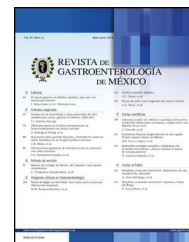




# REVISTA DE GASTROENTEROLOGÍA DE MÉXICO

[www.elsevier.es/rgmx](http://www.elsevier.es/rgmx)



## ARTÍCULO ORIGINAL

# Polimorfismo p.L456V, presencia en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson<sup>☆</sup>

Y. Clark-Feoktistova<sup>a,\*</sup>, C. Ruenes-Domech<sup>b</sup>, E.F. García-Bacallao<sup>c</sup>,  
H. Roblejo-Balbuena<sup>d</sup>, L. Feoktistova<sup>e</sup>, I. Clark-Feoktistova<sup>f</sup>, O. Jay-Herrera<sup>g</sup>  
y T. Collazo-Mesa<sup>h</sup>

<sup>a</sup> Máster en Ciencias Biológicas, Universidad de Guantánamo (UG). Laboratorio de Biología Molecular, Guantánamo, Cuba

<sup>b</sup> Especialista de primer grado en Gastroenterología, Directora del Instituto Nacional de Gastroenterología (ING), La Habana, Guantánamo, Cuba

<sup>c</sup> Especialista de primer grado en Gastroenterología, Subdirectora de Docencia del Instituto Nacional de Gastroenterología (ING), La Habana, Guantánamo, Cuba

<sup>d</sup> Especialista de primer grado de Genética Clínica, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Guantánamo, Cuba

<sup>e</sup> Especialista en Lenguas Extranjeras, Universidad de Guantánamo, Guantánamo, Cuba

<sup>f</sup> Especialista en Química, CITMA, Guantánamo, Cuba

<sup>g</sup> Especialista en Bioestadística, Universidad de Guantánamo (UG), Guantánamo, Cuba

<sup>h</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Guantánamo, Cuba

Recibido el 4 de diciembre de 2017; aceptado el 18 de marzo de 2018

### PALABRAS CLAVE

Enfermedad de  
Wilson;  
Polimorfismo  
p.L456V;  
SSCP

### Resumen

**Introducción y objetivos:** La enfermedad de Wilson se caracteriza por la acumulación de cobre en diversos órganos: hígado, cerebro y córnea. La causa molecular que la provoca son las mutaciones en el gen *atp7b*. Se han informado en la literatura más de 120 polimorfismos en el gen *atp7b*. El objetivo del presente trabajo fue identificar los cambios conformacionales en el exón 3 del gen *atp7b* y detectar el polimorfismo p.L456V en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson.

**Material y métodos:** En el Centro Nacional de Genética Médica y en el Instituto Nacional de Gastroenterología, durante el período 2007-2012 se realizó un estudio descriptivo 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 identificar los cambios conformacionales y la presencia del polimorfismo p.L456V en el exón 3 del gen *atp7b* se usó la técnica de polimorfismo conformacional de simple cadena.

<sup>☆</sup> Este estudio es el resultado del trabajo conjunto del Centro Nacional de Genética Médica (centro colaborador de la OMS para el desarrollo de enfoques genéticos en la promoción de salud), el Instituto Nacional de Gastroenterología y la Universidad de Guantánamo.

\* Autor para correspondencia. Calle 2, Edificio 23, apartamento 143C. Reparto Obrero. Guantánamo, Cuba. Tel.: +5-3461444.  
Correo electrónico: [feoktistova@cug.co.cu](mailto:feoktistova@cug.co.cu) (Y. Clark-Feoktistova).

<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.03.005>

0375-0906/© 2018 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: Clark-Feoktistova Y, et al. Polimorfismo p.L456V, presencia en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson. Revista de Gastroenterología de México. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.03.005>

**Resultados:** Se identifican 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 en 105 pacientes cubanos diagnosticados clínicamente con la enfermedad de Wilson es del 41%. Las manifestaciones más frecuentes en los pacientes que presentaron este polimorfismo son las hepáticas.

