

CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Universidad de Guantánamo, Cuba
Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), Cuba
Instituto Nacional de Gastroenterología

Análisis de los polimorfismos p. K832R y p. T991T en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson

p. K832R and p. T991T polymorphisms' analysis in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease

Yulia Clark Feoktistova^I, Caridad Ruenes Domech^{II}, Elsa F. García Bacallao^{III}, Hilda Roblejo Balbuena^{IV},
Zoe Robaina Jiménez^V, Estela Morales Peralta^{VI}

^IMáster en Ciencias en Bioquímica. Mención Biología Molecular. Investigador Agregado. Profesor Asistente. Universidad de Guantánamo. yuliacf@cug.co.cu

^{II}Especialista Primer Grado de Medicina General Integral. Especialista Segundo Grado en Gastroenterología. Investigador Agregado. Profesor Auxiliar de la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Instituto Nacional de Gastroenterología. ruenes@infomed.sld.cu

^{III}Especialista Segundo Grado de Gastroenterología. Profesor auxiliar de la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Instituto Nacional de Gastroenterología. egarcia@infomed.sld.cu

^{IV}Especialista Primer Grado en Medicina General Integral y Genética Clínica. Asistente de la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. hilda.robledo@infomed.sld.cu

^VEspecialista Genética Clínica. Centro Nacional de Genética Médica. zrobaina1@infomed.sld.cu

^{VI}Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Doctor en Ciencias Médicas. Facultad de Ciencias Médicas "10 de Octubre". fornaris@infomed.sld.cu

Cómo citar este artículo:

Afonso de León JA, Ilizástigui Pérez F, Mondéjar Rodríguez J. Condiciones histórico-sociales que modelaron el pensamiento pedagógico de Fidel Ilizástigui Dupuy. Revista Habanera de Ciencias Médicas [revista en Internet]. 2017 [consultado];16(2):[168-176]. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1760>

Recibido: 15 de junio de 2016.
Aprobado: 2 de marzo de 2017.

RESUMEN

Introducción: La Enfermedad de Wilson se caracteriza por la acumulación de cobre en hígado, cerebro, riñones y córnea. Se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo. La causa molecular que la provoca son las mutaciones en el gen ATP7B. Se han informado en la literatura más de 139 polimorfismos en el gen ATP7B.

Objetivo: Identificar los cambios conformacionales en los exones 10 y 13 y detectar los polimorfismos p.K832R y p.T991T en el gen ATP7B en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de Enfermedad de Wilson.

Material y Métodos: Se realizó un estudio descriptivo, durante el período 2012 al 2013, que incluyó 27 pacientes con diagnóstico clínico de Enfermedad de Wilson. Para la amplificación del fragmento de interés, se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y para identificar los cambios conformacionales se

aplicó la técnica de Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena, en el exón 10 y 13 del gen ATP7B. La presencia de los polimorfismos p.K832R y p.T991T fueron identificados por secuenciación.

Resultados: Se detectaron tres cambios conformacionales diferentes denominados: (a, b y c) en el exón 10 y (a y b) en el exón 13 del gen ATP7B. La frecuencia alélica de los polimorfismos p. K832R y p.T991T en 27 pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson es 35,2% y 5,6% respectivamente.

Conclusiones: Se analizó por primera vez en Cuba la combinación de los polimorfismos p. K832R y p. T991T que posibilitará hacer estudios moleculares por métodos indirectos.

Palabras claves: Enfermedad de Wilson, polimorfismo p.K832R, p.T991T, SSCP, secuenciación, gen ATP7B.

ABSTRACT

Introduction: Wilson's disease is characterized by accumulation of copper in the liver, brain and cornea. It is transmitted with an autosomal recessive inherited disorder. The molecular causes are mutations in the ATP7B gene. It has been reported in the literature more than 139 polymorphisms of the ATP7B gene.

Objective: Identify the conformational changes in exons 10 and 13 and detect the polymorphisms p.K832R and p.T991T in the ATP7B gene in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease.

Material and Methods: Was performed a descriptive study including 27 patients with

Wilson's disease ranging in the time from 2012 to 2013. Were applied the polymerase chain reaction to amplify the fragment of interest and the Conformation Polymorphism Single-Chain procedures in the exon 10 and 13 of the ATP7B gene. The p. K832R and p. T991T polymorphisms were detected by sequencing this fragment.

Results: Three different conformational changes were identified: (a, b and c) in exon 10 and (a and b) in exon 13 of the ATP7B gene. The allelic frequency of polymorphisms p. K832R and p. T991T in 27 Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease is 35.2% and 5.6%, respectively.

