Octubre". La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: feoktistova@cug.co.cu

Cómo citar este artículo

Clark Feoktistova Y, Ruenes Domech C, García Bacallao EF, Roblejo Balbuena H, Collazo Mesa T, Clark Feoktistova I, Morales Peralta E. Estudio molecular del exón 3 del gen *atp7b* en pacientes cubanos con Enfermedad de Wilson. Rev haban cienc méd [Internet]. 2018 [citado];17(3):440-450. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2112>

Recibido: 28 de agosto de 2017.

Aprobado: 01 de abril de 2018.

RESUMEN

Introducción: La Enfermedad de Wilson es una enfermedad con patrón de herencia autosómico recesivo. Es causada por las mutaciones en el gen *atp7b*. El exón 3 del gen *atp7b* es polimórfico y se informan más de 120 polimorfismos en el gen *atp7b*.

Objetivo: Identificar los cambios conformacionales en el exón 3 del gen *atp7b* y detectar polimorfismos en pacientes cubanos

con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson.

Material y Método. Se realizó un estudio descriptivo, en el Centro Nacional de Genética Médica y en el Instituto Nacional de Gastroenterología, durante el período 2007-2013, que incluyó 105 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson. La extracción del ADN fue por la técnica de

precipitación salina. Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación del fragmento de interés, y para detectar los cambios conformacionales y la presencia del polimorfismo p.L456V, se usó la técnica de Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena, en el exón 3 del gen *atp7b*.

Resultados: En el exón 3 se detectan los cambios conformacionales denominados b y c que correspondieron al polimorfismo p.L456V en estado heterocigótico y homocigótico respectivamente. La frecuencia alélica del polimorfismo p.L456V es de 41 %. Las

manifestaciones más frecuentes en los pacientes que presentaron este polimorfismo son las hepáticas.

Conclusiones: Se identificó el polimorfismo p.L456V en 64 pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson, lo cual posibilitará hacer estudios moleculares por métodos indirectos.

Palabras claves: Enfermedad de Wilson, exón 3, SSCP, técnica de precipitación salina, técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ABSTRACT

Introduction: Wilson's disease is a rare inherited autosomal recessive disorder caused by mutations in the ATP7B gene. The exon 3 of the ATP7B gene is polymorphic, and more than 120 polymorphisms of this type have been reported in the literature.

Objective: To identify conformational band shifts in exon 3 and detect polymorphisms of the ATP7B gene in Cuban patients, clinically diagnosed with Wilson's disease.

Material and Methods: A descriptive study including 105 patients with the clinical diagnosis of Wilson's disease was conducted at the National Center for Medical Genetics and the National Institute of Gastroenterology from 2007 to 2013. Salting-out protocol was used for DNA extraction. The Polymerase Chain Reaction was used to amplify the fragment of interest and the Single-Strand Conformational Polymorphism was

applied in the region of exon 3 of the ATP7B gene to identify conformational changes and the presence of the polymorphism p.L456V.

Results: The conformational change called B and C corresponded to the p.L456V polymorphism in the heterozygous and homozygous states, respectively. The allelic frequency of the p.L456V polymorphism in 105 Cuban patients clinically diagnosed with Wilson's disease was 41 %. The most common manifestations in patients with this polymorphism were related to the liver.

Conclusions: The p.L456V polymorphism was identified in 64 Cuban patients with Wilson disease, which will enable us to conduct molecular studies by indirect methods.

Keywords: Wilson disease, polymorphism, exon 3, SSCP, Polymerase Chain Reaction, salting-out.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Wilson (EW, MIM 277900) presenta un patrón de herencia autosómico recesivo. Constituye un problema de salud mundial. Se caracteriza por la acumulación de cobre, en diferentes órganos, tales como, hígado, cerebro, córnea, entre otros, como consecuencia del transporte defectuoso de cobre en la célula. Existen diversas manifestaciones clínicas asociadas a la EW y el diagnóstico clínico de esta enfermedad es complejo.¹ Se caracteriza por daños en el hígado, que pueden ser muy variables, desde la elevación de los niveles séricos de transaminasas hasta hepatitis fulminante, cirrosis hepática. Los pacientes con EW también pueden presentar afectaciones en el cerebro, que se manifiestan como temblores, distonía; también trastornos psiquiátricos, tales como, depresión, problemas en el lenguaje, tendencias suicidas, entre otras.