**Conclusión:** 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.

© 2018 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## KEYWORDS

Wilson's disease;  
Polymorphism  
p.L456V;  
Single-strand  
conformation  
polymorphism

## Presence of the p.L456V polymorphism in Cuban patients clinically diagnosed with Wilson's disease

### Abstract

**Introduction and aims:** Wilson's disease is characterized by the accumulation of copper in different organs, mainly affecting the liver, brain, and cornea, and is caused by mutations in the ATP7B gene. More than 120 polymorphisms in the ATP7B gene have been reported in the medical literature. The aim of the present study was to identify the conformational changes in the exon 3 region of the ATP7B gene and detect the p.L456V polymorphism in Cuban patients clinically diagnosed with Wilson's disease.

**Material and methods:** A descriptive study was conducted at the *Centro Nacional de Genética Médica* and the *Instituto Nacional de Gastroenterología* within the time frame of 2007-2012 and included 105 patients with a clinical diagnosis of Wilson's disease. DNA extraction was performed through the salting-out method and the fragment of interest was amplified using the polymerase chain reaction technique. The conformational shift changes in the exon 3 region and the presence of the p.L456V polymorphism were identified through the Single-Strand Conformation Polymorphism analysis.

**Results:** The so-called *b* and *c* conformational shift changes, corresponding to the p.L456V polymorphism in the heterozygous and homozygous states, respectively, were identified. The allelic frequency of the p.L456V polymorphism in the 105 Cuban patients that had a clinical diagnosis of Wilson's disease was 41% and liver-related symptoms were the most frequent in the patients with that polymorphism.

**Conclusion:** The p.L456V polymorphism was identified in 64 Cuban patients clinically diagnosed with Wilson's disease, making future molecular study through indirect methods possible.

© 2018 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

La enfermedad de Wilson (EW; MIM 277 900) presenta un patrón de herencia autosómico recesivo. Constituye un problema de salud mundial. Se clasifica como una enfermedad genética rara y tiene tratamiento; si no se atiende, puede provocar daños irreversibles en el hígado y en el cerebro que conducen a la muerte del paciente.

Se caracteriza por la acumulación de cobre en diferentes órganos: hígado, cerebro y córnea. El diagnóstico clínico de esta enfermedad es complejo<sup>1</sup>. Se caracteriza por daños en el hígado, que pueden manifestarse mediante la elevación de los niveles séricos de transaminasas hasta hepatitis fulminante. Los pacientes con esta enfermedad pueden presentar afectaciones a nivel cerebral. Además, pueden tener trastornos psiquiátricos, como depresión y tendencias suicidas, entre otras.

La causa molecular que 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 120 polimorfismos que están distribuidos en todo el gen *atp7b* y en los intrones. Los exones más polimórficos reportados son: 2, 8 y 16<sup>2</sup>.

El polimorfismo p.L456V se encuentra en el exón 3 del gen *atp7b*. Este se identifica en diversas poblaciones, tales como China<sup>3</sup>, Taiwán<sup>4</sup>, Egipto<sup>5</sup> y Venezuela<sup>6</sup>, entre otras. Este polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) se utiliza en la realización de los haplotipos en familias con pacientes con EW y permite el diagnóstico molecular en ellos<sup>6</sup>.

Para la determinación del espectro de polimorfismos en el gen *atp7b* se requiere una adecuada tecnología de cribado. 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 de ADN provoca un cambio conformacional, que a su vez provoca un cambio de movilidad en la electroforesis detectable por esta técnica, lo que permite identificar en las muestras de ADN cambios conformacionales diferentes a la variante normal<sup>7</sup>.

## Objetivos

Identificar los cambios conformacionales en el exón 3 y detectar el polimorfismo p.L456V en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de EW.

