

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana  
Centro Nacional de Genética Médica  
Centro Colaborador de la OMS para el Desarrollo de Enfoques Genéticos en la  
Promoción de Salud

## **Identificación del polimorfismo k832r en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson**

### **Identification of the k832r polymorphism in patients with clinical diagnosis of Wilson's disease**

**Yulia Clark Feoktistova<sup>I</sup>, Caridad Ruenes<sup>II</sup>, Elsa F. García Bacallao<sup>III</sup>, Teresa Collazo Mesa<sup>IV</sup>, Zoe Robaina Jiménez<sup>V</sup>, Carlos Castañeda<sup>VI</sup>, Hilda Roblejo<sup>VII</sup>**

<sup>I</sup> *Master* en Ciencias en Bioquímica. Mención Biología Molecular. Aspirante a Investigador. [yulia.clark@cngen.sld.cu](mailto:yulia.clark@cngen.sld.cu)

<sup>II</sup> Especialista Primer Grado de Medicina General Integral. Especialista Segundo Grado en Gastroenterología. Investigador Agregado. Instructor. [ruenes@infomed.sld.cu](mailto:ruenes@infomed.sld.cu)

<sup>III</sup> Especialista Segundo Grado en Gastroenterología. Auxiliar. Investigador Agregado. [egarcia@infomed.sld.cu](mailto:egarcia@infomed.sld.cu)

<sup>IV</sup> Doctor en Ciencias de La Salud. Investigador Auxiliar. [tcollazo@infomed.sld.cu](mailto:tcollazo@infomed.sld.cu)

<sup>V</sup> Especialista Primer Grado de Medicina General Integral. Especialista Segundo Grado en Genética Clínica. [zoerobaina-2009@yahoo.es](mailto:zoerobaina-2009@yahoo.es)

<sup>VI</sup> Especialista Segundo Grado en Gastroenterología. [casta@infomed.sld.cu](mailto:casta@infomed.sld.cu)

<sup>VII</sup> Especialista primer Grado en Genética Clínica. [hilda.roblejo@infomed.sld.cu](mailto:hilda.roblejo@infomed.sld.cu)

---

## **RESUMEN**

**Introducción:** la enfermedad de Wilson se caracteriza por la acumulación de cobre fundamentalmente en el hígado. 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 varios polimorfismos en el gen *atp7b*.

**Objetivo:** identificar el polimorfismo K832R en 100 pacientes cubanos diagnosticados clínicamente con la Enfermedad de Wilson.

**Material y Métodos:** en el presente estudio se empleó la técnica de cribaje: Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena para la determinación de cambios conformacionales en el exón 10. Se utilizó la Técnica de Secuenciación para la identificación del polimorfismo K832R.

**Resultados:** se detectaron tres cambios conformacionales diferentes denominados: a, b y c. El cambio conformacional b y c correspondió al polimorfismo K832R en estado heterocigótico y homocigótico respectivamente. La frecuencia alélica del polimorfismo K832R en 100 pacientes cubanos diagnosticados clínicamente con la Enfermedad de Wilson es de 35%.

**Conclusiones:** se identificó por primera vez en Cuba el polimorfismo K832R y posibilitará hacer estudios moleculares por métodos indirectos.

**Palabras clave:** Enfermedad de Wilson, polimorfismo K832R, SSCP, secuenciación, gen atp7b.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Wilson's disease is characterized by accumulation of copper in liver, brain and cornea. It is an autosomal recessive inherited disorder of copper metabolism. The molecular causes are mutations in the atp7b gene. It has been reported in the literature several polymorphisms in the atp7b gene.

**Objective:** this research aims to identify the polymorphism K832R in 100 Cubans patients with clinical diagnosis of Wilson's disease.

**Materials and Methods:** in this study we used the technique of screening: single stranded conformational polymorphism for the determination of conformational shifts in exon 10. We used sequencing technique for identifying the K832R polymorphism.

**Results:** they identified three different conformational shifts denominated: a, b and c. The shifts b and c corresponded to polymorphism K832R in heterozygous and homozygous state respectively. The frequency of this polymorphism K832R is 35% in 100 Cubans patients.

**Conclusions:** the polymorphism K832R was identified first in Cuba and it will make possible molecular studies by indirect methods.

**Key words:** Wilson disease, K832R polymorphism, SSCP, sequencing, atp7b gene.

---

## INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Wilson (EW, MIM 27790) es un trastorno hereditario que presenta un patrón de herencia 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 de esta enfermedad resulta complejo.<sup>1</sup> Se caracteriza por daños en el hígado, que puede ser desde la alteración de los niveles séricos de transaminasas hasta la cirrosis descompensada, incluyendo la hepatitis fulminante.

