

Marcadores moleculares en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson

Molecular markers in cuban patients with Wilson's disease

Yulia Clark-Feoktistova^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-4970-0249>

Caridad Ruenes Domech² <https://orcid.org/0000-0001-9015-5257>

Elsa García Bacallao² <https://orcid.org/0000-0002-7743-7636>

Iliana Clark Feoktistova¹ <https://orcid.org/0000-0002-0956-0763>

Hilda Roblejo Balbuena³ <https://orcid.org/0000-0002-5895-8057>

Georgina Espinosa López⁴ <https://orcid.org/0000-0003-0064-7464>

¹Universidad de Guantánamo. Guantánamo, Cuba.

²Instituto de Gastroenterología. La Habana, Cuba.

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

⁴Universidad de La Habana. Cuba.

*Autor para la correspondencia: yclarkf@gmail.com

RESUMEN

Introducción: Se han informado más de 120 polimorfismos en el gen *atp7b* en pacientes con diagnóstico de la enfermedad de Wilson. Los estudios moleculares permiten el diagnóstico de la enfermedad.

Objetivos: Identificar los cambios conformacionales en los exones 12 y 16 del gen *atp7b*, así como detectar polimorfismos en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson.

Métodos: Se realizó un estudio descriptivo en el Centro Nacional de Genética Médica y en el Instituto de Gastroenterología, durante el período 2015-2020. Se incluyeron 70 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson. El ADN se extrajo con la técnica de precipitación salina. Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del fragmento de interés, detectar los cambios conformacionales, y los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala. Se usó la técnica de polimorfismo conformacional de simple cadena y secuenciación en los exones 12 y 16 del gen *atp7b*.

Resultados: La frecuencias alélicas de los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala resultó de 42,1 % y 49,3 %, respectivamente. En los pacientes con estos polimorfismos se observaron manifestaciones hepáticas con mucha frecuencia.

Conclusiones: Se identificaron los polimorfismos p.Arg952Lys and p.Val1140Ala en 45 y 52 pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. Esto posibilitará hacer estudios moleculares por métodos directos e indirectos.

Palabras claves: enfermedad de Wilson; marcadores moleculares; polimorfismo.

ABSTRACT

Introduction: More than 120 polymorphisms in the ATP7B gene have been reported in patients with Wilson's disease. Molecular studies allow the diagnosis of the disease.

Objectives: To identify conformational changes in exons 12 and 16 of the ATP7B gene, as well as to detect polymorphisms in Cuban patients with presumptive clinical diagnosis of Wilson's disease.

Methods: A descriptive study was conducted at the National Center of Medical Genetics and the Institute of Gastroenterology, during the period 2015-2020.

Seventy patients with presumptive clinical diagnosis of Wilson's disease were included. DNA was extracted using the saline precipitation technique. Polymerase chain reaction technique was used to amplify the fragment of interest, detect conformational changes, and p.Arg952Lys and p.Val1140Ala polymorphisms. Single-strand conformational polymorphism and sequencing were used in exons 12 and 16 of the ATP7B gene.

Results: The allele frequencies of the p.Arg952Lys and p.Val1140Ala polymorphisms were 42.1% and 49.3%, respectively. Patients with these polymorphisms presented hepatic manifestations very frequently.

Conclusions: The identification of p.Arg952Lys and p.Val1140Ala polymorphisms in Cuban patients with Wilson's disease will make it possible to perform molecular studies by direct and indirect methods.

Keywords: Wilson's disease; molecular markers; polymorphism.