## Material y métodos

En el Centro Nacional de Genética Médica, durante el período 2007-2012 se realizó un estudio descriptivo que incluyó 105 pacientes (43 mujeres y 62 hombres) con diagnóstico presuntivo 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.

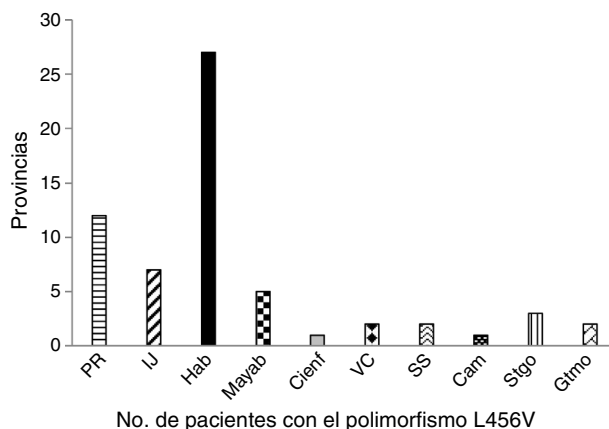
Las variables analizadas fueron: frecuencia alélica del polimorfismo p.L456V, cambio conformacional *a* para la variante normal, cambio conformacional *b* para la presencia del polimorfismo p.L456V en estado heterocigótico, y cambio conformacional *c* en estado homocigótico. Las manifestaciones clínicas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

La evaluación de las manifestaciones clínicas se realizó por un equipo multidisciplinario (gastroenterólogos, genetistas, neurólogos y bioquímicos). Se siguieron los criterios establecidos para el diagnóstico de la enfermedad.

Se seleccionó el exón 3 del gen *atp7b* para la detección de cambios conformacionales y la identificación del polimorfismo p.L456V. A todos los pacientes se les tomó una muestra de sangre y se extrajo el ADN mediante el método de precipitación salina<sup>8</sup> 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: 100 ng de ADN, 10(F) 5'-AGT CGC CAT GTA AGT GAT AA-3' y (R) 5'-CTG AGG GAA CAT GAA ACA A-3', 1 mM de dNTPs (Boehringer), 10X tampón PCR, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 U de Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen de 25  $\mu$ l.

Posteriormente se realizó la electroforesis SSCP. Se mezclaron 3,5  $\mu$ l con una solución de parada de bromofenol azul (0,05% BFA, 10 mM NaOH, 95% formamida, 20 mM EDTA) y 1  $\mu$ l del producto amplificado, en un volumen final de 7  $\mu$ 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* PlusOne DNA Silver Staining (Amersham Biosciences, 2007).

Los controles (muestras de ADN de pacientes heterocigóticos y homocigóticos para el polimorfismo p.L456V) utilizados fueron donados por el investigador Georgios Loudianos, del laboratorio *Ospedale Regionale per le Microcitemie* (Cagliari, Italia).



**Figura 1** Pacientes con el polimorfismo p.L456V. PR: Pinar del Río; IJ: Isla de la Juventud; Hab: Habana; Cienf: Cienfuegos; VC: Villa Clara; SS: Santi Spiritus; Cam: Camagüey; Stgo: Santiago de Cuba; Gtmo: Guantánamo.

Se analizaron las comparaciones de las frecuencias por la prueba de chi cuadrado.

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.

## Resultados

En los 105 pacientes que presentaron el polimorfismo p.L456V, la edad fue de  $31,6 \pm 14,1$  y el rango es de 11 años (mínimo) a 58 años (máximo).

Los pacientes estudiados con el polimorfismo p.L456V estaban representados en 10 provincias y el municipio especial Isla de la Juventud. La provincia más representada es la Habana, seguida de Pinar del Río (fig. 1).