La causa molecular que la provoca la EW son las mutaciones en el gen *atp7b*, el cual presenta 20 intrones y 21 exones que codifican para la proteína ATP7B, transportadora de cobre en el hepatocito. Se han identificado más de 130 polimorfismos que se distribuyen en todo el gen *atp7b* y en los intrones. Los exones más polimórficos son: 2, 3, 8 y 16.²

El polimorfismo p.L456V se localiza en el exón 3 del gen *atp7b*. Este se ha identificado en disímiles poblaciones, en países como China, Rusia, Egipto y Venezuela.^{3,4,5,6} Este polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) se utiliza en la construcción de los haplotipos en familias donde haya al menos un paciente con diagnóstico clínico certero de la EW y posibilita la realización del diagnóstico molecular en los mismos.⁶

Para la determinación del espectro de polimorfismos en el gen *atp7b*, se requiere una apropiada tecnología de cribaje. Una de las técnicas más utilizadas para este propósito es el Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena (SSCP). Se basa en la relación que existe entre la movilidad electroforética de la simple cadena de ADN y su estructura tridimensional. Un cambio en la secuencia nucleotídica de la cadena de ADN provoca un cambio conformacional, que a su vez, induce a un cambio de movilidad en la electroforesis detectable por esta técnica. Con la utilización de la técnica de SSCP permite identificar en las muestras de ADN cambios conformacionales diferentes a la variante normal que pueden corresponder a polimorfismos o mutaciones.⁷

OBJETIVO

Identificar los cambios conformacionales en el exón 3 y detectar polimorfismos en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la EW.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, en el Centro Nacional de Genética Médica, durante el período 2007-2013, que incluyó 105 pacientes (43 mujeres y 62 hombres) con diagnóstico clínico de

EW, los cuales asistían a las consultas en el Instituto Nacional de Gastroenterología. Estos pacientes dieron su consentimiento para participar en la investigación, de acuerdo con los

principios éticos de la Declaración de Helsinki. Esta investigación fue aprobada por el Consejo Científico y el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica y el Instituto Nacional de Gastroenterología.

Los casos se seleccionaron por los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: Individuos que se diagnosticaron con EW, según Ferenci y col, 20038 y que estos brindaran su disposición de participar en esta investigación, lo cual se evidencia a través de la firma del consentimiento informado.

Criterios de exclusión: Pacientes con EW que no estuvieran de acuerdo con participar en este estudio.

Criterio de salida: Quienes manifestaran su deseo de retirar su participación en la investigación, cualquiera que fuera el momento, aún después de haber dado su autorización previa.

Las variables analizadas fueron: frecuencia alélica del polimorfismo p.L456V, cambio conformacional a) para la variante normal, cambio conformacional b) para la presencia del polimorfismo p.L456V en estado heterocigótico y el cambio conformacional c) en estado homocigótico. Las manifestaciones clínicas fueron clasificadas en: hepáticas, neurológicas, psiquiátricas y sus combinaciones.

La evaluación de las manifestaciones clínicas fue realizada por un equipo multidisciplinario (gastroenterólogos, genetistas, neurólogos y bioquímicos, psiquiatras), se siguieron los criterios establecidos de diagnóstico de la enfermedad.

Se seleccionó el exón 3 del gen *atp7b*, para la detección de cambios conformacionales y la identificación de polimorfismos. A todos los

pacientes se les tomó una muestra de sangre y se extrajo el ADN mediante el método de precipitación salina⁹ a partir de 10 mL de sangre periférica con ácido etildiaminotetraacético, EDTA, (56 mg/mL). Las condiciones para la amplificación del exón 3 mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), las condiciones fueron: 100ng de ADN, 10(F) 5'-AGT CGC CAT GTA AGT GAT AA-3' y (R) 5'-CTG AGG GAA CAT GAA ACA A-3', 1mM de dNTPs (Boehringer), 10X tampón PCR, 15mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerasa (Ampligen), en un volumen de 25 µL.

Posteriormente se realizó la electroforesis SSCP. Se mezcló 3,5 µL con una solución de parada de Bromofenol azul (0,05% BFA, 10mM NaOH, 95% formamida, 20 mM EDTA) y 1 µL del producto amplificado, en un volumen final de 7µL. Se aplicó en un gel de acrilamida comercial (GeneGel Excel 12,5/24 Kit). La visualización del ADN se realizó por el método de tinción con plata, siguiendo las instrucciones del juego comercial: kit PlusOne DNA Silver Staining (Amersham Biosciences, 2007).

