



MediSur

ISSN: 1727-897X

Facultad de Ciencias Médicas de Cienfuegos, Centro
Provincial de Ciencias Médicas Provincia de Cienfuegos.

Clark Feoktistova, Yulia; Ruenes Domech, Caridad; García Bacallao, Elsa
F.; Feoktistova, Liudmila; Roblejo Balbuena, Hilda; Morales Peralta, Estela
Detección del polimorfismo p.K952L en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson
MediSur, vol. 19, núm. 6, 2021, pp. 917-923
Facultad de Ciencias Médicas de Cienfuegos, Centro
Provincial de Ciencias Médicas Provincia de Cienfuegos.

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180071523004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEH
redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección del polimorfismo p.K952L en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson

P.K952L polymorphism detection in Cuban patients with Wilson's disease

Yulia Clark Feoktistova¹  Caridad Ruenes Domech²  Elsa García Bacallao²  Liudmila Feoktistova Victorova¹ 
Hilda Roblejo Balbuena³  Estela Morales Peralta⁴ 

¹ Universidad de Guantánamo, Cuba

² Instituto Nacional de Gastroenterología, La Habana, La Habana, Cuba

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

⁴ Hospital Ginecobstétrico Universitario 10 de Octubre, La Habana, La Habana, Cuba

Cómo citar este artículo:

Clark-Feoktistova Y, Ruenes-Domech C, García-Bacallao E, Feoktistova-Victorova L, Roblejo-Balbuena H, Morales-Peralta E. Detección del polimorfismo p.K952L en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson. **Medisur** [revista en Internet]. 2021 [citado 2021 Dic 6]; 19(6):[aprox. -917 p.]. Disponible en: <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4993>

Resumen

Fundamento: La enfermedad de Wilson es una entidad rara con patrón de herencia autosómico recesivo, a causa de las mutaciones en el gen *ATP7B*, lo cual provoca la acumulación de cobre en tejidos y órganos. En la literatura se informan más de 800 polimorfismos.

Objetivo: identificar el polimorfismo p.K952L en los pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de enfermedad de Wilson.

Métodos: se realizó un estudio descriptivo, en el Centro Nacional de Genética Médica y el Instituto Nacional de Gastroenterología, que incluyó 35 pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. La extracción del ADN fue por la técnica de precipitación salina; y la amplificación del fragmento de interés, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Además, se empleó la técnica de Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena para la determinación de los cambios conformacionales y la presencia del polimorfismo p.K952L.

Resultados: en el exón 12 se identificaron los cambios conformacionales denominados *b* y *c*, que correspondieron al polimorfismo p.K952L en estado heterocigótico y homocigótico, respectivamente. La frecuencia alélica del polimorfismo p.K952L fue de 38,6 %.

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

Conclusión: se identificó el polimorfismo p.K952L en 21 pacientes cubanos con diagnóstico clínico de enfermedad de Wilson, lo cual posibilita ampliar los estudios moleculares por métodos indirectos.

Palabras clave: Degeneración hepatolenticular, trastornos de la coagulación sanguínea, polimorfismo genético, genética, patología molecular

Abstract

Background: Wilson's disease is a rare entity with an autosomal recessive inheritance pattern, due to mutations in the *ATP7B* gene, which causes the accumulation of copper in tissues and organs. More than 800 polymorphisms are reported in the literature.

Objective: to identify the p.K952L polymorphism in Cuban patients with a presumptive clinical diagnosis of Wilson's disease.

Methods: a descriptive study was carried out at the Medical Genetics National Center and the Gastroenterology National Institute, which included 35 patients with a Wilson's disease clinical diagnosis. DNA extraction was by saline precipitation technique; and the amplification of the fragment of interest, by means of the Polymerase Chain Reaction technique. In addition, the Simple Chain Conformational Polymorphism technique was used to determine the conformational changes and the presence of the p.K952L polymorphism.

Results: in exon 12 the conformational changes called *b* and *c* were identified, which corresponded to the polymorphism p.K952L in the heterozygous and homozygous state, respectively. The allelic frequency of the p.K952L polymorphism was 38.6%. The most frequent manifestations in patients with this polymorphism were liver.

Conclusion: The p.K952L polymorphism was identified in 21 Cuban patients with a clinical diagnosis of Wilson's disease, which makes it possible to extend molecular studies by indirect methods.