Conclusions: It is the first time in Cuba that a combination of the polymorphisms p. K832R and p. T991T were identified which will allow to make possible molecular studies by indirect methods.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Wilson (EW, MIM 277900)¹ es un trastorno hereditario. El patrón de herencia es autosómico recesivo. Se considera una de las enfermedades raras descritas a nivel internacional. Se caracteriza por la acumulación de cobre fundamentalmente en el hígado, cerebro y cornea. El diagnóstico clínico-genético de esta enfermedad resulta complejo.²

Se caracteriza por daños en el hígado, que puede ser desde la alteración de los niveles séricos de transaminasas hasta una cirrosis descompensada, incluyendo incluso hepatitis fulminante. Los pacientes pueden presentar afectaciones a nivel cerebral; las manifestaciones pueden ser desde temblores, distonía, entre otros. Es una enfermedad genética tratable; sin embargo, puede provocar alteraciones irreversibles que pueden llevar a la muerte de no atenderse de forma adecuada. La causa molecular que la provoca son las mutaciones en el gen ATP7B (MIM 606882), el cual presenta 21 exones y se han reportado más

OBJETIVO

Considerando que en Cuba no existe el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Wilson nos proponemos como objetivo identificar los cambios conformacionales en los exones 10 y 13 y detectar los polimorfismos p.K832R y p.T991T en el gen ATP7B en pacientes

Keywords: Wilson's disease, p. K832R polymorphism, p. T991T polymorphism, SSCP, sequencing, ATP7B gene.

de 500 mutaciones hasta la actualidad.³⁻⁸

Además se han identificado más de 139 polimorfismos que están distribuidos en todo el gen ATP7B y en los intrones, los exones más polimórficos reportados son: 2, 8 y el 16. En los exones 10 y 13 se han identificado varios polimorfismos.⁹

Los polimorfismos p.K832R y p.T991T se encuentran localizados en los exones 10 y 13 del gen ATP7B. Estos polimorfismos se han identificado en diversas poblaciones, en países como en India, Canadá, China, Japón, Reino Unido e Irán.¹⁰⁻¹⁵

Para la determinación del espectro mutacional y la identificación de polimorfismos en el gen ATP7B es necesario una adecuada tecnología de cribaje. Una de las técnicas más utilizadas para este propósito es el Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena, SSCP (del inglés single-strand conformation polymorphism).

cubanos con diagnóstico clínico de esta enfermedad. La identificación del SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido) va a constituir una herramienta molecular para el asesoramiento genético adecuado para el individuo afectado y su familia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo en el Centro Nacional de Genética Médica y el Instituto Nacional de Gastroenterología, durante el período 2012-2013, que incluyó 27 pacientes cubanos (9 mujeres y 18 hombres) con diagnóstico clínico de EW, asistían a la consulta del 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.

Las variables analizadas fueron: frecuencia alélica del polimorfismo p.K832R (cambio conformacional a para la variante normal y cambio conformacional b para la presencia del polimorfismo p.K832R en estado heterocigótico y c para la presencia del polimorfismo p.K832R en estado homocigótico). Otras variables fueron: frecuencia alélica del polimorfismo p.T991T (cambio conformacional a para la variante normal y cambio conformacional b para la presencia del polimorfismo p.T991T en estado heterocigótico) y manifestaciones clínicas (hepáticas, neurológicas y mixtas). La evaluación de las manifestaciones clínicas fue realizada por un equipo multidisciplinario (gastroenterólogos, genetistas, neurólogos, bioquímicos), siguiendo los criterios de diagnóstico de la enfermedad.

Se seleccionaron los exones 10 y 13 del gen ATP7B para la detección de cambios conformacionales y la identificación de los polimorfismos p.K832R y T991T. A todos los pacientes se les tomó una muestra de sangre y se extrajo el ADN, mediante el método de precipitación salina¹⁶ a partir de 10 ml de sangre periférica con ácido etildiaminotetraacético (EDTA, del inglés Ethylene Diamine Tetra Acetic

Acid) (56 mg/ml).

Las condiciones para la amplificación de los exones 10 y 13 mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) fueron: 100ng de ADN, 10 pmoles/ μ L de cada oligonucleótido del exón10: (E10R: 5' CAGCTGGCCTAGAACCTGA 3', E10L: 5' TATCCTCCT GAGGGAACATG 3') Y EL EXÓN 13: (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 (Amplicen), en un volumen de 25 μ L.¹⁷

Posteriormente se realizó la electroforesis SSCP. Se mezcló 3,5 μ L con una solución de parada de bromofenol azul (0,05 % BFA, 10mM NaOH, 95% formamida, 20mM EDTA) y 1 μ L del producto amplificado, en un volumen final de 7 μ L. 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 Plus One DNA Silver Staining (Amersham Biosciences, 2007).