El polimorfismo p.L456V fue determinado por comparación de las corridas electroforéticas mediante la técnica de SSCP de controles positivos heterocigóticos y homocigóticos del polimorfismo p.L456V con el producto amplificado obtenido de la técnica de PCR del exón 3 del gen *atp7b*.

Los controles positivos fueron las muestras de ADN de los pacientes heterocigóticos y los homocigóticos para el polimorfismo p.L456V que se donaron por investigadores de los laboratorios Ospedale Regionale per le Microcitemie, Cagliari, en Italia y el Hospital Universitario de Munster, en Alemania.

Se calculó la media y desviación estándar de la edad de los pacientes en años. Se determinó la frecuencia del polimorfismo p.L456V como:

Número de alelos que presenta el polimorfismo p.L456V/Número de alelos totales. Se expresó en porcentaje.

RESULTADOS

Los pacientes que presentaron el polimorfismo p.L456V, la edad fueron de 31,6 años con una desviación estándar de 14 años. El intervalo fue de 11 años (mínimo) a 58 años (máximo).

Los pacientes estudiados que mostraron el polimorfismo p.L456V estaban distribuidos en 10 provincias y el municipio especial Isla de la Juventud. (Tabla).

Tabla. Representación por provincias y en el municipio especial de los pacientes con la EW

Provincias	Pacientes
Pinar del Río	12
Isla de la Juventud	7
La Habana	27
Mayabeque	5
Matanzas	2
Cienfuegos	1
Villa Clara	2
Santi Spíritus	2
Camagüey	1
Santiago de Cuba	3
Guantánamo	2

Se identificó los cambios conformacionales denominados b y c con el uso de la técnica SSCP. (Figura 1). El cambio conformacional denominado a correspondió a la variante normal.

El cambio conformacional b y c correspondieron a la presencia del polimorfismo p.L456V estado heterocigótico y homocigótico respectivamente.

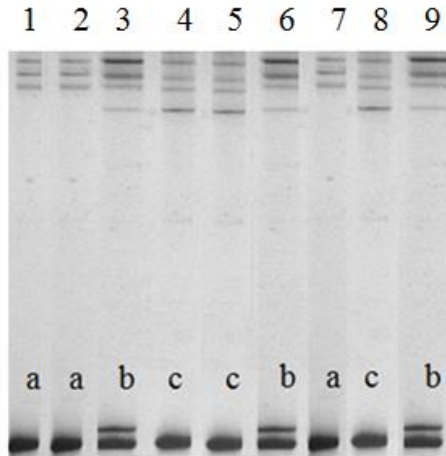


Figura 1- SSCP del exón 3 del gen *atp7b* en pacientes y controles positivos que presentan el polimorfismo p.L456V. Los cambios conformacionales se denominaron a) carrilera 2, variante normal, control negativo; b) carrilera 6 y 9; c) carrilera 5 y 8. Carrilera 1: control negativo, cambio conformacional a. Carrilera 3: control positivo heterocigótico para el polimorfismo p.L456V. Carrilera 4: control positivo homocigótico para el polimorfismo p.L456V.

Se detectaron 42 pacientes (40%) que presentaron el cambio conformacional b, 22 pacientes (21%) con el cambio conformacional c y 41 pacientes (39%) con el cambio conformacional a. La presencia del polimorfismo p.L456V es en un total de 64 pacientes. (Figura 2).

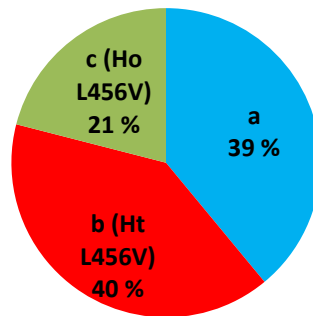


Fig. 2. Frecuencia de los cambios conformacionales del exón 3 y el porcentaje. Los cambios conformacionales denominados **b** y **c** fueron pacientes heterocigóticos y homocigóticos para el polimorfismo p.L456V respectivamente.

