

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Caracterización clínica, epidemiológica y genética de los pacientes  
pediátricos con Enfermedad de Wilson en el Hospital Nacional de Niños de  
Costa Rica (Dr. Carlos Saénz Herrera), (CCSS) del 2010 al 2015.**

Trabajo de graduación sometido a la consideración del Comité Director del Posgrado en Pediatría para optar al grado académico de Especialista en Pediatría.

Dra. Mónica Penón Portmann

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica  
2017**

## Investigadores

### Investigador principal:

- Dra. Mónica Penón Portmann  
Residente Pediatría  
Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera  
Correo electrónico: [monicapenon@gmail.com](mailto:monicapenon@gmail.com)

### Subinvestigadores:

- Dra. Gabriela Jiménez Arguedas  
Pediatra Gastroenteróloga  
Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera  
Correo electrónico: [gabyjimeneza@gmail.com](mailto:gabyjimeneza@gmail.com)
- Dr. Ramsés Badilla Porras  
Pediatra y Genetista Clínico  
Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera  
Correo electrónico: [rbadillap@tamizajecr.com](mailto:rbadillap@tamizajecr.com)
- Dra. Mildred Jiménez Hernández  
Microbióloga, M.Sc. Biología Molecular  
Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera  
Correo electrónico: [mjimenezh@tamizajecr.com](mailto:mjimenezh@tamizajecr.com)
- Dr. Manuel Saborío Rocafort  
Pediatra y Genetista Clínico  
Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera  
Correo electrónico: [msaborior@tamizajecr.com](mailto:msaborior@tamizajecr.com)

- Dr. Alfredo Mora Guevara  
Pediatra Gastroenterólogo  
Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera  
Correo electrónico: [amorag@hnn.sa.cr](mailto:amorag@hnn.sa.cr)
  
- Dra. Stephanie Lotz Esquivel  
Médico general  
Unidad de Investigación, Hospital San Juan de Dios  
Correo electrónico: [amorag@hnn.sa.cr](mailto:amorag@hnn.sa.cr)

## DEDICATORIA

A mi madre. Mami gracias por ser apoyo infinito y amor incondicional. Este logro, al igual que mi carrera, es gracias a usted.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar por agradecer a todo el equipo de subinvestigadores y a mis tutores. Este trabajo de investigación es producto de un largo y arduo trabajo con un equipo de lujo que no hubiese sido posible sin su apoyo.

Quiero agradecer al Dr. Manuel Saborío a quien admiro y quien ha sido mi mentor desde el momento que comencé a trabajar en el servicio de Genética del Hospital Nacional de Niños. Gracias por haberme enseñado muchísimo de genética y por motivarme para continuar mis estudios en esta rama.

Gracias a la Dra. Mildred Jiménez quien fue un apoyo vital en todas las etapas de la investigación. Sin usted esta investigación no hubiese sido posible. Muchísimas gracias por todas las horas dedicadas, por ayudarme con gran parte de la estructura del trabajo y enseñarme tantísimo de biología molecular.

Quiero agradecer a la Dra. Stephanie Lotz por su interés continuo en el proceso, por ser dedicada y minuciosa con miles de detalles del trabajo y sobre todo con la presentación. Gracias por ayudarme en absolutamente todo hasta con la recolección de datos.

Quiero agradecer al Dr. Alfredo Mora y a la Dra. Gabriela Jiménez por ayudarme con la iniciativa del trabajo, por tener el interés en este proyecto y por la dedicación que ustedes tienen en el cuidado y la calidad de vida de todos los niños con enfermedad de Wilson en Costa Rica.

Muchísimas gracias al Dr. Ramsés Badilla por su apoyo continuo a través del trabajo y por ayudarme de forma consistente con dudas que fueron surgiendo durante la investigación. Gracias por todas sus enseñanzas.

Finalmente, muchas gracias a toda mi familia. Gracias Tugie por ser un gran apoyo durante todos estos años. Agradezco infinitamente su sabiduría de darme la herramienta del estudio, sin usted este trabajo y sobre todo mi carrera como especialista y médico no hubiese sido posible.

8 diciembre del 2017

Sistema de Estudios de Postgrado

Universidad de Costa Rica

Estimados señores:

Por este medio hago constar que la investigación "Caracterización clínica, epidemiológica y genética de los pacientes pediátricos con Enfermedad de Wilson en el Hospital Nacional de Niños de Costa Rica (Dr. Carlos Saénz Herrera), (CCSS) del 2010 al 2015", sus resultados, discusión y conclusiones son obra y producto de mi persona, por lo que los derechos de propiedad intelectual sobre los mismos también me pertenecen. Este estudio fue debidamente aprobado por el Comité Local de Bioética e Investigación del Hospital Nacional de Niños. con el código CEC-HNN-030-2017.

Sin otro particular, se suscribe atentamente



---

Dra. Mónica Penón Portmann

Cédula: 1-1232-0311

Código Médico: 12351

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**ACTA DE REVISION DEL PROYECTO DE GRADUACION**

**Caracterización clínica, epidemiológica y genética de los pacientes pediátricos con Enfermedad de Wilson en el Hospital Nacional de Niños de Costa Rica (Dr. Carlos Saénz Herrera), (CCSS) del 2010 al 2015.**

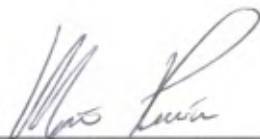
Trabajo de Graduación aceptado por el Comité Director del Postgrado en Pediatría para optar por el grado académico de Especialista en Pediatría



Dra. Lydiana Ávila de Benedictis  
Pediatra Neumóloga  
Coordinadora Posgrado Pediatría



Dra. Gabriela Jiménez Arguedas  
Pediatra Gastroenteróloga  
Tutor académico



Dra. Mónica Penón Portmann  
Autor principal

## **Tabla de contenidos:**

<b>INVESTIGADORES .....</b>	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>V</b>
<b>ACTA DE REVISION DEL PROYECTO DE GRADUACION.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS:.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE CUADROS: .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS: .....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>FUENTES DE FINANCIAMIENTO .....</b>	<b>22</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>LIMITACIONES Y SESGOS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>47</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>54</b>



## Resumen

**Introducción:** La enfermedad de Wilson es una enfermedad genética rara (1 : 40,000 a 1: 100,000), de herencia autosómica recesiva. Sucede por una mutación en el gen ATP7B que codifica una proteína encargada de metabolizar el cobre en el hígado. La consecuencia de su disfunción es que el acúmulo de este metal genera un daño hepático principalmente. Sin tratamiento los pacientes progresan inevitablemente a la muerte por fallo hepático agudo, cirrosis o por complicaciones secundarias a un daño neurológico progresivo.

**Objetivo principal y metodología:** El objetivo principal de esta investigación fue caracterizar a la población pediátrica con enfermedad de Wilson y determinar si existe una relación entre el genotipo y el fenotipo. El estudio es retrospectivo observacional y se incluyeron pacientes a quienes se les había realizado un análisis molecular para esta patología. Además, se compararon la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico genético con el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson que es el peso seco de cobre en tejido hepático.

**Resultados y discusión:** La edad de presentación promedio fue de  $8.8 \pm 3.4$  años, que representa una reducción con comparación a estudios previos costarricenses probablemente gracias a la detección de pacientes asintomáticos por el análisis molecular. La prevalencia de la enfermedad en todo el país fue de 2.2:100,000 habitantes y en San José de 3.9:100,000 habitantes. En San José la prevalencia de la enfermedad es muy alta pero menor en comparación al estudio previo costarricense que se realizó en una población adulta. La diferencia es posiblemente por la evolución natural de la enfermedad (subregistro pediátrico por la edad de presentación) y un posible sobre registro en adultos que son portadores.

Las variantes patogénicas detectadas en Costa Rica son 4: p.N1270S, p.M645R, p.L708P, p.T1434M. La más frecuente es la p.N1270S. Un 58.8% de los pacientes son homocigotos para esta variante patogénica y un 75% por lo menos tienen un cambio para p.N1270S. La alta prevalencia de una única mutación aunado a la distribución geográfica central son altamente sugestivas de un efecto fundador en Costa Rica.

El diagnóstico genético es 100% específico y tiene una alta sensibilidad del 79%. Es de gran utilidad para resolución expedita de pacientes en falla hepática aguda.

## Lista de abreviaturas:

WD: Enfermedad de Wilson

HNN: Hospital Nacional de Niños

AST: Aspartato aminotransferasa

ALT: Alanina transaminasa

EASL: Asociación Europea para el Estudio del Hígado

INR: proporción internacional normalizada o "international normalized ratio"

## Lista de cuadros:

CUADRO 1: DISTRIBUCIÓN ABSOLUTA Y RELATIVA SEGÚN SEXO DE LOS PACIENTES CON WD (N = 34). HNN. DE ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015. ....	23
CUADRO 2: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA EDAD A LA FECHA DEL DIAGNÓSTICO (AÑOS) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN SEXO. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 34 PACIENTES).....	24
CUADRO 3: COSTA RICA. TASA DE MORBILIDAD POR ENFERMEDAD DE WILSON POR PROVINCIA. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015. (N = 34 PACIENTES). ....	27
CUADRO 4: COSTA RICA. FORMA DE PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE WILSON. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015. (N = 34 PACIENTES). ....	27
CUADRO 5: COSTA RICA. VARIANTES PATOGENICAS DE LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA SEGÚN GENOTIPO. (N = 34 PACIENTES).....	28
CUADRO 6: COSTA RICA. VARIANTES PATOGENICAS DETECTADAS EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA POR GENOTIPO, LOCALIZACIÓN EN EXONES, TIPO DE MUTACIÓN Y POBLACIÓN DONDE ESTÁN DESCRITAS. (N = 34 PACIENTES). 28	
CUADRO 7: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA EDAD A LA FECHA DEL DIAGNÓSTICO (AÑOS) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN GENOTIPO. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015. (N = 33 PACIENTES).....	29
CUADRO 8: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA EDAD A LA FECHA DEL DIAGNÓSTICO (AÑOS) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN TIPO DE MUTACIÓN. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015. (N = 33 PACIENTES) .....	30
CUADRO 9: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL PUNTAJE DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN CONDICIÓN. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 140 PACIENTES).....	35
CUADRO 10: COSTA RICA. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL PUNTAJE COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA PACIENTES CON WD. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 140 PACIENTES).....	36
CUADRO 11: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL PESO SECO DE COBRE EN TEJIDO HEPÁTICO (MMOL/G) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON Y LOS CONTROLES. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 36 PACIENTES). ....	38
CUADRO 12: COSTA RICA. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL PESO SECO DE COBRE EN TEJIDO HEPÁTICO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA PACIENTES CON WD. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 140 PACIENTES).....	38
CUADRO 13: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL COBRE URINARIO (MICROMOL/24H) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON Y CONTROLES. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 117 PACIENTES).....	39
CUADRO 14: COSTA RICA. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL COBRE URINARIO COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA PACIENTES CON WD. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 140 PACIENTES).....	40
CUADRO 15: COSTA RICA. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ANÁLISIS MOLECULAR COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA PACIENTES CON WD. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 140 PACIENTES). ....	41
CUADRO 16: COSTA RICA. RESUMEN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA LAS CUATRO PRUEBAS DIAGNÓSTICAS. 41	

## Lista de Figuras:

FIGURA 1: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA EDAD A LA FECHA DEL DIAGNÓSTICO (AÑOS) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN SEXO. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 34 PACIENTES).....	24
FIGURA 2: COSTA RICA. HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS DE LA EDAD AL DIAGNÓSTICO (AÑOS) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 34 PACIENTES).....	25
FIGURA 3: DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON WD (N=34).....	26
FIGURA 4: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA EDAD A LA FECHA DEL DIAGNÓSTICO (AÑOS) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN GENOTIPO. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 33 PACIENTES).....	29
FIGURA 5: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA EDAD A LA FECHA DEL DIAGNÓSTICO (AÑOS) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN TIPO DE MUTACIÓN. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015. (N = 33 PACIENTES) .....	30
FIGURA 6: COSTA RICA. RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y SÍNTOMAS. PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 33 PACIENTES).....	31
FIGURA 7: COSTA RICA. RELACIÓN ENTRE GENOTIPO Y SÍNTOMAS. PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 33 PACIENTES). .....	32
FIGURA 8: COSTA RICA. RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y SÍNTOMAS Y/O ELEVACIÓN AST/ALT. PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 33 PACIENTES).....	32
FIGURA 9: COSTA RICA. RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y SÍNTOMAS Y/O ELEVACIÓN AST/ALT. PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 33 PACIENTES).....	33
FIGURA 10: COSTA RICA. RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y FALLA HEPÁTICA. PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 33 PACIENTES).....	33
FIGURA 11: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL PUNTAJE DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON, SEGÚN CONDICIÓN. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015. (N = 140 PACIENTES).....	35
FIGURA 12: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL PESO SECO DE COBRE EN TEJIDO HEPÁTICO (MMOL/G) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON Y LOS CONTROLES. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 36 PACIENTES). .....	37
FIGURA 13: COSTA RICA. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL COBRE URINARIO (MMOL/24H) DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE WILSON Y CONTROLES. HNN. ENERO DEL 2010 A DICIEMBRE DEL 2015 (N = 117 PACIENTES).....	39
FIGURA 14: DIAGNÓSTICO GENÉTICO SEGÚN ESTRATEGIA ANALÍTICA. ....	40

## Introducción

La enfermedad de Wilson es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva. Esta patología se manifiesta como un trastorno en el metabolismo del cobre secundario a una mutación en el gen ATP7B, localizado en el brazo largo del cromosoma 13. El gen ATP7B codifica una ATPasa tipo P que es una proteína grande de 1465 amino ácidos y se expresa principalmente en el hígado (1–4). La ATPasa reside en el aparato Golgi trans y está encargada de transportar el cobre de proteínas chaperonas intracelulares hacia su excreción a la bilis o su incorporación con la ceruloplasmina. La consecuencia de su disfunción se traduce en una menor excreción del cobre y una incorporación inadecuada del cobre a la ceruloplasmina. El resultado de una excreción inadecuada de cobre es su acúmulo ya que el consumo diario de cobre excede los requerimientos diarios. Este metal es esencial para múltiples funciones enzimáticas pero su exceso genera un daño por estrés oxidativo tanto a nivel hepático como en los otros órganos donde se deposita como en el sistema nervioso central, hígados, riñones, musculoesquelético, ojos, entre otros(1–7).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Wilson son secundarias al acúmulo de cobre en el cuerpo que se da principalmente en el hígado y cerebro(8,9). La presentación clínica de la enfermedad es muy variable: puede presentarse como enfermedad hepática, anemia hemolítica Coombs negativa con insuficiencia renal o pueden tener manifestaciones neuropsiquiátricas por el acúmulo de cobre principalmente en los ganglios basales(10).