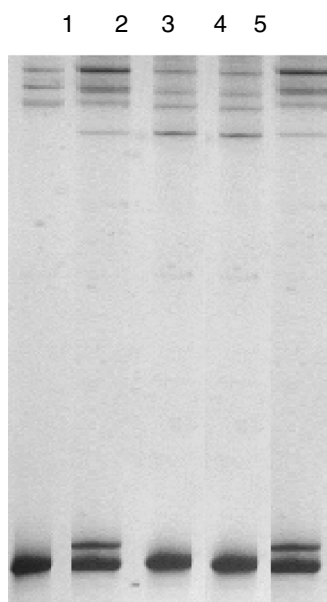
Se identificaron los cambios conformacionales denominados *b* y *c* con el uso de la técnica SSCP (fig. 2). El cambio conformacional denominado *a* correspondió a la variante normal. Los cambios conformacionales *b* y *c* correspondieron a la presencia del polimorfismo p.L456V estado heterocigótico y homocigótico, respectivamente.

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 fue en un total de 64 pacientes (fig. 3).

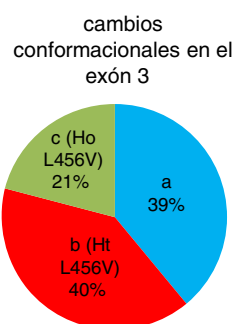
De los 105 pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson, se identificaron 42 pacientes heterocigóticos y 22 homocigóticos para el polimorfismo p.L456V por la técnica SSCP. La frecuencia alélica del polimorfismo p.L456V en pacientes cubanos estudiados en esta investigación es del 41%.

El polimorfismo p.L456V es consecuencia del cambio de guanina por citosina que provoca un cambio del aminoácido leucina por valina en la posición 456 de la proteína ATP7B. Este cambio no afecta la función de la proteína transportadora de cobre, ATP7B en humanos, y se detectó en diversas poblaciones con una frecuencia mayor del 1%<sup>3-5</sup>.

Entre las principales manifestaciones clínicas en los pacientes que presentaron el polimorfismo p.L456V fueron más frecuentes las hepáticas, con el 78%; a continuación las



**Figura 2** Polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP) del exón 3 del gen *atp7b* en dos controles positivos para el polimorfismo p.L456V. Visualizado en un gel acrilamida al 12,5%. Las carrileras corresponden a 1: cambio conformacional *a*, variante normal, control negativo; 2: cambio conformacional *b*, control heterocigótico para el polimorfismo p.L456V (C-1); 3: cambio conformacional *c*, control homocigótico para el polimorfismo p.L456V (C-2); 4: cambio conformacional *c*, homocigótico para el polimorfismo p.L456V; 5: cambio conformacional *b*, heterocigótico para el polimorfismo p.L456V.



**Figura 3** Frecuencia de los cambios conformacionales del exón 3 en porcentaje. Los cambios conformacionales denominados *b* y *c* son pacientes heterocigóticos y homocigóticos para el polimorfismo p.L456V, respectivamente.

manifestaciones mixtas (hepáticas y neurológicas), con el 11%; las neurológicas, con el 9%, y las mixtas (neurológicas y psiquiátricas), con el 2% (tabla 1).

En cuatro pacientes con el polimorfismo p.L456V se identificó la presencia de los anillos de Kayser Fleischer, lo que representa el 6,3% de los pacientes que se estudiaron, y 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.

**Tabla 1** Principales manifestaciones clínicas presentes en pacientes cubanos que presentan el polimorfismo p.L456V

Polimorfismo L456V	H	N	H y N	N y P
L456V	50	6	7	1

H: manifestaciones hepáticas; N: manifestaciones neurológicas; H y N: manifestaciones hepáticas y neurológicas; N y P: manifestaciones neurológicas y psiquiátricas.

## Discusión y conclusiones

La edad de los pacientes con el polimorfismo p.L456V es similar a lo informado en la literatura internacional<sup>1</sup>.