Se procedió a la secuenciación del patrón alterado por SSCP. El secuenciador utilizado fue ALF-Express II (Amersham Pharmacia Biotech). Un paso crítico y decisivo fue la purificación del producto de PCR, el cual se realizó con el juego comercial de la Qiagen (QIAquick, PCR Purification Kit). Los resultados fueron analizados mediante el programa informático del equipo y comparados con la secuencia de ADN de referencia del gen ATP7B (GenBank: NM000053), el codón de iniciación fue ATG.

RESULTADOS

La edad de inicio de la enfermedad de los 27 pacientes analizados fue de 25,4 años \pm 3,1 y la edad de los pacientes que contienen los polimorfismos p.K832R y p.T991T fue de 24,3 años \pm 2,6.

Se identificaron tres cambios conformacionales denominados: a, b y c en el exón 10 y dos cambios en el exón 13, con el uso de la técnica SSCP. El cambio conformacional a correspondió a la variante normal en los dos exones estudiados. Las muestras que presentaron el cambio conformacional b y c se secuenciaron. Se obtuvo como resultado la identificación del polimorfismo p.K832R en estado heterocigótico y homocigótico el exón 10 y p.T991T en estado heterocigótico en el exón 13. Se identificaron cinco homocigóticos y nueve heterocigóticos en el exón 10 para el polimorfismo p.K832R. Se detectaron tres pacientes heterocigóticos para el polimorfismo p.T991T. Se identificó este polimorfismo p.K832R y p.T991T en 51,9% y 11,1 de los pacientes cubanos analizados respectivamente.

Los 18 pacientes que presentaron los polimorfismos p.K832R y p.T991T provienen de las provincias: Pinar de Río (6), La Habana (4), Matanzas (3), Camagüey (2), Santi Spiritus (1),

Ciego de Ávila (1) y Guantánamo (1).

El polimorfismo p.K832R es consecuencia de un cambio de adenina por guanina, lo cual provoca el cambio del aminoácido lisina por arginina en la posición 832 de la proteína ATP7B en el cuarto segmento de transmembrana.

El polimorfismo p.T991T es consecuencia de un cambio de citosina por guanina, lo cual no provoca el cambio del aminoácido treonina en la posición 991 de la proteína ATP7B en el sexto segmento de transmembrana.

Estos polimorfismos no afectan la función de la proteína y se ha identificado en diversas poblaciones con una frecuencia mayor que 1%.

La frecuencia alélica en los 27 pacientes cubanos estudiados de los polimorfismos p.K832R y p.T991T es de 35,2% y 5,6% respectivamente. (Tabla1).

En esta investigación se analizaron las manifestaciones clínicas de los pacientes que presentaron los polimorfismos p.K832R y p.T991T, las cuales se agruparon en diferentes grupos: hepáticas, neurológicas, mixtas y asintomáticas; estas son las manifestaciones más frecuentes informadas en la literatura internacional en los pacientes con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson. (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Se han informado en la literatura internacional más de 139 polimorfismos en el gen ATP7B en pacientes con la Enfermedad de Wilson.³

La edad de inicio de la enfermedad de los 27 pacientes estudiados es similar a la edad de inicio de los pacientes donde se identificaron los polimorfismos p.K832R y p.T991T. Por tanto, la presencia de los polimorfismos estudiados no

influye en la edad de inicio de la enfermedad. Las provincias más representadas fueron Pinar de Río y La Habana.

En Cuba, se comienza a realizar la detección de polimorfismos en el gen ATP7B en 2008. Un paso previo a la búsqueda de mutaciones y polimorfismos en este gen es la detección de cambios conformacionales. El polimorfismo

p.K832R y p.T991T son informados en diversos países; sin embargo, hay reportes en los cuales

no informan la frecuencia alélica. (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los polimorfismos p.K832R y p.T991T en diversas poblaciones humanas y sus referencias