La edad de presentación, así como la forma de presentación son sumamente variables. La sintomatología de la enfermedad se puede manifestar a cualquier edad, pero la mayoría de pacientes debutan entre los 5 y 35 años. El anillo de Kayser-Fleischer se documenta hasta en un 95% de los pacientes con presentación neuropsiquiátrica(9). Este anillo se puede observar con la lámpara de hendidura y es causado por el depósito de cobre en la membrana de Desçemet. Los pacientes que presentan la forma neuropsiquiátrica usualmente tienen signos de ataxia, tremor y distonía(9). Los signos clínicos de enfermedad hepática son inespecíficos, pero casi siempre preceden los síntomas neurológicos. La presentación hepática de la enfermedad puede ir desde asintomática hasta cambios bioquímicos hasta cirrosis. Ocasionalmente, el único síntoma inicial es la anemia hemolítica Coombs-negativa(6,10,11).

Sin tratamiento la enfermedad es letal. Con tratamiento quelante y trasplante hepático la gran mayoría de los pacientes sobreviven, sin embargo, a nivel mundial no hay estudios prospectivos de mortalidad(6). El pronóstico depende de la severidad de afección hepática y neurológica y de la adherencia al

tratamiento. En pacientes sin cirrosis usualmente con 1-2 años de tratamiento hay una normalización de las pruebas de función hepática. Por otro lado, en pacientes con fallo hepático agudo usualmente el tratamiento no es efectivo por el tiempo que duran los quelantes en remover el cobre. La sobrevida es mayor para pacientes que se presentan con enfermedad neuropsiquiátrica pero el tratamiento no revierte los síntomas(6).

El diagnóstico de la enfermedad de Wilson es clínico/bioquímico. Existe un cuadro de puntaje (6)(Anexo 1) que incluye signos clínicos, síntomas y valores bioquímicos ya que ningún valor bioquímico aislado es específico para la enfermedad. De acuerdo a este sistema un de puntaje 4 o más puntos es diagnóstico de la enfermedad. Los pacientes con enfermedad de Wilson usualmente tienen ceruloplasmina baja a indetectable, con anillo Kayser-Fleischer, cobre sérico y urinario altos y peso seco de cobre en biopsia hepática aumentado(6). Ninguno de los parámetros bioquímicos que forman parte del diagnóstico tienen un alto valor predictivo positivo. Por ejemplo, la ceruloplasmina puede estar normal o aumentada por ser un reactante de fase aguda en un paciente con Wilson. El estándar de oro del diagnóstico de la enfermedad de Wilson es el peso seco de cobre en tejido hepático(6,9,12).

El puntaje que se utiliza para el diagnóstico incluye el diagnóstico genético y está validado para pacientes en edad pediátrica(12–14). Hay más de 500 mutaciones descritas para el gen ATP7B relacionadas con la enfermedad(1,8). Sin embargo, desde el 2010 en Costa Rica se inició el diagnóstico genético de la enfermedad por el Centro Nacional para la Prevención de Discapacidades. En Costa Rica, existen seis mutaciones principales descritas M665I, T1434M, H1207R, L708P, M645R y N1270S(15). Hasta la fecha hay aproximadamente 152 familias estudiadas y 100 pacientes pediátricos con diagnóstico clínico o sospecha diagnóstica a quienes se les ha realizado un análisis molecular en búsqueda de mutaciones. El Hospital Nacional de Niños es el centro nacional de referencia para estos niños ya que es el único centro con especialistas pediátricos en gastroenterología y hepatología(15). El hecho que son pocas las mutaciones descritas en la región y que hay un solo centro de referencia para todo el país hace factible hacer un estudio epidemiológico de la población pediátrica con enfermedad de Wilson y hacer una correlación entre estas mutaciones y la forma de presentación de la enfermedad.

La incidencia a nivel mundial se estima en 1:30,000 – 1: 100,000(16). El único estudio pediátrico también realizado en el Hospital Nacional de Niños documentó una prevalencia poblacional de 35 nuevos casos entre 1992 y el 2006. Este estudio fue una revisión retrospectiva de los pacientes pediátricos que llevaban control en dicho centro(16). Estudios epidemiológicos en adultos reportan que Costa Rica tiene la mayor incidencia a nivel mundial de la enfermedad de Wilson que se estima en 4.9/100,000(3,17). La incidencia tan alta en Costa Rica se sospecha que es secundaria a un efecto fundador y a una

alta tasa de consanguinidad en ciertas regiones del país. Hay variabilidad en incidencias reportadas por diferentes fuentes.

No se han descrito en la literatura asociaciones claras entre la mutación, la edad de presentación de la enfermedad y la severidad de la enfermedad, los estudios genotipo-fenotipo han sido poco concluyentes(1,2,5,17–20). Es posible que diferentes mutaciones en la ATPasa transportadora de cobre se traduzca en diferentes manifestaciones fenotípicas de la enfermedad(2,8,19). Hay mutaciones como la p.H1069Q que se han descrito en estudios se asocian con una presentación clínica más leve, de diagnóstico más tardío y asociado más a síntomas neurológicos. Por otro lado la mutación p.Q289X, en pacientes homocigotas, produce una proteína truncada y se ha descrito se manifiesta clínicamente con una presentación más temprana, severa y fenotipo hepático (19,21). A pesar de no haber una relación genotipo-fenotipo clara descrita, sí hay una incidencia significativamente más alta de hepatitis fulminante en la población costarricense que se sospecha puede estar relacionada con que la mutación más frecuente en Costa Rica, la p.N1270S, sea más deletérea(8). Estudios funcionales también han demostrado que comparando la p.H1069Q contra p.N1270S, la primera tuvo recuperación parcial de la función en cuanto a excreción del cobre en levaduras en comparación a la segunda donde se observó una pérdida total de la función(22). Se teoriza que la mutación p.N1270S puede ser más deletérea al estar localizada en un dominio con región de bisagra con actividad ATPasa(23,24).

## Justificación

Costa Rica es el país con la mayor prevalencia de enfermedad de Wilson a nivel mundial (4,9 : 100,000)(3). Es una enfermedad de herencia genética, autosómica recesiva, que es tratable y que el tratamiento ha demostrado que mejora radicalmente la morbimortalidad de esta patología. El diagnóstico oportuno, por lo tanto, es esencial para prevenir secuelas por la enfermedad y muertes.

El estudio epidemiológico de la enfermedad en la población pediátrica es de suma importancia para poder discernir las áreas del país de mayor afectación, las edades esperadas de presentación, las formas de presentación y para conocer de forma más detallada la evolución natural de WD en Costa Rica.

Asimismo, demostrar que existe una relación entre el genotipo y el fenotipo llevaría a un mejor entendimiento de esta patología y del metabolismo del cobre. Esto podría tener repercusiones importantes para el tratamiento y manejo de los pacientes afectados.



## Objetivos

### INTERROGANTE A ESTUDIAR

¿Cuáles son las características clínicas, epidemiológicas y genéticas de los pacientes pediátricos con enfermedad de Wilson en Costa Rica en el Hospital Nacional de Niños de Costa Rica (CCSS) del 2010 al 2015?

### OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a los pacientes pediátricos del Hospital Nacional de Niños de Niños con el diagnóstico genético de WD y establecer si hay correlación entre el genotipo y el fenotipo (2010 – 2015).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la epidemiología de los pacientes con enfermedad de Wilson en la población pediátrica y comparar con estudios previos costarricenses.
2. Calcular la prevalencia de WD en las diferentes regiones de Costa Rica para la población pediátrica.
3. Identificar cuáles son las mutaciones más frecuentes en la población costarricense.
4. Determinar si existe relación entre en tipo de mutación, la edad de presentación de la enfermedad y la forma de presentación (la relación genotipo-fenotipo).
5. Comparar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico genético con el estándar de oro del diagnóstico clínico que es el peso seco de cobre en tejido hepático.

## Pacientes y métodos

### PACIENTES

Este estudio incluye la revisión de expedientes de pacientes pediátricos costarricenses con enfermedad de Wilson del Hospital Nacional de Niños, a quienes se les realizó un análisis molecular para dicha enfermedad entre enero 2010 hasta diciembre 2015.

El objeto de estudio consta de los registros médicos de estos pacientes. Para obtener esta información se utilizó la base de datos del Centro Nacional para la Prevención de Discapacidades en el Hospital Nacional de Niños.

### METODOLOGIA

Es un estudio retrospectivo observacional. Se obtuvo autorización del Comité de Ética Científico del Hospital Nacional de Niños (CEC-HNN-030-2017). Se utilizaron dos bases de datos. La primera fue la lista de pacientes a quienes se les realizó un análisis molecular por sospecha de enfermedad de Wilson en el Centro Nacional para la Prevención de Discapacidades en el Hospital Nacional de Niños entre el 2010 y el 2015. De esta lista se incluyeron todos los pacientes pediátricos (definidos como menores de 18 años al momento del diagnóstico) y se realizó una revisión de expedientes. Se incluyeron aquellos pacientes que cumplieran criterios diagnósticos (mayor o igual a 4 puntos, según el puntaje diagnóstico de Leipzig, 2012 (Anexo 1). Además, se solicitó la lista de pacientes con el diagnóstico de enfermedad de Wilson de estadística del Hospital de Niños desde el 2005 hasta el 2010 para realizar un control cruzado y corroborar que a todos los pacientes con diagnóstico de WD se les realizara análisis molecular.

La información se recogió en una base de datos creada en Epi Info™, congruente con la hoja de recolección de datos (Anexo 2). Se utilizaron copias físicas para cada paciente de los datos recolectados.

Los datos se analizaron en STATA versión 14 con licencia. Se realizaron análisis de estadística descriptiva e inferencial. No se realizó un cálculo de tamaño de muestra ya que el estudio es poblacional. Sin embargo, para los análisis de relación genotipo-fenotipo los pacientes enfermos fungieron como una muestra aleatoria debido al comportamiento natural de la enfermedad.

Se realizaron determinaciones de medidas de tendencia central para variables cualitativas y cuantitativas (i.e. media, IC, mediana, varianza, desviación típica), contrastes de normalidad y homocedasticidad (i.e. Box plot, Levene), determinación de pruebas paramétricas de asociación de variables cualitativas y/o cuantitativas (i.e. regresión, correlación de Pearson, prueba t) y

determinaciones de pruebas no paramétricas de asociación de variables cualitativas y/o cuantitativas (i.e. Chi cuadrado).

Se calculó la tasa de prevalencia como numerador el número total de casos en el periodo de tiempo estudiado y denominador la población pediátrica menor de 20 años en el periodo de tiempo correspondiente. La población pediátrica se tomará de los censos nacionales del INEC. Este valor luego se promedió para dar una tasa global y se corrigió la tasa de prevalencia según la población de cada provincia.

Se estimó la especificidad y sensibilidad del diagnóstico genético con un cuadro de dos por dos y se comparó con la sensibilidad y especificidad del estándar de oro que es el peso seco de cobre en tejido hepático según este estudio y según la literatura. Se compararon los resultados de este estudio con estudios previos costarricenses. Se tomaron como controles al grupo de pacientes a quienes se les había solicitado análisis molecular por antecedentes heredofamiliares de enfermedad de Wilson o por otras hepatopatías en estudio pero que no cumplían con criterios para el diagnóstico de la enfermedad.

El análisis para la correlación entre genotipo-fenotipo se hizo tomando los grupos de genotipos y comparando esto contra las variables: 1. Edad de diagnóstico, 2. Forma de presentación (asintomático versus sintomático), 3. Falla hepática versus no falla hepática). Se definió sintomático como la presencia de síntomas clínicos en un grupo y posteriormente se incluyeron en el grupo de sintomáticos a los pacientes con hepatitis subclínica (definido como elevación de las transaminasas  $>2-3x$  el valor basal). Falla hepática se definió como datos clínicos de insuficiencia hepática e INR  $>2$ .

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS PARTICIPANTES:**

Rango de edad: 0 -18 años al momento del diagnóstico

Sexo: no existe restricción en el enrolamiento de participantes que se base en el género del paciente.

Etnia: no existe restricción en el enrolamiento de participantes que se base en la etnia del paciente.

Inclusión de clases especiales o participantes vulnerables: niños (menores de edad). No existe restricción en el enrolamiento de participantes pertenecientes a otras clases especiales o pacientes vulnerables; en caso de su presencia, como es el caso de la población pediátrica, se tomarán las medidas pertinentes según dictamina la legislación vigente.

Pruebas de laboratorio y Gabinete: En el presente estudio de revisión retrospectiva de registros médicos de los pacientes pediátricos costarricenses con enfermedad de Wilson del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica en el periodo de tiempo establecido, no se contempla la realización de pruebas de laboratorio ni de gabinete.