Recibido: 28/10/2023

Aceptado: 14/04/2024

Introducción

La enfermedad de Wilson (EW, MIM 277 900) se caracteriza por la acumulación de cobre en diversos órganos, fundamentalmente en hígado, cerebro, riñones y córnea. No cuenta con un único criterio de diagnóstico y requiere varias pruebas porque se asocia a diferentes manifestaciones clínicas.⁽¹⁾ El diagnóstico clínico y molecular se considera muy complejo,⁽²⁾ aunque este último resulta definitivo con gran heterogeneidad mutacional.⁽³⁾

La proteína ATP7B, transportadora de cobre en la célula, depende de la codificación del gen *atp7b*, cuyas mutaciones provocan la enfermedad de Wilson. Se identificaron más de 900 mutaciones en diversas poblaciones.⁽⁴⁾ Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) se

distribuyen en todo el gen *atp7b* y constituyen marcadores moleculares para diagnosticar la enfermedad.

Los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala se localizan en los exones 12 y 16 del gen *atp7b*, respectivamente. Se han identificado en países como China,⁽⁵⁾ Rusia⁽⁶⁾ y Taiwán.⁽⁷⁾ Los SNP se utilizan en la construcción de los haplotipos en familias con al menos un caso de la enfermedad de Wilson; además, posibilitan el diagnóstico molecular.⁽⁸⁾

Para determinar los marcadores moleculares en el gen *atp7b* se requiere una adecuada tecnología de cribaje. El polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP, por sus siglas en inglés) constituye una de las técnicas utilizadas para identificar en las muestras de ADN las modificaciones que pueden corresponder a polimorfismos o mutaciones.⁽⁹⁾ También se utiliza en la secuenciación del ADN.⁽¹⁰⁾

Asimismo, la probabilidad combinada (cPdel) estima el cambio aminoacídico en proteínas. Este algoritmo puede combinar los resultados de las cuatro herramientas bioinformáticas más utilizadas (Poly-phen-2, SIFT, PANTHER y PhD-SNP) para evaluar el efecto de los SNP en la función de las proteínas.⁽¹¹⁾

El objetivo del presente trabajo fue identificar los cambios conformacionales en los exones 12 y 16 del gen *atp7b*, así como detectar polimorfismos en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson.

Métodos

Se realizó un estudio descriptivo en el Centro Nacional de Genética Médica, durante el período 2015-2020. Se incluyeron 70 casos atendidos en las consultas del Instituto de Gastroenterología y diagnosticados con la enfermedad de Wilson. Los pacientes dieron su consentimiento para participar en la investigación, de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki. Esta investigación se aprobó por los consejos científicos y los comités de ética de las tres instituciones vinculadas al estudio: el Centro Nacional de Genética Médica, el Instituto Nacional de Gastroenterología y el Consejo Científico de la Universidad de Guantánamo.

Las manifestaciones clínicas se evaluaron por un equipo multidisciplinario (gastroenterólogos, genetistas, neurólogos, bioquímicos, hepatólogos, psicólogos y psiquiatras). Se siguieron los criterios establecidos para el diagnóstico de la enfermedad.⁽⁸⁾ Se seleccionaron los exones 12 y 16 del gen *atp7b* para detectar los cambios conformacionales e identificar los marcadores moleculares. A los pacientes se les extrajo el ADN mediante el método de precipitación salina,⁽¹²⁾ a partir de 10 ml de sangre periférica con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) (56 mg/ml). Para la amplificación de los exones 12 y 16, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se emplearon 100ng de ADN, los oligonucleótidos 12L (5' TCATAGGTTGTAATTTCCCATG 3'), 12R (5' CAGGATCAATGTCAGTAGATTAT3'), 16F (5' GTTCACAGTGAAATTGGACC 3') y 16R (5' ACTGTATTTCTGAGAGACGG 3'); 1mM de dNTPs (Boehringer), 10X tampón PCR, 15mM de MgCl₂ y 0,25U de Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen de 25 µL.

Se realizó la electroforesis polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP). El ADN se visualizó gracias al método de tinción con plata, según las instrucciones del juego comercial *kit PlusOne DNA Silver Staining* (Amersham Biosciences, 2007). Los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala se determinaron por comparación de las corridas electroforéticas, mediante la técnica de SSCP de controles positivos heterocigóticos y homocigóticos. Los controles positivos fueron las muestras de ADN de los pacientes heterocigóticos, y los homocigóticos se emplearon para los polimorfismos que donaron investigadores de los laboratorios *Ospedale Regionale per le Microcitemie*, Cagliari, Italia, y del Hospital Universitario de Munster, en Alemania.