---

Además los pacientes pueden presentar afectaciones a nivel cerebral; las manifestaciones pueden ser desde temblores hasta la presencia de la Enfermedad de Parkinson. 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 de 380 mutaciones hasta la actualidad.<sup>2</sup> 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.<sup>2</sup>

El polimorfismo K832R se encuentra localizado en el exón 10 del gen *atp7b*.<sup>3</sup> Este polimorfismo se ha identificado en diversas poblaciones, en países como España, China, Japón, Irán e India.<sup>4-10</sup> Se describen pocos estudios moleculares en el gen *atp7b* en América. En un estudio, en el que se analizan pacientes con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson en diferentes Estados de los Estados Unidos y Puerto Rico, se identifica el polimorfismo K832R, aunque no reportaron la frecuencia alélica.<sup>11</sup>

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*).<sup>4</sup>

Considerando que en Cuba no existe el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Wilson nos proponemos como objetivo identificar los cambios conformacionales en el exón 10 y detectar el polimorfismo K832R en el gen *atp7b* de pacientes 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 la familia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En Cuba, no se ha informado la prevalencia de la Enfermedad de Wilson, por lo que la determinación del tamaño muestral se complejiza. El colectivo de autores conformó esta investigación con un tamaño de muestra de 100 pacientes, quienes provienen del Instituto Nacional de Gastroenterología, Centro de referencia nacional (40 mujeres y 60 hombres). Este estudio es una investigación descriptiva transversal que se realizó en el período 2008-2011. La evaluación de los pacientes fue realizada por un equipo multidisciplinario integrado por gastroenterólogos, genetistas, neurólogos y bioquímicos, siguiendo los criterios de diagnóstico de la enfermedad. Los criterios de inclusión son pacientes cubanos diagnosticados clínicamente y bioquímicamente con la Enfermedad de Wilson, quienes ofrecieron su consentimiento para participar en la investigación, de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki. Se seleccionó el exón 10 del gen *atp7b* para la detección de cambios conformacionales y la identificación del polimorfismo K832R. La extracción de ADN se realizó por el método de precipitación salina<sup>12</sup> a partir de 10 ml de sangre periférica con EDTA (56 mg/ml). Las condiciones para la amplificación del exón 10 mediante la técnica de *PCR* (Reacción en Cadena de la Polimerasa) fue 100ng de ADN, 10 pmoles/ml de cada oligonucleótido del exón 10 (E10R: 5´ CAGCTGGCCTAGAACCTGA 3´, E10L: 5´ TATCCTCCT GAGGGAACATG 3´), 1mM de dNTPs (Boehringer), 10X Tampón PCR, 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 1u de Taq polimerasa (Amplicen), en un volumen de 25 µl. Las condiciones fueron descritas previamente.<sup>4</sup> Posteriormente, se realizó la electroforesis *SSCP*. Se aplicó en un gel de acrilamida comercial (GeneGel Excel 12.5/24 Kit). Las condiciones de corrida

fueron 350V de Voltaje, 15W de Potencia, 15 °C de temperatura y 2 horas de tiempo de corrida. Se secuenciaron las muestras de ADN que presentaron cambios conformacionales diferentes a la variante normal, por el Método de Sanger. Se purificó el producto amplificado usando el juego comercial QIAquick PCR Purification (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La corrida electroforética se realizó en el secuenciador semiautomático ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech). Los resultados fueron comparados con la secuencia de ADN de referencia del gen *atp7b* mediante el programa de alineamiento de secuencias BLAST del inglés (*Basic Local Alignment Search Tool*).

## RESULTADOS

Se identificaron tres cambios conformacionales denominados: a, b, y c con el uso de la técnica *SSCP*. El cambio conformacional a correspondió a la variante normal. Las muestras que presentaron los cambios conformacionales b y c se secuenciaron; se obtuvo como resultado la identificación del polimorfismo K832R en estado heterocigótico y homocigótico respectivamente. (Figura). Se detectaron 30 pacientes heterocigóticos y 20 homocigóticos para el polimorfismo K832R. Se identificó este polimorfismo K832R en 50% de los pacientes cubanos analizados.