Key words: Hepatolenticular degeneration genes, blood coagulation disorders, polymorphism, genetic, genetic, pathology, molecular

Aprobado: 2021-03-30 21:56:58

Correspondencia: Yulia Clark Feoktistova. Universidad de Guantánamo. Guantánamo feoktistova@cug.co.cu

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Wilson (EW, MIM 277 900) presenta un patrón de herencia autosómico recesivo. Se caracteriza por la acumulación de cobre en diferentes órganos, tales como, hígado, cerebro, córnea, riñones, entre otros. En Cuba, existe experiencia en el diagnóstico clínico de la EW, el cual se realiza por un equipo multidisciplinario conformado por gastroenterólogos, genetistas, neurólogos, oftalmólogos, nefrólogos, psiquiatras, bioquímicos, hepatólogos, entre otros. La expresión clínica es muy variable, y en ocasiones dificulta el diagnóstico de esta enfermedad.⁽¹⁾

La causa molecular que provoca la EW son las mutaciones en el gen *ATP7B*, el cual codifica para la proteína ATP7B, transportadora de cobre en el hepatocito. Se han identificado más de 800 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *ATP7B*.⁽²⁾ El estudio molecular permite el diagnóstico de la EW.^(3,4)

En el exón 12 del gen *ATP7B* se identificó el polimorfismo p.K952L en diversos países, tales como, China,⁽⁵⁾ Rusia,⁽⁶⁾ Taiwán,⁽⁷⁾ entre otros. Este polimorfismo es consecuencia de un cambio del aminoácido Arginina por Lisina en la posición 932 de la proteína ATP7B. Además, se utiliza para realizar haplotipos en familias donde haya, al menos, un paciente con diagnóstico clínico certero de la EW, lo que permite la realización del diagnóstico molecular en estos.^(2,8)

Es objetivo de este estudio detectar el polimorfismo p.K952L en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la EW.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, en el Centro Nacional de Genética Médica (Centro Colaborador de la OMS para el desarrollo de enfoques genéticos en la promoción de salud), resultado del trabajo conjunto de este, el Instituto de Gastroenterología y la Universidad de Guantánamo, durante el período 2013-2016. Fueron incluidos 35 pacientes (14 mujeres y 21 hombres) con diagnóstico clínico presuntivo de la EW, los cuales asistieron a las consultas en el Instituto Nacional de Gastroenterología. Los pacientes dieron su consentimiento para participar en la investigación, de acuerdo con los principios éticos de la declaración de Helsinki. Se contó con la aprobación por el Consejo Científico y el Comité de Ética del Centro Nacional de

Genética Médica y el Instituto de Gastroenterología.

Las variables analizadas fueron: frecuencia alélica del polimorfismo p.K952L, cambio conformacional *a* para la variante normal, cambio conformacional *b* para la presencia del polimorfismo p.K952L en estado heterocigótico y el cambio conformacional *c* en estado homocigótico. Las manifestaciones clínicas fueron clasificadas en: hepáticas, neurológicas, psiquiátricas y sus respectivas combinaciones.

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

Para la detección de cambios conformacionales y la identificación del polimorfismo p.K952L, se seleccionó el exón 12 del gen *ATP7B*. Se tomó a los pacientes una muestra de sangre y se extrajo el ADN mediante el método de precipitación salina⁽⁹⁾ a partir de 10 mL de sangre periférica con ácido etildiaminotetraacético, EDTA, (56 mg/mL).

Las condiciones para la amplificación del exón 12 mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fueron: 100 ng de ADN, 12 (F) 5'-TCATAGGTTGTAATTTCCCATG-3' y 12 (R) 5'-CAGGATCAATGTCAGTAGATTAT-3', 1mM de dNTPs (Boehringer), 10X tampón PCR, 15mM de MgCl₂, 0,25U de Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen de 25 µL.

Posteriormente, se realizó la electroforesis por la técnica Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena (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 el gel de acrilamida comercial (GeneGel Excel 12,5/24 Kit).

La visualización del ADN de interés se realizó siguiendo las instrucciones del juego comercial *kit PlusOne DNA Silver Staining* (Amersham Biosciences, EUA).

El polimorfismo p.K952L se determinó por comparación de las corridas electroforéticas mediante la técnica de SSCP. Se analizaron los controles positivos heterocigóticos y

homocigóticos del polimorfismo p.K952L con el producto amplificado obtenido por PCR del exón 12 del gen *ATP7B*. Las condiciones de las corridas electroforéticas fueron: 450 V de voltaje, 15 W de potencia, 10°C de temperatura y 3 horas de tiempo de corrida.

Los controles de las muestras de ADN de pacientes heterocigóticos y homocigóticos utilizados fueron enviados de los laboratorios *Ospedale Regionale per le Microcitemie, Cagliari*, de Italia.