Otros: Pacientes pediátricos costarricenses con diagnóstico clínico de enfermedad de Wilson, según los criterios 8va Reunión Internacional de la Enfermedad de Wilson realizada en Leipzig, 2001; y con cribado genético previamente realizado en dicho centro. Esto con la finalidad de identificar las mutaciones más frecuentes en la población costarricense.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE LOS PARTICIPANTES:**

Pacientes cuyo expediente esté incompleto o incluya menos del 60% de las variables a evaluar.

## Aspectos éticos

En este estudio no se vio afectada la autonomía de los pacientes. Al ser un estudio retrospectivo observacional tiene un carácter descriptivo, no hay contacto directo con pacientes y constó únicamente de revisión de expedientes.

El riesgo principal inherente del estudio es la fuga de información confidencial de los pacientes. Riesgo que se minimizó al codificar la información por número de caso, omitiendo datos de nombre, números de expediente y cédula. Además, Las bases de datos son seguras, con clave y acceso únicamente para el investigador principal y los subinvestigadores.

Se respetó el principio de justicia ya que se incluyeron todos los participantes que cumplieran criterios de inclusión y fueron tratados de la misma forma. Este estudio además cumple con el principio de beneficencia porque es un estudio con riesgos mínimos para los participantes y los pacientes pueden ser beneficiados de forma indirecta al llegar a entender mejor la patología y con esto optimizar el manejo de la enfermedad. Se respetó también el principio de no maleficencia, por la naturaleza del estudio, siendo un estudio observacional, los pacientes no fueron sometidos a ninguna intervención que los pusiera en algún riesgo.

## **Fuentes de financiamiento**

Mediante este estudio no se obtuvo ninguna compensación financiera. No hay ningún conflicto de interés por parte de los investigadores. Los participantes no tienen ninguna obligación financiera.

## Resultados

### CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN

La población en estudio consta de 34 casos del Hospital Nacional de Niños (HNN), Dr. Carlos Sáenz Herrera, del 01 de enero del 2010 al 31 de diciembre del 2015.

Para los siguientes análisis, los 34 pacientes fungirán como una muestra aleatoria debido al comportamiento natural de la enfermedad en estudio, con lo cual se puede decir que los pacientes aparecen de manera aleatoria, así se hallan tomado del registro del hospital. El 55,9% de los pacientes con enfermedad de Wilson en estudio fueron hombres. (Cuadro 1).

**Cuadro 1: Distribución absoluta y relativa según sexo de los pacientes con WD (n = 34). HNN. De enero del 2010 a diciembre del 2015.**

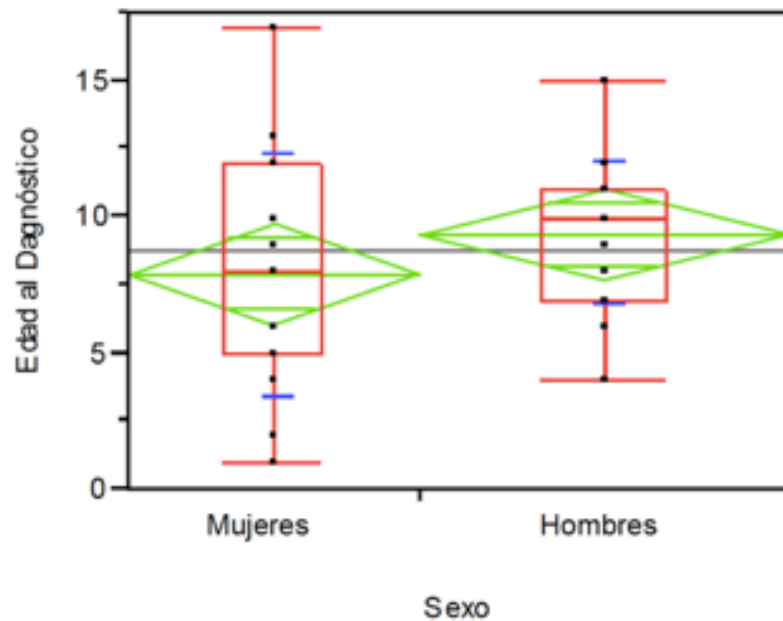
Edad al diagnóstico	Promedio	Rango
<b>Ambos sexos</b>	8.8 ± 3.6 años	1.0 – 17.0 años
<b>Mujeres</b>	7.9 ± 4.5 años	1.0 – 17.0 años
<b>Hombres</b>	9.4 ± 2.6 años	4.0 - 15 años
Características basales	n = 34 pacientes	Porcentaje
<b>Mujeres</b>	15	55.9%
<b>Hombres</b>	19	44.1%

Fuente: Expedientes pacientes. HNN

El promedio de edad al diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Wilson fue  $8,8 \pm 3,6$  años, el más joven tenía 1,0 año y el más adulto 17,0 años, el 75% de los pacientes tenía 11,0 años o menos; el promedio de edad al diagnóstico de las pacientes mujeres fue  $7,9 \pm 4,5$  años, con un rango de edad de entre 1,0 año y 17,0 años, el 50% de las pacientes tenían entre 5,0 y 12,0 años (observaciones centrales); el promedio de edad al diagnóstico de los pacientes hombres fue  $9,4 \pm 2,6$  años, con un rango de edad de entre 4,0 años y 15,0 años, el 75% de los pacientes tenían 11,0 años o menos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 5% entre estos dos promedios; es decir, el promedio de la edad al diagnóstico de las mujeres es igual estadísticamente que el promedio de la edad al diagnóstico de los hombres. ( $p = 0,2340$ ) (Figura 1).

La prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, resulta significativa al 5% ( $p = 0.0473$ ); es decir, no se cumple el supuesto de igualdad de varianzas; entonces se utilizó la prueba robusta para igualdad de medias Welch Anova ( $p = 0,2654$ ) que supone varianzas desiguales y confirma que los promedios son iguales estadísticamente (Figura 1 y Cuadro 2).

Figura 1: Costa Rica. Estadísticas descriptivas de la edad a la fecha del diagnóstico (años) de los pacientes con enfermedad de Wilson, según sexo. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 34 pacientes).



Fuente: Expedientes pacientes. HNN

Cuadro 2: Costa Rica. Estadísticas descriptivas de la edad a la fecha del diagnóstico (años) de los pacientes con enfermedad de Wilson, según sexo. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 34 pacientes).

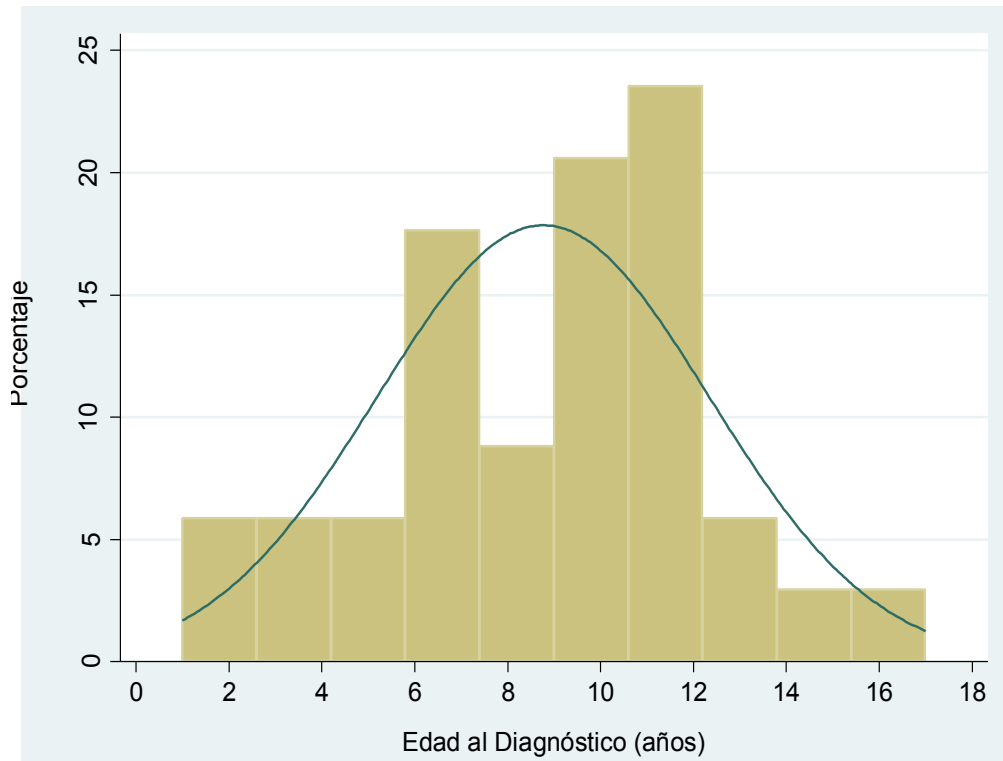
Sexo	Pacientes	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Q1	Q2	Q3	I. de C. al 95%		Prueba F	Prueba Levene
									Límite inferior	Límite superior	Valor de p	
Total	34	8,8	3,6	1,0	17,0	6,0	9,0	11,0				
Femenino	15	7,9	4,5	1,0	17,0	5,0	8,0	12,0	6,1	9,8	0,2340	0,0473
Masculino	19	9,4	2,6	4,0	15,0	7,0	10,0	11,0	7,8	11,1		

Fuente: Expedientes pacientes. HNN

La variable edad al diagnóstico (años) presenta una leve asimetría hacia la izquierda (coeficiente de asimetría = -0,06); es decir, que la enfermedad de Wilson es diagnosticada en el HNN principalmente en niños entre los 8,0 años y los 13,0 años (71,4%) (Figura 2).



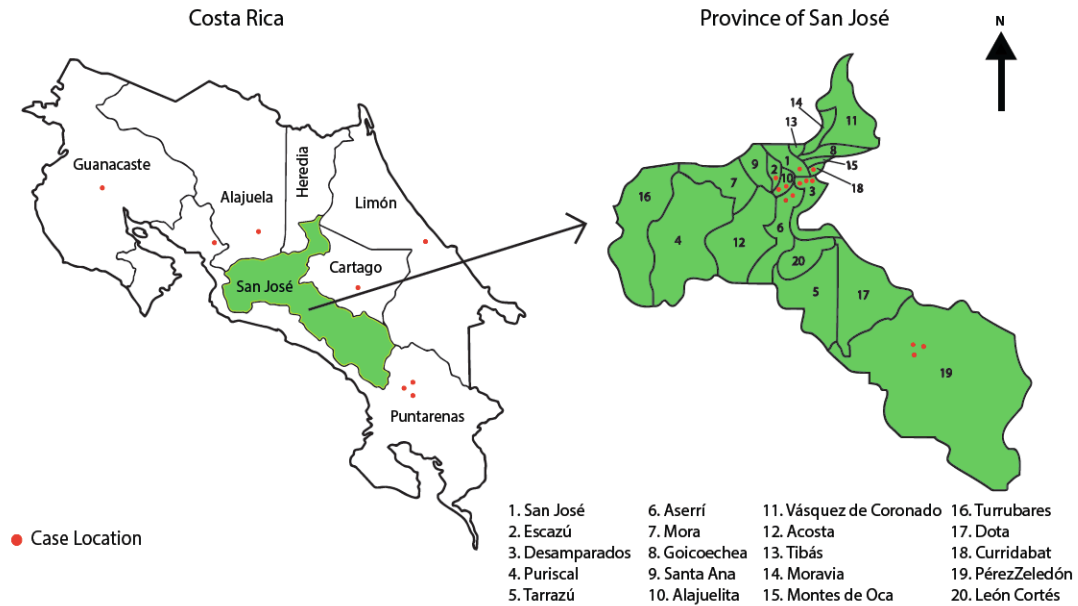
Figura 2: Costa Rica. Histograma de frecuencias de la edad al diagnóstico (años) de los pacientes con enfermedad de Wilson. HNN. Enero del 2010 a Diciembre del 2015 (n = 34 pacientes).



Fuente: Expedientes pacientes. HNN

El 55,9% (19 pacientes) residían en la provincia de San José al momento del diagnóstico, seguida de la provincia de Puntarenas con el 17,6% (6 pacientes), y en las demás provincias el número de pacientes que residían en ellas es de entre uno y tres pacientes (Figura 4). Dentro de la provincia de San José, el 63,1% (12 pacientes) diagnosticados con la enfermedad de Wilson, residían en los cantones de Desamparados y Perez Zeledón. Hay una distribución central de la enfermedad, siendo la mayoría de casos del Valle Central (Figura 3).

Figura 3: Distribución geográfica de pacientes pediátricos con WD (n=34).



Fuente: Expedientes pacientes. HNN

La tasa de prevalencia de morbilidad por enfermedad de Wilson, para el país en este periodo de 14 años (2002 al 2015) es de 2,2 habitantes menores de 20 años por cada 100000 habitantes menores de 20 años, podría pensarse que es una incidencia acumulada, pero esta asume que todos las personas menores de 20 años, estuvieron efectivamente en riesgo de presentar la enfermedad de Wilson durante los 14 años en estudio, lo cual no es cierto, porque al momento que un individuo presenta la enfermedad deja de estar en riesgo. Hay que tener cuidado con la interpretación y comparación de estas tasas por provincia por tener tan pocos casos (Cuadro 3).

## CÁLCULO DE PREVALENCIA

**Cuadro 3: Costa Rica. Tasa de morbilidad por enfermedad de Wilson por provincia. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015. (N = 34 pacientes).**

Provincia	Población promedio de 0 a <sup>1</sup> 20 años	Enfermos	Tasa de morbilidad por 100,000 en menores de 20 años
<b>Total</b>	1,567,774.5	34	2.2
<b>San José</b>	487,582.4	19	3.9
<b>Alajuela</b>	322,920.1	2	0.6
<b>Cartago</b>	168,435.9	3	1.8
<b>Heredia</b>	147,216.1	2	1.4
<b>Guanacaste</b>	121,416.5	1	0.8
<b>Puntarenas</b>	166,289.9	6	3.6
<b>Limón</b>	164,049.5	1	0.6

2/ Estimaciones nacionales. Población por años calendario, según sexo y grupos especiales de edades. INEC 2007 a 2016.