De los 105 pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la EW, se identificaron 42 pacientes heterocigóticos y 22 homocigóticos para el polimorfismo p.L456V por la técnica SSCP. La frecuencia alélica del polimorfismo p.L456V en

pacientes cubanos estudiados en esta investigación fue de 41%. El polimorfismo p.L456V es consecuencia del cambio de Guanina por Citocina que provoca un cambio del aminoácido Leucina por Valina en la

posición 456 de la proteína ATP7B. Este polimorfismo se localiza entre el dominio de unión al cobre 4 y 5. El cambio provocado por esta variante polimórfica no afecta la función de la proteína transportadora de cobre, ATP7B, en humanos y se identifica en diversas poblaciones con una frecuencia mayor que 1%.³⁻⁵

Entre las principales manifestaciones clínicas en los pacientes que presentaron el polimorfismo p.L456V, fueron más frecuentes las hepáticas (78%), a continuación de las manifestaciones mixtas: hepáticas y neurológicas (11%), las

DISCUSIÓN

La edad de los pacientes con el polimorfismo p.L456V es similar a lo que se informa en la literatura internacional.¹

En la distribución por provincias de los pacientes con el polimorfismo p.L456V se observó que el mayor número de pacientes era de La Habana y Pinar de Río. La mayoría de los pacientes con este polimorfismo se concentró en la región occidental del país.

Se han informado más de 130 polimorfismos en el gen *atp7b* en pacientes con la EW. La frecuencia del polimorfismo p.L456V obtenida en este estudio es similar a lo que se informa en China,¹⁰ y como se esperaba, es mayor que 1%. En estudios posteriores se analizará el impacto de este polimorfismo en los pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la EW. La frecuencia de este polimorfismo es muy baja en la India 1,8%,¹¹ el cual se comporta como una variante rara y es diferente a lo que se informó en diversas poblaciones estudiadas.^{3,4,5,6} Si se analiza el polimorfismo p.L456V con programas bioinformáticos como el SIFT y el Polyphen-2

neurológicas (9 %) y las mixtas neurológicas y psiquiátricas (2%).

Se identificó en cuatro pacientes con el polimorfismo p.L456V la presencia de los anillos de Kayser-Fleischer, lo que representa 6,3% de los pacientes que se estudiaron, el mismo constituye un criterio de diagnóstico clínico de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas de los mismos eran dos pacientes con manifestaciones hepáticas y neurológicas, un paciente con manifestaciones neurológicas y un paciente con manifestaciones neurológicas y psiquiátricas.

predicen que es tolerable y benigna respectivamente.⁴

El polimorfismo p.L456V se halló en América,⁶ en Asia,^{3,10,11,12} en Europa¹³ y en África no se ha estudiado. Una posible explicación de su presencia en la población cubana es por el origen étnico, pues 72% de genes son de origen caucásico.¹⁴ En diferentes países se determina el polimorfismo p.L456V, aunque no informan las frecuencias^{6,15,16,17} por lo que no se pueden comparar los resultados con esta investigación y en algunos casos, no construyen los haplotipos con el uso de los diferentes marcadores moleculares y se desaprovecha la oportunidad de ampliar el diagnóstico molecular. En Turquía el polimorfismo p.L456V no se detectó; sin embargo, en el mismo exón 3, se informó el polimorfismo p.V446L.¹⁸

Para el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas que posean uno o más genes que contienen un número elevado de exones, es necesaria una tecnología de avanzada para lograr el éxito del mismo. Existen diversos estudios moleculares en pacientes, tanto en edad

pediátrica como en adultos, con la EW.^{19,20} Sin embargo, siempre el médico que atiende al paciente con sospecha de la EW debe hacer un minucioso diagnóstico clínico.²¹

Aun cuando se determinan nuevas mutaciones en el gen *atp7b*,^{22,23,24} se realizan técnicas de microarrays²⁵ y se utiliza la secuencia de última generación;²⁶ es necesario, en países en vías de desarrollo que estudien enfermedades genéticas, por Biología Molecular, que se incorpore la búsqueda de los polimorfismos, para ofrecer el servicio de diagnóstico molecular por métodos indirectos.

En Cuba se trabaja en el establecimiento de la estrategia para el diagnóstico molecular de la EW. Se tiene experiencia en la identificación de polimorfismos en el exón 10,²⁷ en el intrón 9²⁸ y en el exón 13.^{29,30} Con los polimorfismos que se

detectaron y el p.L456V en los pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la EW permitirá la construcción de los haplotipos en las familias cubanas donde haya un individuo con diagnóstico clínico de la enfermedad y permitirá la realización del diagnóstico molecular por métodos indirectos.