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

Se informan más de 120 polimorfismos en el gen *atp7b* en pacientes con la enfermedad de Wilson<sup>2</sup>. En Cuba se comienza a realizar la detección del polimorfismo p.L456V en el año 2007, en el Centro Nacional de Genética Médica. Un paso previo a la búsqueda de las mutaciones y los polimorfismos en este gen es la detección de los cambios conformacionales mediante la utilización de la técnica de SSCP. El polimorfismo p.L456V se determinó por comparación de las corridas electroforéticas mediante la técnica de SSCP de controles positivos heterocigóticos y homocigóticos del polimorfismo p.L456V con el producto que se obtuvo de la técnica de PCR del exón 3 del gen *atp7b* de las muestras de los pacientes cubanos que se analizaron.

La frecuencia del polimorfismo p.L456V en dos investigaciones en China son similares a nuestro estudio (no hay diferencias estadísticamente significativas), y como se esperaba, mayor del 1%. Hay diferencias estadísticamente significativas al comparar nuestros resultados con los de Egipto, la India, Irán y Taiwán, y la posible explicación es el origen étnico de la población cubana. Como se aprecia en la tabla 2, el resultado que se obtuvo en esta investigación es la segunda mayor frecuencia informada al compararlo con los países que se analizaron. En estudios posteriores se investigará el impacto del polimorfismo p.L456V en los pacientes cubanos con diagnóstico molecular de EW. Es interesante ver que la frecuencia de este polimorfismo es muy baja en la India (1,8%), donde se comporta como una variante rara.

**Tabla 2** Frecuencias por países del polimorfismo p. L456V en pacientes que presentan diagnóstico clínico de la EW

Países	Frecuencia	Referencias	Probabilidad	Error estándar
Cuba	41%			4,7
Egipto	12,5%	5	p < 0,001	4,7
China	42%	9	NS	4,7
	49,3%	3	NS	4,7
	64%	12	p < 0,001	4,7
India	1,8%	10	p < 0,001	4,7
Irán	23%	11	p < 0,001	4,7
Taiwán	25%	4	p < 0,001	4,7



Hay investigaciones en varios países que realizaron el estudio molecular en pacientes con EW y no informan la presencia de este polimorfismo<sup>9,10</sup>. En Turquía, la variante p.L456V no se identificó; sin embargo, se halló en el exón 3 (exón donde se localiza el polimorfismo p.L456V) otro polimorfismo, el p.V446L<sup>11</sup>.

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 con EW<sup>12-13</sup>. Sin embargo, el médico que atiende al paciente con sospecha de EW siempre debe hacer un minucioso diagnóstico clínico y debe tener en cuenta los criterios que se establecen a nivel mundial<sup>14</sup>.

En diferentes países se ha identificado el polimorfismo p.L456V, aunque no informan las frecuencias<sup>5,15</sup>, por lo que no se pueden comparar los resultados obtenidos con esta investigación y en algunos casos no construyen los haplotipos con el uso de diferentes SNP determinados en sus investigaciones y desaprovechan la oportunidad de ampliar el diagnóstico molecular.

Aun cuando se determinan nuevas mutaciones<sup>16-19</sup> y se realizan técnicas de microarrays<sup>20</sup>, en países en vías de desarrollo es necesario y que se estudien enfermedades genéticas por biología molecular y que se incorpore la búsqueda de polimorfismos, para prestar el servicio de diagnóstico molecular por métodos indirectos en enfermedades donde presentan un número considerable de exones y pocas mutaciones frecuentes.

En Cuba se trabaja en el establecimiento de la estrategia para el diagnóstico molecular de la EW. Se tiene experiencia por este equipo de trabajo en la identificación de polimorfismos en los exones 10<sup>21</sup> y 13<sup>22,23</sup> y en el intrón 9<sup>24</sup>. Con los polimorfismos que ya se detectaron y con este, en los pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de EW podrán realizarse de haplotipos en las familias cubanas con esta enfermedad, así como la realización del diagnóstico molecular por métodos indirectos. En diferentes países, además de detectar el polimorfismo p.L456V, se informan diversas mutaciones para el establecimiento del diagnóstico molecular de la EW, por ejemplo en China<sup>25,26</sup>, en la India<sup>27</sup> y en Irán<sup>28</sup>, lo cual posibilita el diagnóstico molecular por métodos indirectos y directos, y realizan sus estrategias en aras de mejorar la calidad de vida de los pacientes con EW.