Las muestras se secuenciaron por el método de Sanger, y los ADN se amplificaron por la técnica de PCR. La selección se basó en la cantidad de cambios conformacionales en los exones 12 y 16. Se purificó el producto de amplificación con el uso del juego comercial *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó el secuenciador semiautomático ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia).

Cada polimorfismo detectado por secuenciación se confirmó por repetición y se observaron individuos de la misma familia. Los resultados se analizaron mediante el programa informático del equipo y se comparó con la secuencia del

ADN de referencia del gen *atp7b*, GenBank NM000053. Cada muestra se secuenció dos veces. La frecuencia alélica se estimó como el número de alelos del polimorfismo de interés con relación al total de alelos estudiados. El valor de la probabilidad se determinó por la prueba de Fisher's con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

La probabilidad combinada (cPdel) resultó útil para estimar un cambio aminoacídico en proteínas. Este algoritmo combinó los resultados de las cuatro herramientas bioinformáticas más utilizadas: Polyphen-2 (fenotipo de los polimorfismos), SIFT (transformación de características invariante de escala), PANTHER (análisis de proteínas mediante relaciones evolutivas) y PhD-SNP (predictor de la patogenicidad de las variantes). Todas permitieron evaluar el efecto de los polimorfismos de un solo nucleótido en la función de las proteínas.⁽¹¹⁾

Resultados

La edad media de los pacientes con polimorfismo p.Arg952Lys fue de 30,2 años, con una desviación estándar de 12,8. El intervalo estuvo entre 8 (mínimo) y 52 años (máximo). Muy similar resultó el comportamiento etario de los casos con polimorfismo p.Val1140Ala, con una edad media de 31,4 años, una desviación estándar de 14,1; y un intervalo entre 11 (mínimo) y 56 años (máximo). La tabla 1 muestra los datos de los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala en los pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Wilson y los controles negativos.

Tabla 1 - Polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala en pacientes y controles cubanos

Polimorfismo	SNP ID	Bases	Pacientes (n = 70)		Controles (n = 100)		OR (95 % CI)
			n	%	n	<i>p</i> *	
p.Arg952Lys	rs732774	G	56	80,0	74		1 (Ref)
		A	45	64,3	59	0,29	1,25 (0,67-2,35)
		GG	25	35,7	41		1 (Ref)

		GA	31	44,3	33	0,09	1,61 (0,86-3,03)
		AA	14	20,0	26	0,24	0,71 (0,34-1,49)
		GA+AA	45	64,3	59	0,29	1,25 (0,67-2,35)
		T	52	74,3	72		1 (Ref)
		C	52	74,3	62	0,06	1,77 (0,90-3,46)
p.Val1140Ala	rs1801249	TT	17	24,3	38		1 (Ref)
		TC	35	50,0	34	0,02	1,94 (1,04-3,63)
		CC	17	24,3	28	0,35	0,82 (0,41-1,66)
		TC+CC	52	74,3	62	0,28	1,30 (0,65-2,62)

Leyenda: *Valor de la probabilidad determinada por la prueba de Fisher's; Ref: referencia; CI: intervalos de confianza; NS: no significativa.

El cambio de guanina por adenina provocó el polimorfismo p.Arg952Lys, esto trajo consigo el intercambio del aminoácido arginina por lisina en la posición 2856 del gen *atp7b*. Este polimorfismo se localizó en el segmento de transmembrana TM5. Asimismo, la permuta de la citocina con la timina conllevó al polimorfismo p.Val1140Ala, y el aminoácido valina sustituyó a la alanina en la posición 3420 del gen *atp7b*. Este polimorfismo se ubicó en el lazo que une la ATP en la proteína para el transporte del cobre.