Fuente: Expedientes pacientes. HNN

## PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE WILSON

La mayoría de pacientes tuvieron síntomas hepáticos al momento del diagnóstico (n=20 pacientes; correspondiente al 50% del total). Hubo 1 caso que se presentó como anemia hemolítica Coombs negativo. Ningún paciente tuvo presentación por síntomas neurológicos. Del total 16 pacientes (47% del total) se diagnosticaron asintomáticos (Cuadro 4). Además, 1 paciente del total de 34 falleció.

**Cuadro 4: Costa Rica. Forma de presentación clínica de la enfermedad de Wilson. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015. (N = 34 pacientes).**

Presentación clínica	Número de pacientes (n = 34)	% de total
<b>Hepática</b>	17	50
<b>(Falla hepática aguda)</b>	(6)	(18)
<b>Anemia hemolítica</b>	1	3
<b>Neurológica</b>	0	0
<b>Asintomática</b>	16	47

## VARIANTES PATOGENICAS HALLADAS EN LA POBLACION PEDIATRICA CON ENFERMEDAD DE WISLON

**Cuadro 5: Costa Rica. Variantes patogénicas de la población pediátrica según genotipo. (N = 34 pacientes).**

Mutación	Número de pacientes (N = 34)
Homocigotos	20
Heterocigotos compuestos	7
Heterocigotos	6
Ninguna mutación	1

**Cuadro 6: Costa Rica. Variantes patogénicas detectadas en la población pediátrica por genotipo, localización en exones, tipo de mutación y población donde están descritas. (N = 34 pacientes).**

Mutación	Alelos	Homocigotos	Heterocigotos	No. Familias con mutación	Exón	Tipo Mutación	Población
p.N1270S	51	20	11	28	18	Cambio de sentido	Siciliana/Costarricense
p.M645R	4	0	4	3	6	Cambio de sentido	Judía
p.L708P	4	0	4	3	8	Cambio de sentido	Norteamericanos
p.T1434M	1	0	1	1	21	Cambio de sentido	Egipcia/Mediterráneo
No detectada	8		6				

La mayoría de pacientes son homocigotos para la p.N1270S (58.8%). El 75% de la población estudiada tiene por lo menos 1 cambio para la mutación p.N1270S (Cuadros 5 y 6). Hubo 1 paciente donde no se detectó ninguna mutación a pesar de cumplir con los criterios diagnósticos de la enfermedad y 6 pacientes donde solamente se detectó 1 mutación a pesar de sí ser enfermos (Cuadros 5 y 6).

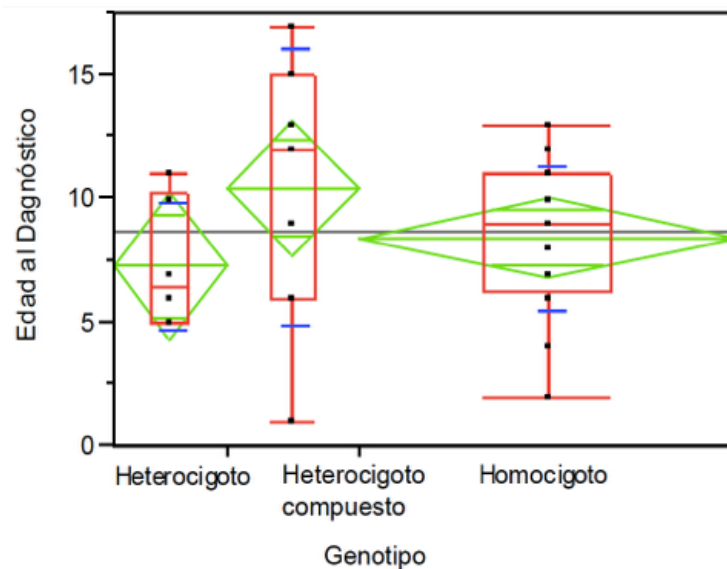
### RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO (GENOTIPO VERSUS EDAD)

El promedio de edad al diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Wilson fue  $8,7 \pm 3,6$  años, el más joven tenía 1,0 año y el más adulto 17,0 años, el 75% de los pacientes tenía 11,0 años o menos; el promedio de edad al diagnóstico de las pacientes heterocigotos fue  $7,3 \pm 2,6$  años, con un rango de edad de entre 5,0 año y 11,0 años, el 75% de las pacientes tenían 10,2 años o menos; el promedio de edad al diagnóstico de los pacientes heterocigotos compuestos fue  $10,4 \pm 5,5$  años, con un rango de edad de entre 1,0 años y 17,0 años, el 75% de los pacientes tenían 15,0 años o menos; el promedio de edad al diagnóstico de los pacientes homocigotos fue  $8,4 \pm 2,9$  años, con un rango de edad de entre 2,0 años y 13,0 años, el 75% de los pacientes tenían 11,0 años o menos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 5% entre estos tres promedios; es decir, el promedio de la edad al diagnóstico de los pacientes heterocigotos es igual estadísticamente que el promedio de la edad al

diagnóstico de los pacientes heterocigotos compuestos y los pacientes homocigotos. ( $p = 0,2340$ ) (Figura 4) (Cuadro 7).

La prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, resulta significativa al 5% ( $p = 0.0499$ ); es decir, no se cumple el supuesto de igualdad de varianzas; entonces se utilizó la prueba robusta para igualdad de medias Welch Anova ( $p = 0,4344$ ) que supone varianzas desiguales y confirma que los tres promedios son iguales estadísticamente.

Figura 4: Costa Rica. Estadísticas descriptivas de la edad a la fecha del diagnóstico (años) de los pacientes con enfermedad de Wilson, según genotipo. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 33 pacientes).



Cuadro 7: Costa Rica. Estadísticas descriptivas de la edad a la fecha del diagnóstico (años) de los pacientes con enfermedad de Wilson, según genotipo. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015. (n = 33 pacientes)

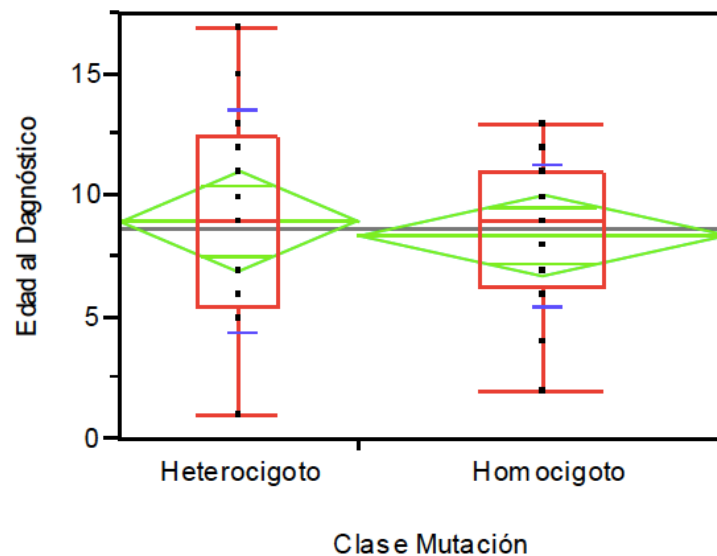
Tipo Mutación	Pacientes	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Q1	Q2	Q3	I. de C. al 95%		Prueba F	Prueba Levene
									Límite inferior	Límite superior	Valor de p	
<b>Total</b>	33	8,7	3,6	1,0	17,0	6,0	9,0	11,0				
Heterocigoto	6	7,3	2,6	5,0	11,0	5,0	6,5	10,2	4,4	10,3		
Heterocigoto compuesto	7	10,4	5,5	1,0	17,0	6,0	12,0	15,0	7,7	13,2	0,2815	0,0499
Homocigoto	20	8,4	2,9	2,0	13,0	6,2	9,0	11,0	6,8	10,1		

Se agruparon a los pacientes heterocigotos con los heterocigotos compuestos con el supuesto que estos eran compuestos pero que una segunda mutación no se había documentado ya que a estos 6 solo se les realizó un panel de 4 exones. El promedio de edad al diagnóstico de los pacientes con

enfermedad de Wilson fue  $8,7 \pm 3,6$  años, el más joven tenía 1,0 año y el más adulto 17,0 años, el 75% de los pacientes tenía 11,0 años o menos; el promedio de edad al diagnóstico de los pacientes heterocigotos fue  $9,0 \pm 4,5$  años, con un rango de edad de entre 1,0 años y 17,0 años, el 75% de los pacientes tenían 12,5 años o menos; el promedio de edad al diagnóstico de los pacientes homocigotos fue  $8,4 \pm 2,9$  años, con un rango de edad de entre 2,0 años y 13,0 años, el 75% de los pacientes tenían 11,0 años o menos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 5% entre estos dos promedios; es decir, el promedio de la edad al diagnóstico de los pacientes heterocigotos es igual estadísticamente que el promedio de la edad al diagnóstico de los pacientes homocigotos. ( $p = 0,6737$ ) (Figura 5 y Cuadro 8).

La prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, no resultó significativa al 5% ( $p = 0,0621$ ); es decir, se cumple el supuesto de igualdad de varianzas.

Figura 5: Costa Rica. Estadísticas descriptivas de la edad a la fecha del diagnóstico (años) de los pacientes con enfermedad de Wilson, según tipo de mutación. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015. (n = 33 pacientes)



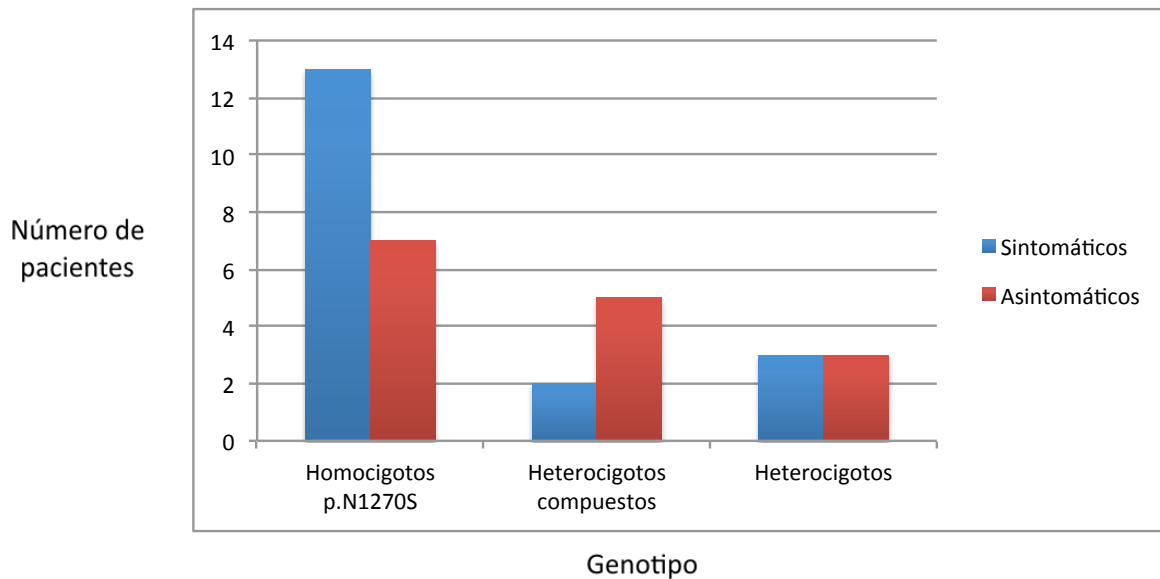
Cuadro 8: Costa Rica. Estadísticas descriptivas de la edad a la fecha del diagnóstico (años) de los pacientes con enfermedad de Wilson, según tipo de mutación. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015. (n = 33 pacientes)

Tipo Mutación	Pacientes	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Q1	Q2	Q3	I. de C. al 95%		Prueba F	Prueba Levene
									Límite inferior	Límite superior	Valor de p	
<b>Total</b>	33	8,7	3,6	1,0	17,0	6,0	9,0	11,0	6,9	11,0	0,6737	0,0621
Heterocigoto	13	9,0	4,5	1,0	17,0	5,5	9,0	12,5	6,9	11,0		
Homocigoto	20	8,4	2,9	2,0	13,0	6,2	9,0	11,0	6,8	10,1		

## RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO (GENOTIPO VERSUS PRESENTACIÓN SINTOMÁTICA)

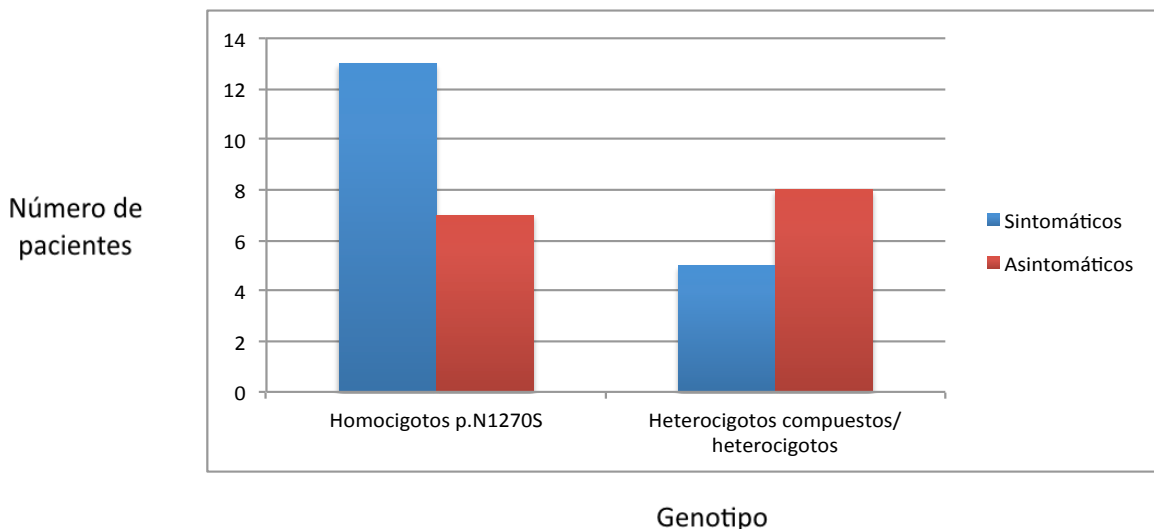
No existe asociación entre la clase de mutación (heterocigoto, heterocigoto compuesto y homocigoto) con la condición sintomática del paciente (asintomático y sintomático); es decir, las dos variables son independientes; prueba chi-cuadrado ( $p = 0,242$ ) (Figura 6).