Se informó la media $\pm$ DE (desviación estándar) de la edad de los pacientes en años. Se determinó la frecuencia y porcentaje del polimorfismo p.K952L como: número de alelos presentes en el polimorfismo p.K952L/Número total de alelos totales. Para analizar si había o no diferencias significativas con lo informado en otras poblaciones, se aplicó la prueba del Chi-cuadrado.

El análisis descriptivo se llevó a cabo mediante estadígrafos de tendencia central (media

aritmética) y de dispersión (mínimo, máximo, desviación estándar e intervalos de confianza del 95 %).

RESULTADOS

La edad de inicio en los 35 pacientes estudiados con la EW fue 26,4 años con una desviación estándar de 11 años. El intervalo fue de 6 años (mínimo) y 39 años (máximo).

La edad de inicio en los 21 pacientes cubanos que presentaron el polimorfismo p.K952L fue 30,45 años, con una desviación estándar de 11 años. El intervalo fue de 7 años (mínimo) y 39 años (máximo).

Se detectó el cambio conformacional *b* en 15 pacientes, el cambio conformacional *c* en 6 y el cambio conformacional *a* en 14 individuos. Los cambios conformacionales *a*, *b* y *c* correspondieron a la variante salvaje, estado heterocigótico y homocigótico para el polimorfismo p.K952L, respectivamente. (Tabla 1).

Tabla 1- Distribución genotípica del polimorfismo p.K952L en pacientes cubanos con EW

Polimorfismo	Genotipo	Pacientes	Cambio conformacional	Estado
p.K952L	G/G	14	a	Variante salvaje
	G/A	15	b	Heterocigótico
	A/A	6	c	Homocigótico

De los 35 pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la EW, se identificaron 15 pacientes heterocigóticos (43 %) y seis homocigóticos (17 %) para el polimorfismo

p.K952L. La variante salvaje se detectó en el 40 % de los individuos estudiados. La presencia del polimorfismo p.K952L representó el 60 % del total de pacientes. (Fig. 1).

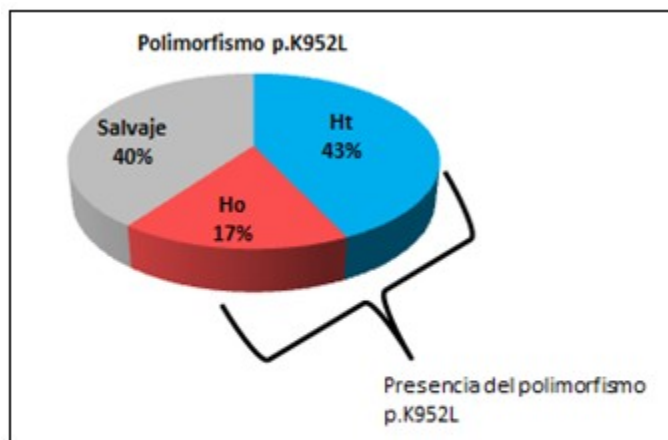


Fig. 1- Frecuencia de la presencia del polimorfismo p.K952L y la variante salvaje. Ht: Heterocigótico y Ho: Homocigótico.

La frecuencia alélica del polimorfismo p.K952L fue de 38,6 %. (Tabla 2).

Tabla 2- La frecuencia alélica del polimorfismo p.K952L en poblaciones estudiadas.

País	Frecuencia alélica	Referencias	Probabilidad	Error Estándar
Cuba	38,6 %			
China	59,7 %	5	$p < 0.001$	4,6
	33,3 %	10	NS	
Rusia	47 %	6	NS	
Irán	26 %	11	NS	

Entre las principales manifestaciones clínicas en los pacientes que presentaron el polimorfismo p.K952L, fueron más frecuentes las hepáticas (82,9 %), seguidas de las manifestaciones mixtas: hepáticas y neurológicas (8,6 %). (Tabla 3).

Tabla 3- Distribución de pacientes que presentan el polimorfismo p.K952L según manifestaciones clínicas

Polimorfismo	Hepáticas		Neurológicas		Hepáticas y neurológicas		Hepáticas y psiquiátricas	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
p.K952L	29	82,9	2	5,7	3	8,6	1	2,9

Se identificó en un paciente (2,9 %) homocigótico con el polimorfismo p.K952L, la presencia de los anillos de Kayser Fleischer; precisamente uno de los que presentó manifestaciones hepáticas y neurológicas. Estos anillos constituyen un criterio de diagnóstico clínico de la EW.