Las frecuencias de los polimorfismos p.Arg952Lys y el p.Val1140Ala resultaron de 42,1 % y 49,3 %, respectivamente. Se observaron diferencias significativas con las frecuencias informadas en la población de China, lo cual se relaciona con las diferencias en la ascendencia genética de estas poblaciones (tabla 2).

Tabla 2 - Frecuencias por países de los polimorfismo p.Arg952Lys y p.Val1140Ala

Polimorfismo	Países	Frecuencia pacientes	Probabilidad	EE	Frecuencia Controles	Probabilidad	EE
p.Arg952Lys	Cuba	42,1 %			32,5 %		4,87
	China ⁽³⁾	59,7 %	$p < 0,05$	4,99	49,6 %	NS	
	Rusia ⁽⁴⁾	-			47,1 %	NS	
	Taiwán ⁽⁵⁾	-			26,0 %	$p < 0,05$	
p.Val1140Ala	Cuba	49,3 %			45,0 %		4,91
	China	64,1 %	$p < 0,05$	4,95	49,6 %	NS	
	Rusia	-			43,1 %	NS	
	Taiwán	-			25,0 %	$p < 0,05$	

Leyenda: NS: no significativa; EE: error estándar.

La tabla 3 presenta los datos del análisis de los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala con herramientas bioinformáticas.

Tabla 3 - Análisis con herramientas bioinformáticas de los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala

Polimorfismo	Poly phen-2	SIFT	Panther-PSEP	cP del	Experimental deletéreo
p.Arg952Lys	0,000	1,000	Probablemente benigna	0,25	
p.Val1140Ala	0,000	0,914	Probablemente benigna	0,022	Complementación completa de levadura

De los 70 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson, se identificaron 31 heterocigóticos y 14 homocigóticos para el polimorfismo p.Arg952Lys por la técnica SSCP, cuya frecuencia alélica en los pacientes estudiados alcanzó el 42,1 %. Los cambios provocados por estas variantes polimórficas no afectaron la función de la proteína transportadora de cobre, *atp7b*, en humanos y se identificó en diversas poblaciones con una frecuencia mayor al 1 %.^(3,4,5)

Las principales manifestaciones clínicas de los pacientes con el polimorfismo p.Arg952Lys o p.Val1140Ala fueron las hepáticas (78,8 % y 80,8 %, respectivamente); seguidas por la combinación de las hepáticas y las neurológicas (15,6 % y 15,4 %), las neurológicas (4,4 % y 1,9 %), y las mixtas: neurológicas y psiquiátricas (2,2 % y 1,9 %). Se identificaron los anillos de Kayser-Fleischer en dos y cuatro de los pacientes con los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala, respectivamente. Se observaron tres individuos con manifestaciones hepáticas y neurológicas, dos con manifestaciones neurológicas, y uno con manifestaciones neurológicas y psiquiátricas.

Discusión

El polimorfismo p.Val1140Ala se ha identificado en América,⁽⁶⁾ Asia^(3,11) y Europa.⁽¹²⁾ La presencia de este gen en la población cubana podría explicarse por la ascendencia genética, pues se observó un porcentaje considerable de genes de origen caucásico.⁽¹⁴⁾ En diferentes países se han determinado los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala, pero, como no se informan las frecuencias de los pacientes con la enfermedad de Wilson,^(6,12) no se pueden comparar los resultados ni construir los haplotipos con los diferentes marcadores moleculares; por tanto, se desaprovecha la oportunidad de ampliar el diagnóstico molecular.

El análisis de los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala con programas bioinformáticos, como el SIFT, Polyphen-2 y Panther-PSEP, predice su benignidad. Sin embargo, cuando se compara el cPdel, el polimorfismo p.Arg952Lys resulta mayor que el polimorfismo p.Val1140Ala. Esto evidencia que el polimorfismo p.Arg952Lys modifica el fenotipo en pacientes con la enfermedad de Wilson.