Esta investigación tiene limitaciones que expliquen algunas de las diferencias observadas con otros estudios. Una de ellas es el tamaño de muestra que aunque en ese estudio el número de pacientes es considerable en países como Irán¹² fue pequeña y la población de referencia no es la misma, ni tan siquiera similar a estudios que se replican. Además, existen diferencias étnicas entre las poblaciones, donde se identificó asociación de estos polimorfismos, con respecto a la cubana, debido a la constitución genética.

CONCLUSIONES

Con la utilización de la técnica de SSCP es posible la identificación del polimorfismo p.L456V. Se dispone de una herramienta molecular para la

introducción del diagnóstico molecular en pacientes con la EW en Cuba.

RECOMENDACIONES

El presente estudio constituye un primer intento de caracterización de los estudiantes de Enfermería en UNIKIVI de Uíge; se recomienda investigar otros aspectos como los socioeconómicos, que puedan incidir en la

eficiencia del proceso docente-educativo para elaborar nuevas estrategias con la finalidad de alcanzar el máximo de rendimiento académico, elevar la calidad y pertinencia de los resultados en la universidad.

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes por participar en esta investigación; a Lídice Reyes por realizar la extracción de ADN; al Ministerio de Salud Pública;

al Dr. Carlos Maragoto por sus aportes; al Dr.C. Georgios Loudianos y al Dr.C. Theodor Todorov por el envío de controles positivos..

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Kumar SS, Kurian G, Eapen CE, Roberts EA. Genetics of Wilson's disease: a clinical perspective. *Indian J Gastroenterol*. [Internet]. 2012.Dec [citado: 5/02/2016];31(6):285-93. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941676>
- 2-Kenney SM, Cox DW. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat*. [Internet]. 2007.Dec [citado: 20/11/2009]; 28(12): 1171-77. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17680703>
- 3- Hua R, Hua F, Jiao Y, Pan , Yang X, Peng S, et al. Mutational analysis of ATP7B in Chinese Wilson disease patients. *Am J Transl Res*[Internet]. 2016.Jun [citado: 20/11/2017];8(6):2851-2861.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27398169>
- 4- Kudryavtsev A, Gornostaeva E , Voevoda M , Maximov V , Kovalenko S. The frequency of mutations in the ATP7B gene in Russia. *Meta Gene*[Internet]. 2017 [citado: 12/03/2018];13:173-176.Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/318241717> [The frequency of mutations in the ATP7B gene in Russia](https://www.researchgate.net/publication/318241717)
- 5- Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, Bochow B, Buttner J, Schmidt H. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *J Hum Genet*[Internet]. 2008.May [citado: 12/10/2014];53(8):681-687. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483695>
- 6- 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* [Internet]. 2015.Feb [citado:23/11/2016];58(2):59-65.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497208>
- 7- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci*[Internet]. 1989.Apr[citado: 22/10/2007]; 86(8):2766-70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2565038>
- 8- Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* [Internet]. 2003.Jun[citado: 22/05/2007];23(3):139-142.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12955875>
- 9- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *J Nucleic Acids Res*[Internet]. 1988.Feb[citado: 20/05/2006];16(3):1215.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334765>
- 10- Wu Zhi-Y, Wang Ning, Lin Min-T, Fang L, Murong SX, Yu L. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in Chinese patients with Wilson disease. *Arch Neurol*[Internet]. 2001.Jun [citado: 8/11/2012];58(6):971-976.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11405812>
- 11- Gupta A, Maulik M, Poonam N, Chattopadhyay I, Das Shyamal K, Gangopadhyay K. Molecular diagnosis of Wilson disease using prevalent mutations and informative single-nucleotide polymorphism markers. *Clin Chem* [Internet]. 2007.Sep [citado: 18/04/2010];53(9):1601-1608.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634212>
- 12- Zali N, Mohebbi S, Esteghamat S, Chiani M and Haghighi M. Prevalence of ATP7B gene mutations in Iranian patients with Wilson disease. *Hepat Mon* [Internet]. 2011.Nov[citado: 16/05/2015];11(11):890-894.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308153>
- 13- Caca K, Ferenci P, Kühn H.-J, Polli C, Willgerodt H, Kunath B, et al. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *J*