Frecuencia alélica (%)	Polimorfismo	País	Referencias
35,2	p.K832R	Cuba	
30	p.K832R	China	11
27,4			12
2,4	p.K832R	Japón	10
31	p.K832R	Irán	13
18,5	p.K832R	India	9
26,5	p.K832R	Egipto	14
27	p.K832R	Taiwán	15
No se informa	p.K832R	EUA	19
No se informa		Puerto Rico	19
5,6	p.T991T	Cuba	
5,4	p.T991T	Canadá	3
5	p.T991T	Irán	13
2,7	p.T991T	Turquía	18
No se informa	p.T991T	Reino Unido	19
No se informa	p.K832R y p.T991T	Venezuela	20
No se informa	p.K832R y p.T991T	España	21

La frecuencia alélica del polimorfismo p.K832R en 27 pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson resultó ser la más alta, comparada con los datos de los países analizados, lo cual debe ser por el origen étnico de nuestra población. Hubiese sido interesante que los investigadores españoles hubiesen

publicado la frecuencia de este polimorfismo en su población para compararla con el nuestro (Tabla 1). Los datos de los países consultados presentaron frecuencias alélicas similares a esta investigación, por ejemplo: en un estudio en pacientes chinos¹¹ y en pacientes iraníes,¹³ pues no hubo diferencias significativas al

compararlo con los resultados obtenidos en pacientes cubanos. Sin embargo, en Japón informan una frecuencia de 2,4%, la cual es muy baja y se comporta como una variante polimórfica rara.¹⁰

La frecuencia alélica del polimorfismo p.T991T en 27 pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson resultó ser la más alta, comparada con los datos de los países analizados, lo cual debe ser por el origen étnico de nuestra población aunque fue similar a lo informado en Canadá. (Tabla 1). Los investigadores españoles no han informado la frecuencia de este polimorfismo en su país²¹ dato que sería de utilidad para compararlo con los resultados obtenidos en esta investigación,

por el origen étnico de nuestra población y es de esperar que las frecuencias obtenidas en España sean similares a las de Cuba.

Entre las principales manifestaciones clínicas en los pacientes que presentaron el polimorfismo p.K832R fueron más frecuentes las hepáticas (27,8%), entre las que se encontraron: ictericia, esplenomegalia, ascitis, hepatomegalia, entre otras. Las manifestaciones neurológicas se detectaron en 22,2% de los pacientes. Las manifestaciones mixtas se identificaron en 100% de los pacientes con el polimorfismo p.T991T (Tabla 2). En nuestro estudio no se evidenció manifestaciones psiquiátricas en los 27 pacientes analizados.

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de los pacientes que presentaron los polimorfismos p.K832R y p.T991T y la combinación de los mismos.

Polimorfismo	Manifestaciones hepáticas	Manifestaciones neurológicas	Manifestaciones mixtas	Asintomáticos
p.K832R	5	4	2	4
p.T991T	0	0	0	0
p.K832R y p.T991T	3	0	0	0

En los dos polimorfismos analizados las manifestaciones hepáticas son las más frecuentes, una razón pudiera ser que la mayoría de los pacientes se diagnostican en el Instituto Nacional de Gastroenterología y llegan a este centro por sintomatología hepática. Además en la literatura se informa que la mayor frecuencia de las manifestaciones en los pacientes con la enfermedad de Wilson son precisamente las hepáticas.²¹ En ambos polimorfismos se identifican un número

reducido de pacientes con manifestaciones neurológicas de acuerdo con lo informado en la literatura.^{21,22}

En Cuba se había identificado el polimorfismo p.K832R con anterioridad en 100 pacientes cubanos por este colectivo de autores en 2013²² y su frecuencia fue muy similar al informado en este estudio que es continuidad del mismo.

En tres pacientes se identificaron la presencia de ambos polimorfismos y presentaron manifestaciones mixtas. La combinación de

estos dos polimorfismos son utilizados en diversas investigaciones en el estudio molecular de pacientes con la Enfermedad de Wilson.²⁰ En Venezuela se utilizan estos dos polimorfismos y otros tres más (p.V456L, IVS3, p.V1140A) para determinar los haplotipos en familias donde haya al menos un individuo afectado con la enfermedad de Wilson.²⁰

La identificación de los polimorfismos p.K832R y p.T991T permitirá en un futuro inmediato el diagnóstico molecular por métodos indirectos y su correlación con las manifestaciones clínicas

CONCLUSIONES

Está disponible la identificación de los polimorfismos p.K832R y p.T991T en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson a la Red Nacional de Genética Médica y el Instituto Nacional de Gastroenterología. Las manifestaciones

presentes en los pacientes cubanos analizados. En los pacientes cubanos con la Enfermedad de Wilson son informativos los polimorfismos p.K832R y p.T991T. Por lo que será una herramienta molecular importante para el asesoramiento genético. Es necesario implementar el estudio de los polimorfismos p.V456L, IVS3 y p.V1140A para la construcción de haplotipos en pacientes cubanos con la Enfermedad de Wilson e instaurar el diagnóstico molecular por métodos indirectos.