DISCUSIÓN

El polimorfismo p.K952L se encuentra localizado en el quinto segmento de transmembrana TM5 de la proteína ATP7B. Esta variante polimórfica no afecta la función de la proteína transportadora de cobre en humanos, y se identifica en diversas poblaciones con una frecuencia mayor que el 1 %.^(5,6,7)

La frecuencia del polimorfismo p.K952L obtenida en este estudio es similar a la observada en uno de los estudios realizados en China,⁽¹⁰⁾ sin que existan diferencias significativas; y como se esperaba, es mayor que el 1 %. En la otra investigación informada en China⁽⁵⁾ hubo diferencias significativas y dos de las causas pudiera ser el origen étnico de la población y el número de muestras. En estudios posteriores, se analizará el impacto de este polimorfismo en los pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de la EW. En otros países, como Bulgaria,⁽¹²⁾ y Taiwán⁽¹³⁾ presentan este polimorfismo, pero no informan la frecuencia, por lo que no es posible comparar con sus resultados.

Para el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas que posean uno o más genes con un número elevado de exones, se requiere de una tecnología de avanzada, que garantice el éxito del mismo. En el caso del gen ATP7B, posee 21 exones; el diagnóstico molecular se complejiza debido a la variedad de exones a estudiar, y la frecuencia de las mutaciones es baja. En la actualidad con el avance de la tecnología existen diversos estudios moleculares en los pacientes con la EW.^(3,14,15,16,17,18) Sin embargo, hay que tener en cuenta que el médico que atiende al paciente con sospecha de EW, siempre debe hacer un minucioso diagnóstico clínico.⁽³⁾

En Cuba se han identificado mutaciones como p.L708P,^(19,20) y p.N41S,⁽²¹⁾ que han permitido el diagnóstico molecular de algunos pacientes. Sin embargo, una alternativa para el diagnóstico de la EW puede, ser el diagnóstico molecular por métodos indirectos, con la utilización de los polimorfismos. En tal sentido, se propone la utilización de los siguientes polimorfismos en los pacientes cubanos p.K832R,⁽²²⁾ p.L456V,⁽²³⁾ p.T991T⁽²²⁾ y p.K952L, para los estudios indirectos

e incorporarlos en el diagnóstico molecular.

Se concluye, una vez identificado el polimorfismo p.K952L en el 60 % de los pacientes estudiados, que se dispone de una nueva herramienta molecular para ampliar el diagnóstico molecular de la EW en Cuba por métodos indirectos.

Los autores agradecen a los pacientes por participar en este estudio, así como a la DrC. Teresa Collazo, por sus aportes a la investigación; a Lídice Reyes, por realizar la extracción de ADN; al Ministerio de Salud Pública; al DrC. Georgios Loudianos y al DrC. Theodor Todorov, por el envío de controles positivos.

Conflicto de interés:

No existe conflicto de interés.

Contribución de los autores:

Conceptualización: Yulia Clark Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa F García Bacallao

Curación de datos: Yulia Clark Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa F García Bacallao

Análisis formal: Yulia Clark Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa F García Bacallao

Investigación: Yulia Clark Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa F García Bacallao, Hilda Roblejo Balbuena, Liudmila Feoktistova Victorova, Estela Morales Peralta

Metodología: Yulia Clark Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa F García Bacallao, Hilda Roblejo Balbuena, Liudmila Feoktistova Victorova, Estela Morales Peralta

Visualización: Yulia Clark Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa F García Bacallao, Hilda Roblejo Balbuena, Liudmila Feoktistova Victorova, Estela Morales Peralta

Administración del proyecto: Yulia Clark Feoktistova

Supervisión: Yulia Clark Feoktistova y Caridad Ruenes Domech

Validación: Yulia Clark Feoktistova y Caridad Ruenes Domech

Redacción-borrador original: Yulia Clark

Feoktistova, Caridad Ruenes Domech, Elsa F García Bacallao, Hilda Roblejo Balbuena, Liudmila Feoktistova Victorova, Estela Morales Peralta

Redacción-revisión y edición: Yulia Clark Feoktistova y Liudmila Feoktistova Victorova.

Financiación:

Centro Nacional de Genética Médica e Instituto Nacional de Gastroenterología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hedera P. Update on the clinical management of Wilson's disease. *Appl Clin Genet*. 2017 ; 10: 9-19.

2. McCann C, Jayakanthan S, Siotto M, Yang N, Osipova M, Squitti R, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human ATP7B gene modify the properties of the ATP7B protein. *Metallomics*. 2019 ; 11 (6): 1128-39.

3. Espinós C, Ferenci P. Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice?. *JHEP Reports*. 2020 ; 2 (4): 100114.

4. Wallace DF, Dooley JS. ATP7B variant penetrance explains differences between genetic and clinical prevalence estimates for Wilson disease. *Hum Genet*. 2020 ; 139 (8): 1065-75.