Aunque se han determinado nuevas mutaciones en el gen *atp7b*,^(13,14,15,16) se realizan técnicas de microarrays⁽¹⁶⁾ y se utiliza la secuenciación de última generación.⁽¹⁰⁾ En Cuba se trabaja en el establecimiento de una estrategia para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Wilson. Se tiene experiencia en la identificación de los polimorfismos en el exón 3⁽¹⁷⁾ y la detección puntual de mutaciones en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Wilson.⁽¹⁸⁾ En un futuro cercano se construirán los haplotipos en las familias cubanas y se podrá efectuar el diagnóstico molecular por métodos indirectos.

Varias investigaciones evidencian que algunos SNP varían las propiedades de la proteína ATP7B.⁽¹⁹⁾ De ahí, la importancia de estudiar estos polimorfismos, no solo como marcadores moleculares, sino también como modificadores del fenotipo del paciente con la enfermedad de Wilson.

En humanos la presencia de K952 se asocia con una mayor fracción de cobre intercambiable en el suero;⁽¹⁹⁾ por tanto, en estudios posteriores se analizará la asociación de la variante K952 y el cobre intercambiable en suero en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson. Además de otras combinaciones de K952 con polimorfismos como K832, P991, L456, entre otros.

Los estudios clínicos y moleculares en los pacientes con la enfermedad de Wilson aportan un gran impacto en el diagnóstico y prevención de esta enfermedad.⁽²⁰⁾ Los marcadores moleculares contribuyen a la detección para el pronóstico, y el tratamiento de los pacientes y sus familiares.

La técnica de SSCP y la secuenciación permiten identificar los polimorfismos p.Arg952Lys y p.Val1140Ala. Cuba dispone de herramientas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson. El estudio permitió registrar las familias cubanas con este diagnóstico a través de datos clínicos y genéticos. La información obtenida resulta valiosa para el seguimiento de los pacientes confirmados y el tratamiento personalizado con asesoramiento genético.

Referencias bibliográficas

1. García-Villarreal L, Hernández-Ortega A, Sánchez-Monteagudo A, Pena-Quintana L, Ramírez-Lorenzo T, Riano M, *et al.* Wilson disease: revision of diagnostic criteria in a clinical series with great genetic homogeneity. *J Gastroenterol.* 2021;56(1):78-89. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00535-020-01745-0>
2. Poujois A, Woimant F. Wilson's disease: a 2017 update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2018;42(6):512-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.03.007>
3. Berenguer M, Vergara M, Almohalla C, Hernandez A, Blanco S, Testillano M, *et al.* Significant heterogeneity in the diagnosis and long-term management of Wilson disease: Results from a large multicenter Spanish study. *Gastroenterol Hepatol.* 2023;46(8):577-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2022.10.018>
4. Sánchez-Monteagudo A, Álvarez-Saucó M, Sastre I, Martínez-Torres I, Lupo V, Berenguer M, *et al.* Genetics of Wilson disease and Wilson-like phenotype in a clinical series from eastern Spain. *Clin Genet.* 2020;97(5):758-63. DOI: <https://doi.org/10.1111/cge.13719>
5. Hua R, Hua F, Jiao Y, Pan Y, Yang X, Pen S, *et al.* Mutational analysis of ATP7B in Chinese Wilson disease patients. *Am J Transl Res.* 2016 [acceso

20/04/2022];8(6):2851-61. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931180/>

6. Bayazutdinovaa G, Shchaginaa O, Karunas A, Vyalova N, Sokolov A, Polyakova V. Spectrum of mutations in the ATP7B gene in russian patients with Wilson's Disease. Rus J Genetics. 2019;55(12):1528-35. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795419120020>

7. Chin-Wen L, Tze-Kiong E, Fu-Jen T, Ta-Chi L, Pang-Yin S, Jan-Gowth C. Development of a high-resolution melting method for the screening of Wilson disease-related ATP7B gene mutations. Clin Chim Acta. 2010;411(17-18):1223-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.04.030>