En relación con el origen étnico de la población cubana, es importante señalar que las Islas del Caribe, incluyendo Cuba, fueron las primeras habitadas por meso-americanos y, más tarde, por amerindios, que algunos investigadores plantean que provenían de Venezuela<sup>29,30</sup>. Se estima que a la llegada de los españoles existían en la isla más de 100.000 habitantes. En los primeros 50 años tras la Conquista, esta población se redujo a unos 5.000 individuos. Los colonizadores españoles extinguieron la población amerindia y comenzaron a trasladar aborígenes desde Norteamérica y Mesoamérica hacia Cuba, y a esclavos desde la costa occidental de África, e introdujeron los negros esclavos del Este de África y del África subsahariana, por lo que la composición genética de la población cubana es resultado, fundamentalmente, de la mezcla de españoles caucásicos y negros africanos<sup>31,32</sup>. La inmigración española se mantuvo constante desde finales del siglo xv hasta la primera

mitad del siglo xx. La historia del mestizaje étnico que por casi cinco siglos tuvo lugar entre esos tres grupos originarios (nativos americanos, europeos y africanos) ha creado la estructura genética de la población cubana actual. La contribución promedio de genes de origen europeo, africano y nativo americano en los individuos estudiados fue del 72, del 20 y del 8%, respectivamente<sup>32</sup>. Se observó que en la distribución de las mutaciones en el gen *atp7b* responsables de la EW tiene un papel importante la etnicidad<sup>33</sup>. En un futuro sería útil estudiar las mutaciones y polimorfismos de este gen en el continente americano y evaluar el papel de la etnicidad en la presencia de los mismos y en la susceptibilidad a la enfermedad.

En conclusión, se dispone de una herramienta molecular para la introducción del diagnóstico molecular en pacientes con EW en Cuba. La metodología puede ser utilizada en otras poblaciones con un perfil genético similar al de Cuba.

## Responsabilidades éticas

### Protección de las personas y los animales

Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

## Financiamiento

No se recibió apoyo financiero en relación con este artículo.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses potencial relevante para el artículo de ninguna índole.

## 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, a Georgios Loudianos por el envío de controles positivos, al Dr. Carlos Castañeda por sus aportes en el diagnóstico clínico de la enfermedad.

## Referencias

1. Kumar SS, Kurian G, Roberts EA. Genetics of Wilson's disease: A clinical perspective. *Indian J Gastroenterol.* 2012;31:285-93.