5. 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*. 2016 ; 8 (6): 2851-61.

6. Kudryavtsev A, Gornostaeva E, Voevoda M, Maximov V, Krovalenko S. The frequency of mutations in the ATP7B gene in Russia. *Meta Gene*. 2017 ; 13: 173-6.

7. Chin L, Tze E, Fu T, Ta L, Pang S, Jan 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.

8. 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*. 2015 ; 58 (2): 59-65.

9. 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.

10. Cong L, Lin Q, Wen H, Chi T. New mutations and polymorphisms of the ATP7B gene in sporadic Wilson disease. *Eur J Med Genet*. 2014 ; 57 (9): 498-502.

11. Zali N, Mohebbi S, Esteghamat S, Chiani M, Haghighi M. Prevalence of ATP7B gene mutations in Iranian patients with Wilson disease. *Hepat Mon*. 2011 ; 11 (11): 890-4.

12. Todorov T, Savov A, Jeleu H, Panteleeva E, Konstantinova D, Krustev Z, et al. Spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population. *Clin Genet*. 2005 ; 68 (5): 474-6.

13. Chang T, Fuu T, Jer W, Jang C, Cheng L, Shuan L. Mutation Analysis of Wilson Disease in Taiwan and Description of Six New Mutations. *Hum Mutat*. 1998 ; 12 (6): 370-6.

14. Roy S, McCann C, Ralle M, Ray K, Ray J, Lutsenk S, Jayakanthan S. Analysis of Wilson disease mutations revealed that interactions between different ATP7B mutants modify their properties. *Sci Rep*. 2020 ; 10: 13487.

15. Shim J, Yang H, Moon J, Chang J, Ko J, Park S, et al. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Analysis Subsequent to Direct DNA Full Sequencing for Identifying ATP7B Mutations and Phenotype Correlations in Children with Wilson Disease. *J Korean Med Sci*. 2018 ; 33 (26): e177.

16. Tuan L, Tue T, Nga H, Quoc D, Tu C, Huy T, et al. Genetic analysis of 55 northern Vietnamese patients with Wilson disease: seven novel mutations in ATP7B. *J Genet*. 2017 ; 96 (6): 933-9.

17. Collet C, Laplanche JL, Page J, Morel H, Woimant F, Poujois A. High genetic carrier frequency of Wilson's disease in France: discrepancies with clinical prevalence. *BMC Med Genet*. 2018 ; 19 (1): 143.

18. Kumari N, Kumar A, Thapa B, Modi M, Pal A, Prasad R. Characterization of mutation spectrum and identification of novel mutations in ATP7B gene from a cohort of Wilson disease patients: Functional and therapeutic implications. *Hum Mutat*. 2018 ; 39 (12): 1926-41.

19. Clark Y, Collazo T, Ruenes C, García E,

Robaina Z, Fragoso T, et al. Detection of conformational shift and mutation in the exon 8 of the atp7b gene in Cubans patients with Wilson disease. Biotechnol Apl [revista en Internet]. 2011 [cited 17 Sep 2020] ; 28 (2): [aprox. 9p]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522011000200004.

20. Feoktistova L, Ruenes C, García E, Roblejo H, Morales E, Clark Y. Coagulation disorders in Cuban patients with a clinical diagnosis of Wilson's disease. Medisur [revista en Internet]. 2020 [cited 17 Sep 2020] ; 18 (2): [aprox. 10p]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2020000200171&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

21. Clark Y, Collazo T, Ruenes C, García B, García E, Robaina Z, Fragoso T. Molecular analysis in the exon 2 of atp7b gene in cubans patients with Wilson disease. Rev Haban Cienc Méd [revista en Internet]. 2011 [cited 17 Sep 2020] ; 10 (3):

[aprox. 6p]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2011000300004.

22. Clark Y, Ruenes C, García E, Roblejo H, Robaina Z, Morales E. p. K832R and p. T991T en los polimorfismos p. K832R y p. T991T en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson. Rev Haban Cienc Méd [revista en Internet]. 2017 [cited 17 Sep 2020] ; 16 (2): [aprox. 11p]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2017000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=en.

23. Clark Y, Ruenes C, García EF, Roblejo H, Clark I, Jay O, Collazo T. Polimorfismo p.L456V, presencia en pacientes cubanos con diagnóstico clínico presuntivo de la enfermedad de Wilson. Rev Gastroenterol Mex [revista en Internet]. 2019 [cited 17 Sep 2020] ; 84 (2): [aprox. 12p]. Available from: <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-polimorfismo-p-l456v-presencia-pacientes-cubanos-articulo-S0375090618300946>.