hepáticas son las más frecuentes en los pacientes que presentan los polimorfismos p.K832R y p.T991T. La combinación de estos polimorfismos nos permitirá en un futuro establecer una estrategia para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Wilson en Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. Numero MIM: {MIM 277900}: {fecha de acceso: 27 de mar 2017}: Disponible en: <https://www.omim.org/entry/277900>
2. Kumar SS, Kurian G, Roberts EA. Genetics of Wilson's disease: a clinical perspective. *Indian J Gastroenterol.* 2012; 31 (6): 285-93.
3. Kenney SM, Cox DW. Sequence Variation Database for the Wilson Disease Copper Transporter, ATP7B. *Hum Mutat.* 2007; 28 (12):1171-77.
4. Li XH, Lu Y, Ling Y, Fu QC, Xu J, Zang GQ, et al. Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification of 14 novel mutations. *BMC Med Genet.* 2011; 12: 6.
5. Wu F, Wang J, Pu Ch, Qiao Li and Chunmeng J. Wilson's disease: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2015;16: 6419-6431.
6. Beinhardt S, Leiss W, Stattermayer 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: 683-689.
7. Zimbrea PC and Schilsky ML. Psychiatric aspects of Wilson disease: A review. *Gen. Hosp. Psychiatry.* 2014; 36: 53-62.
8. Badenas Orquin C. Avances en el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Wilson. *Gastroenterol Hepatol.* 2011; 34 (6): 428-33.

9. Gupta A, Maity B, Trivedi R, Ray J, Das SK, et al. Molecular pathogenesis of Wilson-disease: haplotype analysis, detection of prevalent mutations and genotype phenotype correlation in Indian patients. *Hum Genet.* 2005; 118 (1): 49-57.
10. Nanji M, Nguyen V, Kawasoe J, Inui K, Endo F, Nakajima T, et al. Haplotype and Mutation Analysis in Japanese Patients with Wilson Disease. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 1423-1429.
11. Sheng Y, Liang G, Quan-Xiang S, Lin-Fu Z. Wilson disease: Identification of two novel mutations and clinical correlation in Eastern Chinese patients. *World J Gastroenterol.* 2007; 13 (38): 5147-5150.
12. Wang LH, Huang YQ, Shang X, Su QX, Xiong FX, Qing-Yun Y, et al. Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: identification of 10 novel mutations and its clinical correlation. *Journal of Human Genetics.* 2011; 56: 660-665.
13. Narges Z, Reza S, Esteghamat S, Mohsen Ch, Montazer M. Prevalence of ATP7B Gene Mutations in Iranian Patients With Wilson Disease. *Hepat Mon.* 2011; 11 (11): 890-894.
14. Abdelghaffar Tawhida Y, Elsayed Solaf M, Elsobky E, Bochow B, Buttner J, Schmidt H. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *J Hum Genet.* 2008; 53: 681-687.
15. Chang-Hai T, Fuu-Jen T, Jer-Yuarn W, Jang-Gowth C, Cheng-Chun L, Shuan-Pei L, et al. Mutation Analysis of Wilson Disease in Taiwan and Description of Six New Mutations. *Human Mutation.* 1998; 12: 370-376.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16 (3): 1215.
17. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi AM, Sturniolo GC, Marcellini M, et al. Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the mediterranean population. *Hum Mutat.* 1998; 12: 89-94.
18. Papur OS, Akman SA, Cakmur R, Terzioglu O. Mutation analysis of ATP7B gene in Turkish Wilson disease patients: Identification of five novel mutations. *Eur J Med Genet.* 2013; 56: 175-79.
19. Shah A, Chernov I, Zhang H, Ross B, 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.
20. Paradisi I, De Freitas L, Arias S. Most frequent mutation c.3402 del C (p.Ala1135GlnfsX13) among Wilson disease patients in Venezuela has a wide distribution and two old origins. *European Journal of Medical Genetics.* 2015; 58: 59-65.
21. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, Ballesta F. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population – identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet.* 2005; 68: 61-68.
22. Feoktistova YC, Ruenes C, García Bacallao EF, Collazo Mesa T, Robaina Jiménez Z, Castañeda C, Roblejo H. Identificación del polimorfismo K832R en pacientes con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson. *Revista Habanera Ciencias Médicas.* 2013; 12 (2): 197-202.