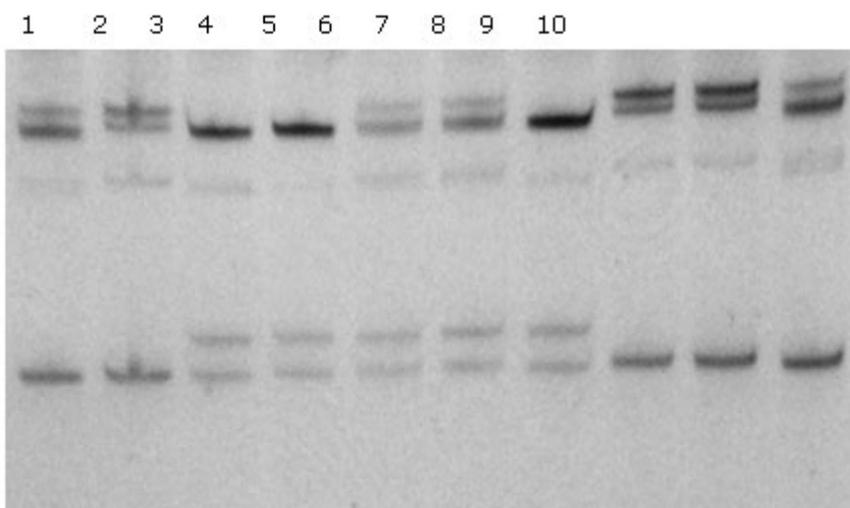


Figura. *SSCP* del exón 10 del gen *atp7b* en pacientes cubanos con la EW. Visualizado en un gel acrilamida a 12,5%. Carrilera 1: Control negativo, cambio conformacional denominado a. Carrileras 2, 8, 9, y 10: Cambio conformacional denominado en pacientes cubanos con la Enfermedad de Wilson. Carrileras 3, 4 y 7: Cambio conformacional denominado c correspondiente al polimorfismo K832R en estado homocigótico en pacientes cubanos con la EW. Carrileras 5 y 6: Cambio conformacional denominado b correspondiente al polimorfismo K832R en estado heterocigótico, en pacientes con la EW.

El polimorfismo 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.

Este polimorfismo no afecta la función de la proteína y se ha identificado en diversas poblaciones con una frecuencia mayor que 1%.<sup>6-10</sup> La frecuencia alélica en los 100 pacientes cubanos estudiados es de 35%.

## DISCUSIÓN

Se han informado más de 139 polimorfismos en el gen *atp7b* en pacientes con la Enfermedad de Wilson.<sup>2</sup> 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 K832R es reportado en diversos países; sin embargo, hay reportes en los cuales no informan la frecuencia alélica. Ejemplo, en España y los Estados Unidos<sup>4-5,11</sup> y en otros sí, como China, Japón, Irán e India.<sup>6-10</sup> (Tabla).

Tabla. Identificación del polimorfismo K832R en diversos países y la frecuencia alélica

Polimorfismo	Frecuencia alélica (%)	País	Referencias
K832R	35,0	Cuba	
	30,0	China	6
	27,4		7
	2,4	Japón	8
	31,0	Irán	9
	18,5	India	10
	26,5	Egipto	13
	27,0	Taiwan	14

La frecuencia alélica del polimorfismo K832R en 100 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. (Tabla). Los datos de los países consultados presentaron frecuencias alélicas similares a nuestro ejemplo, en un estudio en pacientes chinos<sup>6</sup> y en pacientes iraníes.<sup>9</sup> Sin embargo, en Japón informan una frecuencia de 2,4%, la cual es muy baja y se comporta como una variante polimórfica rara.

La identificación del polimorfismo K832R permitirá en un futuro inmediato el diagnóstico molecular por métodos indirectos y su correlación con las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes cubanos analizados. Por lo que será una herramienta molecular para el asesoramiento genético.

## CONCLUSIONES

Está disponible la identificación del polimorfismo K832R en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de la Enfermedad de Wilson a la Red Nacional de Genética Médica e Instituto Nacional de Gastroenterología.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar Suresh S, Kurian George, Eapen E, Roberts Eve A. Genetics of Wilson's disease: a clinical perspective. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2012; 3 (6): 285-293.

2. Kenney SM, Cox DW. Sequence Variation Database for the Wilson Disease Copper Transporter, ATP7B. *Human Mutation*. 2007; 28 (12): 1171-77.
3. Bennett J, Hahn SH. Clinical Molecular Diagnosis of Wilson Disease. *Seminars in liver disease*. 2011; 31 (3): 233-238.
4. 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: 6168.
5. Brage A, Tomé S, García A, Carracedo A, Salas A. Clinical and molecular characterization of Wilson disease in Spanish patients. *Hepatology Research*. 2007; 37: 18-26.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Miller SA. Salting out procedure for extracting DNA. *Nucleic Acids Reserch*. 1988; 16 (3): 1215.

Recibido: 21 de febrero de 2013.

Aprobado: 28 de marzo de 2013.