Figura 6: Costa Rica. Relación entre el genotipo y síntomas. Pacientes con enfermedad de Wilson. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 33 pacientes).



Se agruparon los pacientes heterocigotos con los heterocigotos compuestos. No existe asociación entre la clase de mutación (heterocigoto y homocigoto) con la condición sintomática del paciente (asintomático y sintomático); es decir, las dos variables son independientes; prueba chi-cuadrado ( $p = 0,135$ ) (Figura 7).

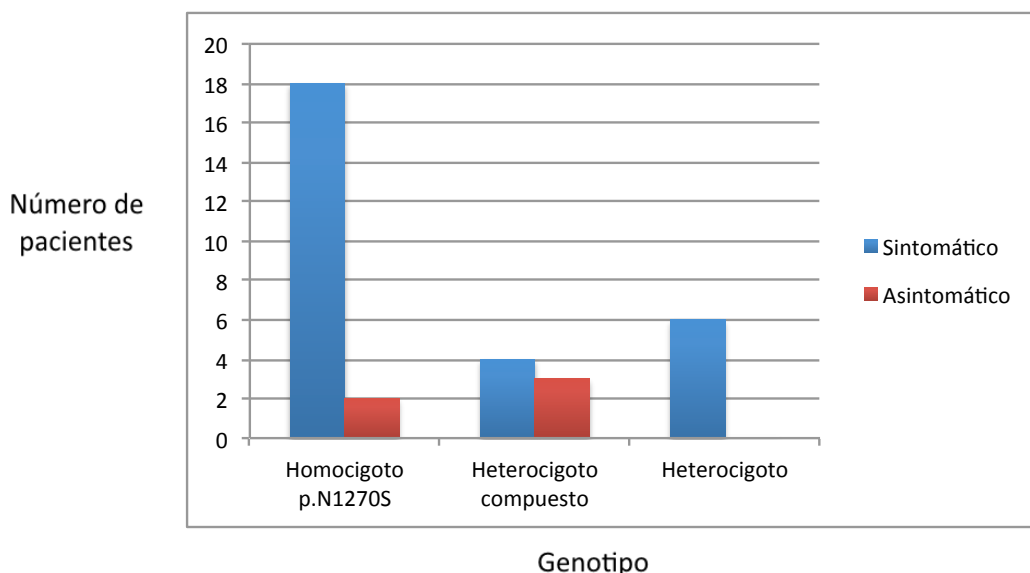
Figura 7: Costa Rica. Relación entre genotipo y síntomas. Pacientes con enfermedad de Wilson. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 33 pacientes).



Se documentó que a pesar de ser pacientes asintomáticos porque no habían tenido ningún síntoma clínico notable, algunos de ellos en la primera evaluación tenían evidencia de una hepatitis subclínica. Por lo tanto se, reagruparon a los pacientes, esta vez definiendo sintomático como con síntomas clínicos y/o hepatitis subclínica, definida como la elevación de AST o ALT más de 2-3 veces el límite superior esperado.

No existe asociación entre la clase de mutación (heterocigoto, heterocigoto compuesto y homocigoto) con la condición sintomática del paciente (asintomático y sintomático); es decir, las dos variables son dependientes; prueba chi-cuadrado de Pearson ( $p = 0,059$ ) (Figura 8).

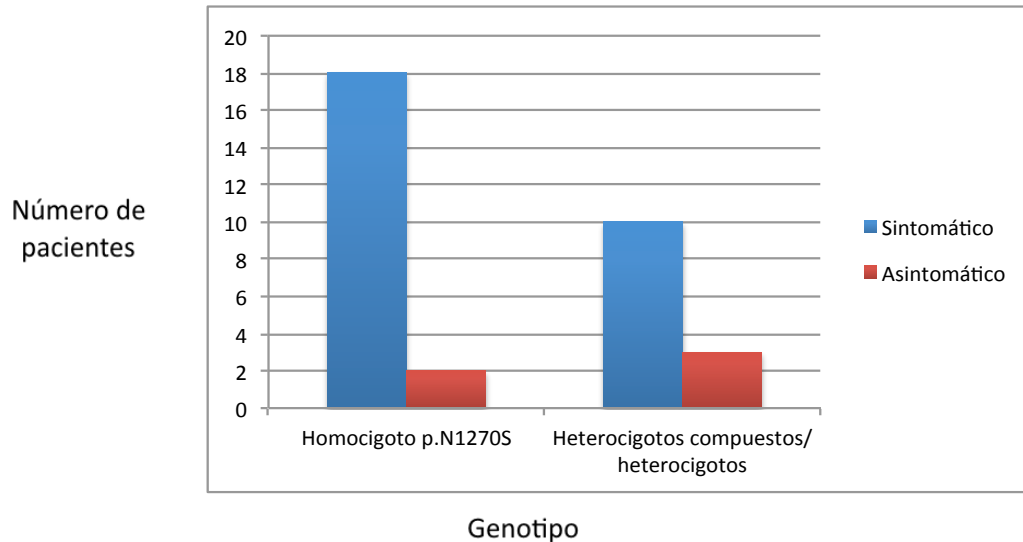
Figura 8: Costa Rica. Relación entre el genotipo y síntomas y/o elevación AST/ALT. Pacientes con enfermedad de Wilson. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 33 pacientes).





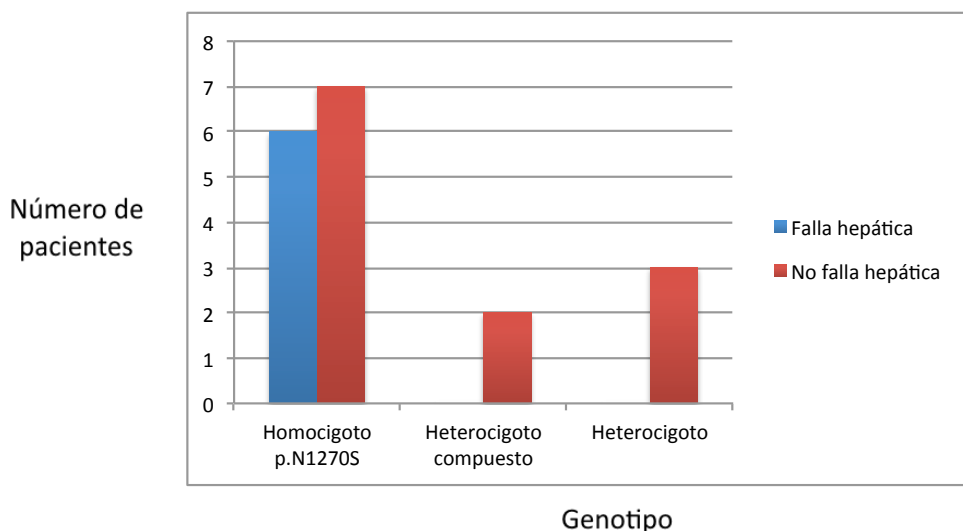
Se agruparon los pacientes heterocigotos con los heterocigotos compuestos, esta vez también incluyendo a los pacientes con elevación de transaminasas como sintomáticos. No existe asociación entre el genotipo y la presentación o no de síntomas al agruparlos de esta forma; prueba chi-cuadrado ( $p = 0.306$ ) (Figura 9).

Figura 9: Costa Rica. Relación entre el genotipo y síntomas y/o elevación AST/ALT. Pacientes con enfermedad de Wilson. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 33 pacientes).



No existe asociación entre la clase de mutación (heterocigoto, heterocigoto compuesto y homocigoto) con la falla hepática aguda (falla hepática aguda y no falla hepática aguda); es decir, las dos variables son independientes; prueba chi-cuadrado de Pearson ( $p = 0,177$ ). (Figura 10).

Figura 10: Costa Rica. Relación entre el genotipo y falla hepática. Pacientes con enfermedad de Wilson. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 33 pacientes).



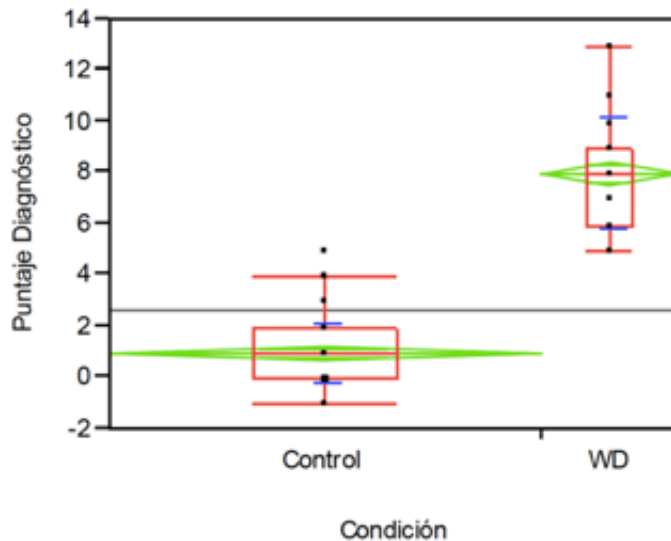
## ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

El grupo de controles consistía de 106 pacientes en total. Todos menores de 18 años. Constan del cohorte de pacientes que se habían enviado a realizar un análisis molecular pero quienes no cumplían criterios diagnósticos. La gran mayoría de estos pacientes tenían antecedentes heredofamiliares de enfermedad de Wilson o se estaban estudiando por alguna hepatopatía. El promedio de edad de este grupo fue de  $13.2 \pm 7.2$  años. Del total de pacientes 53.7% eran mujeres y 46.2% eran hombres. Se utilizó este grupo de pacientes como pacientes controles para cálculos de especificidad y sensibilidad ya que ellos no tenían WD.

El promedio de puntaje diagnóstico de los pacientes con WD y controles fue  $2,7 \pm 3,3$  puntos, el menor puntaje -1,0 punto y el mayor puntaje 13,0 puntos, el 75% de los pacientes obtuvo 4,7 puntos o menos; el promedio de puntaje diagnóstico de los pacientes controles fue  $1,0 \pm 1,1$  puntos, el menor puntaje -1,0 punto y el mayor puntaje 5,0 puntos, el 75% de los pacientes obtuvo 2,0 puntos o menos; el promedio de puntaje diagnóstico de los pacientes enfermos (WD) fue  $8,0 \pm 2,1$  puntos, el menor puntaje 5,0 puntos y el mayor puntaje 13,0 puntos, el 75% de los pacientes obtuvo 9,0 puntos o menos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 5% entre estos dos promedios; es decir, el promedio del puntaje diagnóstico de los pacientes controles es menor que el promedio del puntaje diagnóstico de los pacientes enfermos (WD). ( $p < 0,0001$ ) (Figura 11 y Cuadro 9).

La prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, resulta significativa al 5% ( $p = 0,0007$ ); es decir, no se cumple el supuesto de igualdad de varianzas; entonces se utilizó la prueba robusta para igualdad de medias Welch Anova ( $p < 0,0001$ ) que supone varianzas desiguales y confirma que los dos promedios son diferentes estadísticamente.

Figura 11: Costa Rica. Estadísticas descriptivas del puntaje diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Wilson, según condición. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015. (n = 140 pacientes).



Cuadro 9: Costa Rica. Estadísticas descriptivas del puntaje diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Wilson, según condición. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 140 pacientes).

Condición paciente	Pacientes	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Q1	Q2	Q3	I. de C. al 95%		Prueba F	Prueba Levene
									Límite inferior	Límite superior	Valor de p	
<b>Total</b>	140	2,7	3,3	-1,0	13,0	0,0	1,0	4,7				
<b>Control</b>	106	1,0	1,1	-1,0	5,0	0,0	1,0	2,0	0,7	1,2	<0,0001	0,0007
<b>WD</b>	34	8,0	2,1	5,0	13,0	6,0	8,0	9,0	7,5	8,5		

Se procedió a calcular la especificidad y sensibilidad de cada una de las pruebas diagnósticas. Valores del puntaje diagnóstico mayores o iguales a cuatro puntos, son considerados como una prueba positiva, el complemento prueba negativa.

**Cuadro 10: Costa Rica. Sensibilidad y especificidad del puntaje como prueba diagnóstica para pacientes con WD. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 140 pacientes).**

Puntaje diagnóstico en relación a la condición del paciente		Verdadero Diagnóstico	
		Enfermo	Sano
Prueba Diagnóstica	Positiva	34	3
	Negativa	0	103

Medidas	Porcentaje	I. de C. al 95%	
Sensibilidad	100,0	89,8	100,0
Especificidad	97,2	92,0	99,0
Valor predictivo positivo	91,9	78,7	97,2
Valor predictivo negativo	100,0	96,3	100,0
Proporción de falsos positivos	2,8	1,0	8,0
Proporción de falsos negativos	0,0	0,0	10,2
Valor global de la prueba (Exactitud)	97,9	93,9	99,3

Se utilizaron las siguientes definiciones:

**Sensibilidad:** Es la probabilidad de tener un resultado en la prueba positivo (anormal), dado que se está enfermo; es decir, clasifica a los verdaderos enfermos.