8. Alkhouri N, Gonzalez-Peralta R, Medici V. Wilson disease: a summary of the updated AASLD Practice Guidance. Hepatol Commun. 2023;7(6):e0150. DOI: <https://doi.org/10.1097/HC9.000000000000150>

9. Sahli M, Zrhidri A, El Kadiri Y, Jaouad I, Meskini T, Sefiani A. First application of next-generation sequencing in four families with Wilson disease in Morocco. Egypt J Med Hum Genet. 2023;24(54):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43042-023-00437-7>

10. Wang J, Tang L, Xu A, Zhang S, Jiang H, Pei P, *et al.* Identification of mutations in the ATP7B gene in 14 Wilson disease children. Medicin. 2021;100(16):e25463. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025463>

11. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, *et al.* Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population-identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. Clin Genet. 2005;68(1):61-8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00439.x>

12. 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. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>

13. Lafhal K, Sabir E, Hakmaoui A, Hammoud M, Aimrane A, Najeh S, *et al.* Clinical, biochemical and molecular characterization of Wilson's disease in Moroccan patients. Mol Genet Metabol Rep. 2023;36:100984. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2023.100984>

14. Hou H, Chen D, Liu J, Feng L, Zhang J, Liang X, *et al.* Clinical and genetic análisis in neurological Wilson's disease patient with neurological worsening following chelator therapy. *Front Genet.* 2022;13:875694. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.875694>
15. Nguyen M, Nguyen A, Ngo N, Nguyen P, Pham Y, Hoáng V, *et al.* Mutation spectrum of *ATP7B* gene in pediatric patients with Wilson disease in Vietnam. *Mol Genet Metabol Rep.* 2022;31:100861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2022.100861>
16. Siyu J, Xiaojin L, Wei Z, Bei Z, Zhen W, Weijia D, *et al.* Laboratory and clinical evaluation of a microarray for the detection of *ATP7B* mutations in Wilson disease in China. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(11):e24735. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24735>
17. Clark-Feoktistova Y, Ruenes-Domech C, García-Bacallao E, Roblejo-Balbuena H, Feoktistova L, Clark-Feoktistova I, *et al.* Polimorfismo p.L456V, presencia en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson. *Rev Gastroenterol Méx.* 2019;84(2):143-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.03.005>
18. Clark-Feoktistova Y, Ruenes C, Roblejo H, Espinosa G, García E, Castañeda C, *et al.* Clinic and molecular study in Cubans patients with Wilson disease. *An Acad Cienc Cub.* 2019 [acceso 20/04/2022];9(3). Disponible en: <https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/720>
19. McCann C, Jayakanthan S, Siotto M, Yang N, Osipova M, Squitti R, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in human *atp7b* gene modify properties of ATP7B protein. *Metallomics* 2019;11(8):1441. DOI: <https://doi.org/10.1039/c9mt90028d>
20. Kluska A, Kulecka M, Litwin T, Dziezyc K, Balabas A, Piatkowska M, *et al.* Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic variants across the *ATP7B* gene and some modifiers of Wilson's disease phenotype. *Liver Int.* 2019;39(1):177-86. DOI: <https://doi.org/10.1111/liv.13967>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización: Yulia Clark-Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa García Bacallao, Iliana Clark Feoktistova, Hilda Roblejo Balbuena y Georgina Espinosa López.

Curación de contenidos y datos: Yulia Clark-Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa García Bacallao, Iliana Clark Feoktistova, Hilda Roblejo Balbuena y Georgina Espinosa López.

Investigación: Yulia Clark-Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa García Bacallao, Iliana Clark Feoktistova, Hilda Roblejo Balbuena y Georgina Espinosa López.

Metodología: Yulia Clark-Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa García Bacallao, Iliana Clark Feoktistova, Hilda Roblejo Balbuena y Georgina Espinosa López.

Redacción-borrador original: Yulia Clark-Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa García Bacallao, Iliana Clark Feoktistova, Hilda Roblejo Balbuena y Georgina Espinosa López.