2. Kenney SM, Cox DW. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat.* 2007;28:1171–7.
3. Wang LH, Huang YQ, Shang X, et al. Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: Identification of 10 novel mutations and its clinical correlation. *J Hum Genet.* 2011;56:660–5.
4. Lin CW, Er TK, Tsai FJ, et al. Development of a high-resolution melting method for the screening of Wilson disease-related ATP7B gene mutations. *Clinica Chimica Acta.* 2010;411:1223–31.
5. Tawhida A, Solaf E, Ezzat E, et al. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *J Hum Genet.* 2008;53:681–7.
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.* 2014;58:59–65.
7. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86:2766–70.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
9. Tomic A, Dobričić V, Novaković I, et al. Mutational analysis of ATP7B gene and the genotype-phenotype correlation in patients with Wilson's disease in Serbia. *Vojnosanit Pregl.* 2013;70:457–62.
10. Tawhida A, Elsayed S, Elnaghy S, et al. Phenotype and genetic characterization of a cohort of pediatric Wilson disease patients. *BMC Pediatrics.* 2011;11:56.
11. Ozlenen P, Sezin A, Orhan T. Clinical and genetic analysis of pediatric patients with Wilson disease. *Turk J Gastroenterol.* 2015;26:397–403.
12. Bennett J, Hahn SH. Clinical molecular diagnosis of Wilson disease. *Semin Liver Dis.* 2011;31:233–8.
13. Jeong KS. Diagnosis of Wilson disease in Young children: Molecular genetic testing and a paradigm shift from laboratory diagnosis. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2012;15:197–209.
14. Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W, et al. EASL clinical practice guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol.* 2012;56:671–85.
15. Ljubić H, Kalauz M, Telarović S, et al. ATP7B gene mutations in Croatians patients with Wilson Disease. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2016;20:112–7.
16. El-Mougya F, Sharafa S, Elsharkawya M, et al. Gene mutations in Wilson disease in Egyptian children: Report on two novel mutations. *Arab J Gastroenterol.* 2014;15:114–8.
17. Hofer H, Willheim-Polli C, Knoflach P, et al. Identification of a novel Wilson disease gene mutation frequent in Upper Austria: A genetic and clinical study. *J Hum Genet.* 2012;57:564–7.
18. Hua R, Hua F, Jiao Y, et al. Mutational analysis of ATP7B in Chinese Wilson disease patients. *Am J Transl Res.* 2016;8:2851–61.
19. Hussein H, Jabbar A. Mutations analysis in Iraqi patients with Wilson's disease: Identification of four novel mutations. *Wasit J Sci Med.* 2014;7:149–58.
20. Gupta A. Low-density oligonucleotide microarrays — A major step in Wilson's disease diagnosis. *Indian J Med Res.* 2015;141:145–7.
21. Clark Y, Ruenes C, García E, et al. Identificación del polimorfismo K832R en pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 2013;12:197–202.
22. Clark Y, Ruenes C, García E, et al. Identificación del polimorfismo c.2448-25G>A en pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. *Revista MEDISUR.* 2015;13:617–21.
23. Clark Y, Ruenes C, García E, et al. Study of T991T polymorphism in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease. *Biocología Aplicada.* 2016;33:3221–4.
24. Clark Y, Ruenes C, García E, et al. p.K832R and p. T991T polymorphisms' analysis in Cuban patients with clinical diagnosis of Wilson's disease. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 2017;16:167–75.
25. Wu ZY, Wang N, Lin MT, et al. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in Chinese patients with Wilson disease. *Arch Neurol.* 2001;58:971–6.
26. Rui H, Fang H, Yonggeng J, et al. Mutational analysis of ATP7B in Chinese Wilson disease patients. *Am J Transl Res.* 2016;8:2851–61.
27. Gupta A, Maulik M, Nasipuri P, et al. Molecular diagnosis of Wilson disease using prevalent mutations and informative single-nucleotide polymorphism markers. *Clin Chem.* 2007;53:1601–8.
28. Zali N, Mohebbi S, Esteghamat S, et al. Prevalence of ATP7B gene mutations in Iranian patients with Wilson disease. *Hepat Mon.* 2011;11:890–4.
29. García C, Barrios L, Ramírez P, et al. Origen y composición genética de la población cubana. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2011;27:273–82.
30. Ulloa J. Archaeology and rescue of the aboriginal presence in Cuba and the Caribbean. *KACIKE: Journal of Caribbean Amerindian History and Anthropology.* 2002:1–11.
31. Alegre R, Moscoso J, Martínez J, et al. HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles. *Mol Immunol.* 2007;44:2426–35.
32. Marcheco B, Parra EJ, Fuentes E, et al. Cuba: Exploring the history of admixture and the genetic basis of pigmentation using autosomal and uniparental markers. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004488.
33. Gomes A, Dedoussis G. Geographic distribution of ATP7B mutations in Wilson disease. *Ann Hum Biol.* 2016;43:1–8.