**Especificidad:** Es la probabilidad de tener un resultado en la prueba negativo (normal), dado que no está enfermo; es decir, clasifica a los verdaderos sanos.

**Valor predictivo positivo:** Es la probabilidad de tener la enfermedad, dado que el resultado de la prueba es positivo (anormal). Depende fundamentalmente de la especificidad del test y de la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada.

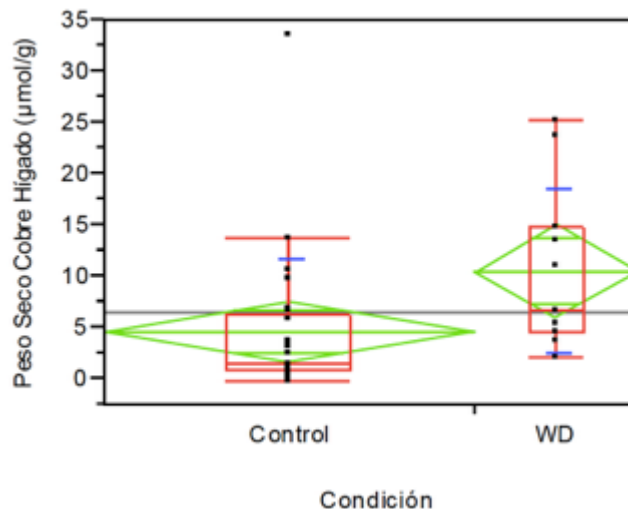
**Valor predictivo negativo:** Es la probabilidad de no tener la enfermedad, dado que el resultado de la prueba es negativo (normal). Depende fundamentalmente de la sensibilidad del test y de la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada.

**Valor global de la prueba:** Es la probabilidad de que un individuo sea clasificado correctamente por la prueba.

El promedio de cobre sérico en tejido seco de los enfermos y controles fue  $6,5 \pm 7,8 \mu\text{mol/g}$ , el menor valor de cobre sérico en tejido seco fue  $0,0 \mu\text{mol/g}$  y el mayor valor de cobre sérico en tejido seco fue  $33,7 \mu\text{mol/g}$ , el 75% de los pacientes tuvo valores de cobre sérico en tejido seco  $9,2 \mu\text{mol/g}$  o menos; el promedio de cobre sérico en tejido seco de los pacientes controles fue  $4,7 \pm 7,1 \mu\text{mol/g}$ , el menor valor de cobre sérico en tejido seco fue  $0,0 \mu\text{mol/g}$  y el mayor valor  $33,7 \mu\text{mol/g}$ , el 75% de los pacientes tuvo valores de cobre sérico en tejido seco de  $6,4 \mu\text{mol/g}$  o menos; el promedio de cobre sérico en tejido seco de los pacientes con enfermedad de Wilson (WD) fue  $10,6 \pm 8,0 \mu\text{mol/g}$ , el menor valor de cobre sérico en tejido seco fue  $2,1 \mu\text{mol/g}$  y el mayor valor  $25,3 \mu\text{mol/g}$ , el 75% de los pacientes tuvo valores de cobre sérico en tejido seco de  $14,8 \mu\text{mol/g}$  o menos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 5% entre estos dos promedios; es decir, el promedio del cobre sérico en tejido seco de los pacientes controles es menor que el promedio del cobre sérico en tejido seco de los pacientes enfermos (WD). ( $p = <0,0344$ ) (Figura 12 y Cuadro 11).

La prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, resulta no significativa al 5% ( $p = 0,2837$ ); es decir, se cumple el supuesto de igualdad de varianzas.

Figura 12: Costa Rica. Estadísticas descriptivas del peso seco de cobre en tejido hepático ( $\mu\text{mol/g}$ ) de los pacientes con enfermedad de Wilson y los controles. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 36 pacientes).



**Cuadro 11: Costa Rica. Estadísticas descriptivas del peso seco de cobre en tejido hepático ( $\mu\text{mol/g}$ ) de los pacientes con enfermedad de Wilson y los controles. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 36 pacientes).**

Condición paciente	Pacientes	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Q1	Q2	Q3	I. de C. al 95%		Prueba F	Prueba Levene
									Límite inferior	Límite superior	Valor de p	
<b>Total</b>	36	6,5	7,8	0,0	33,7	1,1	3,8	9,2				
<b>Control</b>	25	4,7	7,1	0,0	33,7	0,9	1,5	6,4	1,7	7,7	<0,0344	0,2837
<b>WD</b>	11	10,6	8,0	2,1	25,3	4,7	6,8	14,8	6,0	15,1		

Se procedió a calcular la especificidad y sensibilidad del peso seco de cobre en tejido hepático. Valores del cobre sérico en tejido seco mayores o iguales a  $4,0 \mu\text{mol/g}$ , son considerados como una prueba positiva, el complemento prueba negativa (Cuadro 12).

**Cuadro 12: Costa Rica. Sensibilidad y especificidad del peso seco de cobre en tejido hepático prueba diagnóstica para pacientes con WD. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 140 pacientes).**

Cobre sérico en tejido seco en relación a la condición del paciente		Verdadero Diagnóstico	
		Enfermo	Sano
<b>Prueba Diagnóstica</b>	<b>Positiva</b>	9	8
	<b>Negativa</b>	2	17

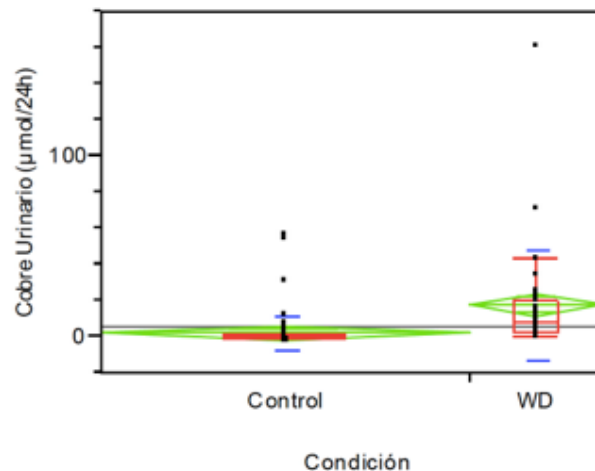
Medidas	Porcentaje	I. de C. al 95%
Sensibilidad	81,8	52,3 94,9
Especificidad	68,0	48,4 82,8
Valor predictivo positivo	52,9	31,0 73,8
Valor predictivo negativo	89,5	68,6 97,1
Proporción de falsos positivos	32,0	17,2 51,6
Proporción de falsos negativos	18,2	5,1 47,7
Valor global de la prueba (Exactitud)	72,2	56,0 84,2

El promedio de cobre urinario para tanto WD como controles fue  $6,5 \pm 18,8 \mu\text{mol/24h}$ , el menor valor de cobre urinario fue  $0,0 \mu\text{mol/24h}$  y el mayor valor de cobre urinario fue  $162,1 \mu\text{mol/24h}$ , el 75% de los pacientes tuvo valores de cobre urinario  $4,0 \mu\text{mol/24h}$  o menos; el promedio de cobre urinario de los

controles fue  $2,4 \pm 9,2$  micromol/24h, el menor valor de cobre urinario fue  $0,0$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$  y el mayor valor  $57,0$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$ , el 75% de los controles tuvo valores de cobre urinario de  $0,8$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$  o menos; el promedio de cobre urinario de los pacientes con enfermedad de Wilson (WD) fue  $18,0 \pm 30,7$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$ , el menor valor de cobre urinario fue  $0,6$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$  y el mayor valor  $162,1$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$ , el 75% de los pacientes tuvo valores de cobre urinario de  $21,1$   $\mu\text{mol}/24\text{h}$  o menos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 5% entre estos dos promedios; es decir, el promedio del cobre sérico en tejido seco de los pacientes controles es menor que el promedio del cobre sérico en tejido seco de los pacientes enfermos (WD). ( $p = <0,0344$ ) (Figura 13 y Cuadro 13)

La prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, resulta significativa al 5% ( $p <0,0001$ ); es decir, no se cumple el supuesto de igualdad de varianzas; entonces se utilizó la prueba robusta para igualdad de medias Welch Anova ( $p < 0,0091$ ) que supone varianzas desiguales y confirma que los dos promedios son diferentes estadísticamente.

Figura 13: Costa Rica. Estadísticas descriptivas del cobre urinario ( $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ) de los pacientes con enfermedad de Wilson y controles. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 117 pacientes).



Cuadro 13: Costa Rica. Estadísticas descriptivas del cobre urinario (micromol/24h) de los pacientes con enfermedad de Wilson y controles. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 117 pacientes).

Condición paciente	Pacientes	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Q1	Q2	Q3	I. de C. al 95%		Prueba F	Prueba Levene
									Límite inferior	Límite superior	Valor de p	
<b>Total</b>	117	6,5	18,8	0,0	162,1	0,0	0,6	4,0				
<b>Control</b>	86	2,4	9,2	0,0	57,0	0,0	0,1	0,8	0,0	6,1	<0,0001	<0,0001
<b>WD</b>	31	18,0	30,7	0,6	162,1	3,0	7,8	21,1	11,7	24,2		

Valores del cobre urinario mayores o iguales a 1,28  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ , son considerados como una prueba positiva, el complemento prueba negativa (Cuadro 14).

**Cuadro 14: Costa Rica. Sensibilidad y especificidad del cobre urinario como prueba diagnóstica para pacientes con WD. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 140 pacientes).**

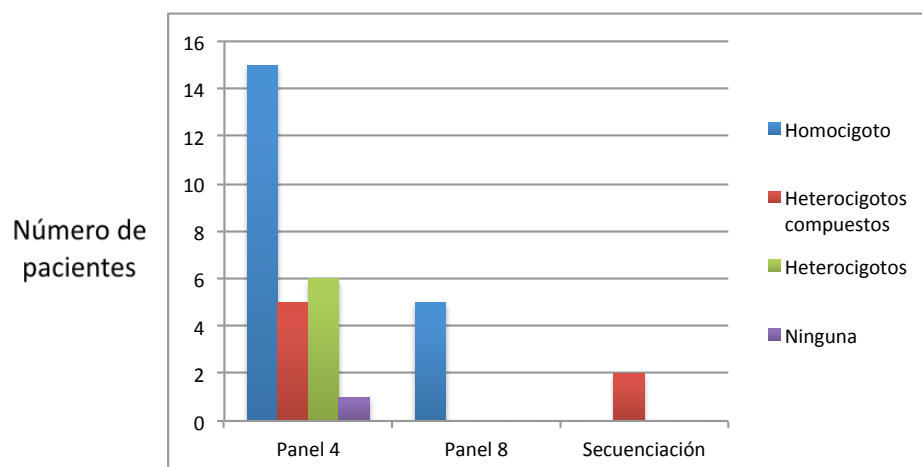
Cobre urinario en relación a la condición del paciente		Verdadero Diagnóstico	
		Enfermo	Sano
Prueba Diagnóstica	Positiva	28	11
	Negativa	2	75

Medidas	Porcentaje	I. de C. al 95%	
Sensibilidad	93,3	78,7	98,2
Especificidad	87,2	78,5	92,7
Valor predictivo positivo	71,8	56,2	83,5
Valor predictivo negativo	97,4	91,0	99,3
Proporción de falsos positivos	12,8	7,3	21,5
Proporción de falsos negativos	6,7	1,8	21,3
Valor global de la prueba (Exactitud)	88,8	81,8	93,3

En cuanto al análisis molecular se utilizaron diferentes estrategias analíticas. Estas variaron ya que inicialmente se realizaba un panel de 4 mutaciones, posteriormente se expandió a 7 mutaciones y luego se incluyó la capacidad de secuenciar todos los exones del gen ATP7B (Figura 14).

**Figura 14: Diagnóstico genético según estrategia analítica.**





Se tomaron variantes patológicas en ambos alelos como positivos, es decir, pacientes homocigotos y heterocigotos compuestos como una prueba positiva. Los pacientes a quienes no se les detectó ambas mutaciones, ya sean heterocigotos o sin mutación detectada son considerados como prueba negativa (Cuadro 15).

**Cuadro 15: Costa Rica. Sensibilidad y especificidad del análisis molecular como prueba diagnóstica para pacientes con WD. HNN. Enero del 2010 a diciembre del 2015 (n = 140 pacientes).**

Clase de mutación en relación a la condición del paciente		Verdadero Diagnóstico	
		Enfermo	Sano
Prueba Diagnóstica	Positiva	27	0
	Negativa	7	106

Medidas	Porcentaje	I. de C. al 95%	
Sensibilidad	79,4	63,2	89,7
Especificidad	100,0	96,5	100,0
Valor predictivo positivo	100,0	87,5	100,0
Valor predictivo negativo	93,8	87,8	97,0
Proporción de falsos positivos	0,0	0,0	3,5
Proporción de falsos negativos	20,6	10,3	36,8
Valor global de la prueba (Exactitud)	95,0	90,0	97,6

**Cuadro 16: Costa Rica. Resumen de sensibilidad y especificidad para las cuatro pruebas diagnósticas**

Prueba	Corte	Sensibilidad (IC%)	Especificidad (IC%)
Puntaje diagnóstico	4	100 (89.8 – 100.0)	97.2 (92.0 – 99.0)
Peso seco cobre tejido hepático (µmol/g)	4	81.8 (52.3 – 94.9)	68.9 (48.4 – 82.8)
Cobre urinario (µmol/24 horas)	1.32	93.3 (78.8 – 98.2)	87.2 (78.5 – 92.7)
Análisis molecular	Heterocigoto compuesto ó homocigoto	79.4 (63.2 – 89.7)	100 (96.5 – 100.0)

## Discusión y Conclusiones

### CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN

La población costarricense con enfermedad de Wilson pediátrica constó de un total de 34 pacientes. La edad promedio de presentación  $8.8 \pm 3.4$  años fue menor a la reportada en estudios previos costarricenses ( $10 \pm 2.2$  años)(16). La reducción de la edad al diagnóstico se atribuye al diagnóstico de pacientes asintomáticos gracias al análisis molecular y al tamizaje en cascada de pacientes subsecuentes familiares.