- Hepatol [Internet]. 2001.Nov[citado: 5/11/2007];35(5): 575-81. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11690702>
- 14- Marcheco-Teruel B, Parra EJ, Fuentes-Smith E, Salas A, Buttenschøn HN, Demontis D, et al. Cuba: exploring the history of admixture and the genetic basis of pigmentation using autosomal and uniparental markers. PLoS Genet[Internet]. 2014. Jul[citado: 4/11/2016];10(7):e1004488. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058410>
- 15- Tomic A, Dobripiü V, Novakovü I, Svetel M, Pekmezoviü T, Kresojeviü N.et al. Mutational analysis of ATP7B gene and the genotype-phenotype correlation in patients with Wilson's disease in Serbia. Vojnosanit Pregl. 2013.May[citado: 6/11/2016];70(5):457-462. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789284>
- 16- Abdelghaffar T, Elsayed S, Elsobky E, Shadeed A, Elsobky E, Schmidt H. Phenotype and genetic characterization of a cohort of pediatric Wilson disease patients. BMC Pediatrics [Internet]. 2011[citado: 25/09/2014];11:56.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3132721/>
- 17- Ljubić H, Kalauz M, Telarović S, Ferenci P, Ostojić R, Noli MC, et al. ATP7B gene mutations in Croatians patients with Wilson Disease. Genetic Test Mol Biomarkers[Internet]. 2016.Mar[citado: 10/04/2017]; 20(3):112-117. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26799313>
- 18- Simsek O, Asik S and Terzioglu O. Clinical and genetic analysis of pediatric patients with Wilson disease. Turk J Gastroenterol [Internet]. 2015.Sep [citado 20/05/2016];26(5):397-407. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215059>
- 19- Bennett J and Hahn SH. Clinical molecular diagnosis of Wilson disease. Semin Liver Dis 2011.Aug[citado: 20/11/2012];31(3):233-238.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901653>
- 20- Seo J. Diagnosis of Wilson disease in Young children: molecular genetic testing and a paradigm shift from laboratory diagnosis. Pediatric Gastroenterology, Hepatol Nutr[Internet]. 2012.Dec [citado: 20/05/2016];15(4): 197-209.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24010089>
- 21- Hedera P. Update on the clinical management of Wilson's disease. The Appl Clin Genet[Internet]. 2017.Jan[citado: 5/02/2018];10:9-19.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5245916/>
- 22- El-Mougya F, Sharafa S, Elsharkawya M, Mandoura I, El-Essawya R, Eldina A, et al. Gene mutations in Wilson disease in Egyptian children: Report on two novel mutations. Arab J of Gastroenterol[Internet]. 2014.Sep[citado: 8/01/2017];15(3-4):114-118.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25465132>
- 23- 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 of Human Genetics[Internet]. 2012.Sep[citado: 15/01/2014];57(9):564-567.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763723>
- 24-Hussein H and Jabbar A. Mutations analysis in Iraqi patients with Wilson's disease: identification of four novel mutations. Wasit Journal for Science & Medicine [Internet]. 2014[citado: 20/05/2016];7(4):149-158.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10447265>
- 25- Gupta A. Low-density oligonucleotide microarrays-A major step in Wilson's disease diagnosis[Internet]. Indian J Med Res 2015.Feb[citado: 20/05/2016];141(2):145-147. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25900946>
- 26- Poon K, Mei-Ling K, Siew-Chuan, Koay E. Targeted next-generation sequencing of the ATP7B gene for molecular diagnosis of Wilson disease. Clinical Biochemistry [Internet]. 2015[citado: 2/05/2017];4-

10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483271>
- 27- Clark Y, Ruenes C, García E, Collazo T, Robaina Z, Castañeda C et al. Identificación del polimorfismo K832R en pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson [Internet]. Rev Hab de Cien Méd. 2013[citado: 12/03/2015]; 12 (2):197-202. Disponible en: www.bvs.sld.cu/revistas/rhab/vol_12_2_13/rhcm06_213.htm
- 28- Clark Y, Ruenes C, García E, Collazo T, Robaina Z, Roblejo H. Identificación del polimorfismo c.2448-25G>A en pacientes con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson[Internet]. Rev MEDISUR. 2015[citado: 8/01/2017];13(5):617-621. Disponible en: www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2015000500008
- 29- Clark Y, Ruenes C, García E, Collazo T, Roblejo H, Morales E, et al. Study of T991T polymorphism in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease. Biotecnología Aplicada [Internet]. 2016.Jul[citado 8/01/2017]; 33(3): 3221-3224.. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522016000300004
- 30- Clark Y, Ruenes C, García E, Roblejo H, Robaina Z, Morales E. p. K832R and p. T991T polymorphisms' analysis in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease[Internet]. Rev Hab de Cien Méd. 2017[citado: 30/11/2017]; 16 (2): 167-175. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000200004

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.