A pesar de que la edad promedio de hombres era un poco mayor a la de las mujeres no hubo diferencia significativa lo cual es lo esperable al ser una patología autosómica recesiva que afecta a ambos sexos igualmente.

La prevalencia de la enfermedad para todo el país en los años que abarca el estudio fue de 2,2 : 100,000, con la mayor prevalencia corregida por la población de cada provincia en San José de 3,9 : 100,000. El estudio pediátrico costarricense anterior reportó un total de 35 pacientes en un periodo de 14 años (1992 hasta 2006). El periodo del presente estudio es de 14 años (porque incluye pacientes a quienes se les realizó diagnóstico clínico previo al 2010 y posteriormente se les realizó un análisis molecular), para un total de 34 pacientes, muy similar a los hallazgos anteriores(16). La prevalencia en la muestra representativa pediátrica es menor a la reportada anteriormente en el estudio de adultos probablemente por la historia natural de la enfermedad ya que la edad de presentación usual es entre los 5 – 35 años(3). Es decir, hay muchos pacientes que no se diagnostican en la edad pediátrica y se diagnostican de adultos. Adicionalmente, existe la posibilidad que haya un sobre diagnóstico en adultos que tienen alteraciones de parámetros bioquímicos pero que son portadores y se manejan como enfermos.

Los pacientes eran en su mayoría de San José, del Valle Central, lo que es congruente con la distribución geográfica que se había reportado por los estudios previos costarricenses(3).

La mayoría de los pacientes pediátricos tienen una presentación hepática, como está descrito en la literatura. En comparación al estudio previo en la población pediátrica costarricense el porcentaje de pacientes con presentación hepática disminuyó del un 69% a un 50% y el porcentaje de pacientes asintomáticos aumentó de un 17% a un 47%. Únicamente se presentó un paciente como una anemia hemolítica Coombs negativa (un 3%) comparado con 4 pacientes en el estudio previo. Ningún paciente tuvo presentación neurológica

en este estudio, cuando previamente se había descrito 1 paciente. El estudio previo en la población pediátrica costarricense reportó 6 fallecidos en un periodo similar de tiempo, en este periodo falleció únicamente 1 paciente. La caída en la mortalidad es probablemente secundaria a un diagnóstico temprano en pacientes asintomáticos gracias al diagnóstico molecular.

Las mutaciones halladas en la población pediátrica con enfermedad de Wilson fueron 4: p.N1270S, p.M645R, p.L708P, p.T1434M. La mutación más frecuente fue la p.N1270S, todos los pacientes homocigotos presentaron esta mutación. De hecho el 58.8% de los pacientes eran homocigotos para la mutación p.N1270S y 75% de los pacientes presentaron por lo menos un cambio para esta mutación. La alta prevalencia de una única mutación aunado a la distribución geográfica central son altamente sugestivas de un efecto fundador en Costa Rica.

### **RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO (GENOTIPO VERSUS EDAD)**

Se compararon genotipo contra edad de presentación. La hipótesis es que los pacientes homocigotos se manifiestan con síntomas a una menor edad. Se agruparon los genotipos en homocigotos, heterocigotos compuestos y heterocigotos y se compararon contra edad. Al mismo tiempo también se agruparon en homocigotos y heterocigotos + heterocigotos compuestos. La prueba del chi-cuadrado fue no significativa en ambos casos. Por lo que se rechaza la hipótesis alterna. No hay relación entre el genotipo y la edad de presentación.

A pesar de no haber hallazgos estadísticamente significativos, sí hubo un mayor número de casos de pacientes homocigotos p.N1270S con presentación sintomática. Adicionalmente, únicamente los pacientes homocigotos p.N1270S fueron los que se presentaron con falla hepática. Es posible que una muestra más grande podría dar resultados significativos apoyando la teoría que esta variante patogénica es más deletérea.

### **RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO (GENOTIPO VERSUS PRESENTACIÓN SINTOMÁTICA)**

Se compararon genotipo contra la presencia o no de síntomas. La hipótesis es que los pacientes homocigotos se manifiestan con síntomas más frecuentemente. Se agruparon los genotipos en homocigotos, heterocigotos compuestos y heterocigotos y se compararon contra presencia de síntomas al momento del diagnóstico. Al mismo tiempo también se agruparon en homocigotos y heterocigotos + heterocigotos compuestos. La prueba del chi-cuadrado fue no significativa en ambos casos. Por lo que se rechaza la hipótesis alterna. No hay relación entre el genotipo y la manifestación de síntomas.

Se re-definió sintomático e incluyeron pacientes que tenían elevación de transaminasas y en esta comparación la hipótesis alterna se rechaza con un valor de  $p = 0.059$ , mucho más cercano a la significancia estadística. Es decir, se rechaza la hipótesis alterna.

Finalmente, también se compararon los genotipos contra el tipo de presentación clínica más agresiva que es la falla hepática. Todos los pacientes con falla hepática eran homocigotos para la mutación p.N1270S. La prueba de Chi-cuadrado de Pearson tuvo un resultado  $p = 0.177$ , no significativo.

Establecer una relación genotipo-fenotipo es sumamente retador porque es intentar asociar dos variables que no se pueden aislar en los estudios en humanos. El metabolismo del cobre es complejo y el daño que se produce en los órganos blanco por su acúmulo es en gran parte por estrés oxidativo. Por lo tanto, los estudios sobre la relación genotipo-fenotipo se verán afectados por idiosincrasias metabólicas individuales como la capacidad de manejo del estrés oxidativo.

Adicionalmente, existen hay factores modificadores de la enfermedad que pueden afectar las manifestaciones clínicas. Por ejemplo, el consumo diario de cobre, la capacidad de absorción, otras proteínas reguladoras del metabolismo de este metal, entre otros factores.

Aunque se rechazan la hipótesis alternas para establecer una relación entre el genotipo y el fenotipo es posible que con un mayor número de pacientes sí se pueda establecer una relación. Apoyando la hipótesis que la mutación p.N1270S es más deletérea, estando en un dominio con actividad ATPasa.

## **ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD**

Se evaluaron la sensibilidad y la especificad del peso seco de cobre en tejido hepático, del cobre urinario, del puntaje diagnóstico y del análisis molecular.

Para las 3 pruebas: puntaje diagnóstico, cobre urinario y peso seco de cobre hubo una diferencia estadísticamente significativa comparando los promedios entre los grupos controles y enfermos. Lo que se interpreta como que son pruebas útiles para el diagnóstico.

El puntaje diagnóstico es la prueba más sensible para el diagnóstico de pacientes con enfermedad de Wilson. El puntaje abarca tanto historia clínica, examen físico, parámetros bioquímicos y análisis molecular, en ese sentido es esperable que tenga un alto valor global (exactitud) porque es una forma muy integral de evaluar al paciente.

El estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson es el peso seco de cobre en tejido hepático, usualmente reportado con sensibilidades del alrededor del 95%. La sensibilidad calculada para esta prueba fue del 81.8% menor a lo reportado en la literatura. Es posible que la menor sensibilidad se deba al diagnóstico en un grupo de pacientes que es pediátrico donde no hay un acúmulo de cobre a niveles tan altos como el estandarizado para adultos.

En cuanto al cobre urinario, se obtuvo una mayor sensibilidad (del 93%) en comparación a lo reportado por la literatura (alrededor del 80%). Este valor se debe interpretar con cautela ya que en algunos pacientes se tuvo que seleccionar uno de múltiples cobres urinarios realizados a través del proceso de evaluación clínica. Se intentó tomar el primer valor en la mayoría de los casos. Sin embargo, en varios pacientes controles con múltiples cobres urinarios se observó que habían muestras con valores elevados que al repetirse eran indetectables, se tomaron muestras representativas para ese pacientes. Es decir, es posible que el cobre urinario tenga una menor sensibilidad que la reportada. Además, es una muestra que técnicamente es difícil de recolectar. En ocasiones tampoco era completamente claro si una dada muestra de cobre urinario era o no la prueba de reto con D-penicilamina por no contar con el expediente completo.

Se obtuvo una menor sensibilidad para el análisis molecular (de alrededor del 79% versus un 90% reportado en la literatura). Se atribuye esta menor sensibilidad al hecho que inicialmente se realizaba en Costa Rica únicamente un panel que incluía las 4 mutaciones más frecuentes. En esta muestra de pacientes hay 6 pacientes heterocigotos a quienes únicamente se les realizó el panel para estas 4 mutaciones. Estos pacientes con clínica compatible para enfermedad de Wilson serían candidatos para la secuenciación del gen. Con la secuenciación se podría detectar la otra mutación y esto mejoraría la sensibilidad de la prueba. Otro limitante que puede afectar la sensibilidad de la prueba es que la técnica analítica utilizada en este centro secuenciación por el método de Sanger por lo que no se logran detectar delecciones grandes o duplicaciones.

Por el tipo de población que existe en Costa Rica, el panel de 8 exones que es el que se realiza actualmente a los niños enviados para análisis molecular tiene un alto poder diagnóstico ya que se detectan la gran mayoría de niños únicamente con ese panel (alrededor del 80%). Además, únicamente se han logrado documentar estas 4 mutaciones las cuales están incluidas en el panel de 8 exones.

El diagnóstico de la enfermedad de Wilson se debe realizar de forma ordenada, en pasos iniciando por la historia clínica, examen físico, pruebas bioquímicas y finalmente análisis molecular. Realizar el análisis molecular de forma simultánea al inicio de la evaluación es sumamente importante en pacientes que se presenten con falla hepática aguda, en quienes habrá

alteración de los parámetros bioquímicos y donde un diagnóstico expedito puede ayudar a tomar decisiones del manejo del paciente y/o tener repercusiones para efecto de consejería genética en familiares afectados en casos de fallecimientos.

## Limitaciones y sesgos del estudio

Las limitaciones de este estudio muchas son propias de los estudios retrospectivos observacionales. Hubo expedientes incompletos para algunos de los pacientes. Algunos pacientes con WD no tenían datos de un árbol genealógico. Del total de pacientes referidos al Centro Nacional para la Prevención de Discapacidades no todos tenían anotado en el expediente si se habían referido o no por antecedentes heredofamiliares de enfermedad de Wilson o detallaban cuál familiar ó pariente de qué grado era el que estaba afectado.

Para algunos casos específicos hubo factores de confusión. Específicamente dos pacientes quienes tenían un diagnóstico claro de otra enfermedad genética quienes tenían falsamente elevado valores bioquímicos como cobre en tejido hepático y cobre urinario. Estos dos pacientes tenían una hemocromatosis y el otro una distrofia muscular. Para ambos, la elevación de estos parámetros bioquímicos generaba un puntaje diagnóstico mayor a 4, sin embargo, clínicamente no tenían enfermedad de Wilson ya que por ejemplo, no tenían ceruloplasminas bajas y no se documentaron mutaciones para ellos.

Otra limitante del estudio fue la variación en la metodología de cuantificación de la ceruloplasmina. Inicialmente, este parámetro bioquímico se cuantificaba en el Hospital San Juan de Dios mediante su actividad de oxidasa. Posteriormente se comenzó a utilizar una prueba colorimétrica cuantificando anticuerpos contra esta proteína. No existe una forma de relacionar la cuantificación de una metodología con la otra y por lo tanto al no tener suficientes muestras para un valor no se pudo tomar la ceruloplasmina como prueba diagnóstica en nuestro análisis.

Un posible sesgo y/o limitante del estudio fue el tamaño de la población que fungió como una muestra aleatoria representativa por el comportamiento natural de la enfermedad. Es decir, por un lado es posible que con un mayor número de pacientes se demuestre con mayor poder que sí existe relación entre el genotipo (homocigotos) y la manifestación de síntomas o el debut de la enfermedad como falla hepática aguda.

Como último punto de limitante es que la presentación clínica de la enfermedad de Wilson se da entre los 5 – 35 años. Es decir, en la población pediátrica tenemos un subregistro de la enfermedad porque hay pacientes que no tienen antecedentes heredofamiliares y no han tenido síntomas clínico en la niñez.

## Recomendaciones

La primera recomendación es que a cada paciente se le realice una evaluación completa metodológica que incluya historia clínica con antecedentes heredofamiliares. Esta evaluación debe ser en pasos, protocolaria e incluir los parámetros bioquímicos que se evalúan como parte del puntaje diagnóstico de la EASL.

La segunda recomendación es que si los pacientes no tiene datos clínicos ni parámetros bioquímicos, ni sintomatología sospechosa y únicamente tienen antecedentes heredofamiliares de enfermedad de Wilson entonces el análisis molecular se debe realizar únicamente cuando sean parientes en primer grado de un afectado. Si los antecedentes son de más de primer grado y no hay historia de consanguinidad entonces la posibilidad es que sean portadores. No es ético realizar estudios de portadores en menores de edad.

Como tercera recomendación sería ideal poder retomar este grupo de pacientes más adelante ó realizar un estudio de un cohorte prospectivo para tener más casos y aumentar la muestra. De esta forma se podrían continuar análisis de si existe o no una relación entre el genotipo y el fenotipo y si la mutación p.N1270S es más deletérea. Idealmente, se podrían hacer estudios funcionales para valorar en qué grado afecta la capacidad de unión de la ceruloplasmina al cobre y de excreción de cobre por las vías biliares.

La última recomendación es que se complemente este estudio para caracterizar a la población y de análisis de mutaciones con la población adulta.



## Anexos

**ANEXO 1** Criterios diagnósticos clínicos/bioquímicos de la enfermedad de Wilson. Punteo desarrollado en la 8<sup>ta</sup> Reunión Internacional de la Enfermedad de Wilson, Leipzig, 2012.

Signos y síntomas clínicos típicos		Otros exámenes	
<b>Anillo Kayser-Fleischer</b>		<b>Cobre seco en hígado (en ausencia de colestasis)</b>	
Presente	2	>5x sobre límite superior normal (>4 µmol/g)	2
Ausente	0	0.8-4 µmol/g	1
		Normal (<0.8µmol/g)	-1
		Gránulos de rodanina positivos	1
<b>Síntomas neurológicos</b>		<b>Cobre urinario (en ausencia de hepatitis aguda)</b>	
Severos	2	Normal	0
Leves	1	1-2x sobre límites superior normal	1
Ausentes	0	>2x sobre límite superior normal	2
		Normal, pero >5x con D-penicilamina	2
<b>Ceruloplasmina sérica</b>		<b>Análisis de mutaciones</b>	
Normal (>0.2g/L)	0	En ambos cromosomas	2
0.1-0.2 g/L	1	En 1 cromosoma	1
<0.1 g/L	2	No se detectaron mutaciones	0
<b>Anemia hemolítica Coombs-negativa</b>			
Presente	1		
Ausente	0		
<b>PUNTAJE TOTAL</b>		<b>Evaluación:</b>	
≥4		Diagnóstico establecido	
3		Diagnóstico posible, se necesitan más exámenes	
≤2		Diagnóstico muy improbable	

Fereneci, P. EASL. Clinical Practice Guidelines: Wilson's Disease. Journal of Hepatology. 2012. Vol 56 j: 671-685.

## **ANEXO 2 Hoja recolección de datos**

Caracterización clínica, epidemiológica y genética de los pacientes pediátricos con Enfermedad de Wilson en el Hospital Nacional de Niños de Costa Rica (CCSS) del 2010 al 2015.

**Investigador:** Mónica Penón Portmann, Cód. 12351

**Subinvestigadores:** Dra. Gabriela Jiménez Arguedas Cód. 5930, Dr. Alfredo Mora Guevara Cód. 3473, Dra. Mildred Jiménez Hernández Cód. MQC 1331, Dr. Ramsés Badilla Porras Cod. 7213, Dr. Manuel Saborío Rocafort Cód. 2641, Dra. Stephanie Lotz Cód. 11023

**Recolección de datos por:** \_\_\_\_\_

### **Criterios inclusión:**

Rango de edad: 0 -18 años al momento del diagnóstico

Género: no existe restricción en el enrolamiento de participantes que se base en el género del paciente.

Etnia: no existe restricción en el enrolamiento de participantes que se base en la etnia del paciente.

Inclusión de clases especiales o participantes vulnerables: niños (menores de edad). No existe restricción en el enrolamiento de participantes pertenecientes a otras clases especiales o pacientes vulnerables; en caso de su presencia, como es el caso de la población pediátrica, se tomarán las medidas pertinentes según dictamina la legislación vigente.

Pruebas de laboratorio y Gabinete: En el presente estudio de revisión retrospectiva de registros médicos de los pacientes pediátricos costarricenses con enfermedad de Wilson del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica en el periodo de tiempo establecido, no se contempla la realización de pruebas de laboratorio ni de gabinete.

Otros: Pacientes pediátricos costarricenses con diagnóstico clínico de enfermedad de Wilson, según los criterios 8<sup>ta</sup> Reunión Internacional de la Enfermedad de Wilson realizada en Leipzig, 2001; y con cribado genético previamente realizado en dicho centro. Esto con la finalidad de identificar las mutaciones más frecuentes en la población costarricense.

### **Criterios de exclusión:**

Pacientes cuyo expediente esté incompleto o incluya menos del 60% de las variables a evaluar.

**Fecha recolección de datos:** \_\_\_\_\_

**Hoja adaptada para Epi-data**

1. Consecutivo (identificación paciente para estudio): \_\_\_\_\_
2. Fecha de nacimiento: Día / Mes/Año
3. Edad: \_\_\_\_ meses
4. Sexo:
  1. Masc \_\_\_\_ 0. Fem \_\_\_\_
5. Provincia de residencia:
  1. San José
  2. Alajuela
  3. Cartago
  4. Heredia
  5. Puntarenas
  6. Guanacaste
  7. Limón
6. Cantón: \_\_\_\_\_
7. Distrito: \_\_\_\_\_
8. Fecha de diagnóstico: Día / Mes/Año: \_\_\_\_\_
9. Edad al momento del diagnóstico: \_\_\_\_ Calculada en meses
10. Laboratorios al momento de presentación:
  - a. AST \_\_\_\_\_
  - b. ALT \_\_\_\_\_
  - c. GGT \_\_\_\_\_
  - d. FA \_\_\_\_\_
  - e. Bilis: Totales \_\_\_\_, directa \_\_\_\_, indirecta \_\_\_\_\_
  - f. Albúmina \_\_\_\_\_
  - g. Tiempos coagulación: TP \_\_\_\_, TPT \_\_\_\_, INR \_\_\_\_\_
  - h. Hemoglobina \_\_\_\_\_
  - i. RDW % \_\_\_\_\_
  - j. Coombs: 1. Positivo \_\_\_\_, 2. negativo \_\_\_\_\_
  - k. Anemia hemolítica: 1. Sí \_\_\_\_, 2. No \_\_\_\_.
  - l. Retis: \_\_\_\_%
  - m. Hemoglobina reticulocitaria: \_\_\_\_\_
  - n. Leucos \_\_\_\_\_
  - o. Plaquetas \_\_\_\_\_
  - p. Ceruloplasmina sérica \_\_\_\_\_
  - q. Cupruria 24 horas \_\_\_\_\_
  - r. Anillo Kayser-Fleischer 1. Sí \_\_\_\_, 2. No \_\_\_\_\_
  - s. Biopsia hepática: 1. Si (si sí, entonces seleccionar i, ii, iii, iv, v), 2. no
    - i. Fibrosis: \_\_\_\_\_
    - ii. Esteatosis: \_\_\_\_\_
    - iii. Hepatitis crónica/activa: \_\_\_\_\_
    - iv. Otro: \_\_\_\_\_
    - v. No se realizó \_\_\_\_\_
  - t. # biopsia: \_\_\_\_\_
  - u. Autopsia: 1. Sí \_\_\_\_, 2. No \_\_\_\_\_. Si sí: Número: \_\_\_\_\_

- v. Cobre sérico en tejido seco: valor \_\_\_\_\_
  - i. >5x sobre límite superior normal (>4 $\mu$ mol/g) \_\_\_\_\_
  - ii. 0.8-4  $\mu$ mol/g \_\_\_\_\_
  - iii. Normal (<0.8 $\mu$ mol/g) \_\_\_\_\_
  - iv. Gránulos de rhodanina positivos \_\_\_\_\_
- 11. Forma presentación de la enfermedad:
  - a. Asintomático \_\_\_\_\_
  - b. Afección hepática \_\_\_\_\_
    - i. Asintomático \_\_\_\_\_
    - ii. Fallo hepático fulminante \_\_\_\_\_
    - iii. Hepatitis aguda \_\_\_\_\_
    - iv. Hepatitis crónica \_\_\_\_\_
  - c. Síntomas neuropsiquiátricos: \_\_\_\_\_
    - i. Psicosis \_\_\_\_\_
    - ii. Demencia \_\_\_\_\_
    - iii. Encefalopático \_\_\_\_\_
    - iv. Otro \_\_\_\_\_
- 12. Síntomas neurológicos: 1. Severo \_\_\_\_\_, 2. Leve \_\_\_\_\_, 3. Ausentes \_\_\_\_\_
- 13. Condición actual del paciente: 1 Vivo \_\_\_\_\_, 2. Fallecido \_\_\_\_\_
  - i. Causa de muerte: relacionada con Wilson: 1. Si \_\_\_\_\_, 2. No \_\_\_\_\_, 3. Indeterminado \_\_\_\_\_
- 14. Puntaje para diagnóstico: # (suma de a-g) 1. >4 puntos diagnóstico establecido, 2. 3 puntos diagnóstico posible (se necesitan más estudios), 3.  $\leq$ 2 puntos (diagnóstico muy poco probable)
  - a. KF: 1. Sí (2 puntos), 2. No (0 puntos)
  - b. Síntomas neurológicos: 1. Severo (2puntos), 2. Leve (1 punto), 3. Ausentes (0 puntos)
  - c. Ceruloplasmina sérica: 1. Normal (>0.2g/L; 0 puntos), 2. 0.1-0.2g/L (1 punto), 3. <0.1g/L (2puntos)
  - d. Anemia hemolítica Coombs negativa: 1. Presente (1 punto), 2. Ausente (0puntos)
  - e. Peso seco de cobre en hígado (en ausencia colestasis): 1. >5X el límite superior; >4 $\mu$ mol/g (2 puntos), 2. 0.8-4 $\mu$ mol/g (1 punto), 3. Normal; <0.8 $\mu$ mol/g (-1punto), 4. Gránulos de rhodanina positivos (1 punto)
  - f. Cobre urinario (en la ausencia de hepatitis aguda): 1. Normal (0puntos), 2. 1-2X el límite superior (1 punto), 3. >2X el límite superior (2puntos), 4. Normal pero >5X después de iniciar la D-penicilamina (2 puntos)
- 15. Análisis molecular: Análisis mutaciones: 1. En 1 cromosoma (1 punto) \_\_\_\_\_, 2. En ambos cromosomas (4 puntos) \_\_\_\_\_, 3. No se detectaron mutaciones (0 puntos) \_\_\_\_\_.
- 16. Mutación documentada: \_\_\_\_\_ 1. heterocigoto compuesto \_\_\_\_\_, 2. homocigoto \_\_\_\_\_
- 17. Tratamiento actual:
  - a. D-penicilamina (dosis/kg) \_\_\_\_\_, tiempo en tratamiento (meses) \_\_\_\_\_

b. Sales de Zinc (dosis/kg): \_\_\_\_\_

c. Transplante: \_\_\_\_\_

d. Plasmaféresis \_\_\_\_\_

e. Otro \_\_\_\_\_

18. Tiempo en tratamiento hasta normalización de transaminasas: \_\_\_\_\_

19. AHF enfermedad Wilson: a. Sí \_\_\_\_\_ (Si, sí árbol genealógico), b. No \_\_\_\_\_.

## Bibliografía

1. Aggarwal A, Chandhok G, Todorov T, Parekh S, Tilve S, Zibert A, et al. Wilson disease mutation pattern with genotype-phenotype correlations from Western India: Confirmation of p.C271\* as a common indian mutation and identification of 14 novel mutations. *Ann Hum Genet.* 2013;77(4):299–307.
2. Abdel Ghaffar TY, Elsayed SM, Elnaghy S, Shadeed A, Elsobky ES, Schmidt H. Phenotypic and genetic characterization of a cohort of pediatric Wilson disease patients. *BMC Pediatr* [Internet]. 2011;11(1):56. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/11/56>
3. Hevia-Urrutia F, Alvarado-Echeverria I, Sanabria-Castro A, Sanchez-Molina M, Meza-Sierra L, Parajeles-Vindas A, et al. National Alliance for Wilsons Disease: Health Policy in Costa Rica. *Hepato Med Policy* [Internet]. 2017;2:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s41124-016-0012-x>
4. Centeno Cerdas C. Descripción mutacional del gen ATP7B en pacientes pediátricos con enfermedad de Wilson en la población pediátrica Costarricense. [San José]: Universidad de Costa Rica; 2009.
5. Aggarwal A, Aggarwal N, Nagral A, Jankharia G, Bhatt M. A novel global assessment scale for Wilson's disease (GAS for WD). *Mov Disord.* 2009;24(4):509–18.
6. Association E. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease (European association or the study of the liver. *J Hepatol.* 2012;56(3):671–85.
7. Patil M, Sheth KA, Krishnamurthy AC, Devarbhavi H. A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *J Clin Exp Hepatol* [Internet]. 2013;3(4):321–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2013.06.002>
8. Shah AB1, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, Parano E, Pavone L, Evgrafov O, Ivanova-Smolenskaya IA, Annerén G, Westermarck K, Urrutia FH, Penchaszadeh GK, Sternlieb I, Scheinberg IH, Gilliam TC PK. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet.* 1997;Aug(61(2)):317–28.
9. Sturm E, Piersma FE, Tanner MS, Socha P, Roberts EA, Shneider BL. Controversies and Variation in Diagnosing and Treating Children With Wilson Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2016;63(1):82–7. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005176-201607000-00018>

10. Henao A, Valverde K. Anemia hemolítica como presentación inicial de enfermedad de Wilson: un caso pediátrico. *Arch Argent Pediatr*. 2016;114(6):436–9.
11. Manolaki N, Nikolopoulou G, Daikos GL, Panagiotakaki E, Tzetis M, Roma E, et al. Wilson Disease in Children: Analysis of 57 Cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2009;48(1):72–7. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005176-200901000-00012>
12. Nicastro E, Ranucci G, Vajro P, Vegnente A, Iorio R. Re-evaluation of the diagnostic criteria for Wilson disease in children with mild liver disease. *Hepatology*. 2010;52(6):1948–56.
13. Ferenci P, Munda PS, Vogel W, Jessner W, Gschwantler M, Stauber R, et al. Diagnostic Value of Quantitative Hepatic Copper Determination in Patients With Wilson's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3565(5):811–8.
14. Review I. Diagnosis of Wilson Disease in Young Children: Molecular. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2012;15(4):197–209.
15. Jimenez-Hernandez M. Estudio Molecular de Enfermedad de Wilson. San Jose; 2013.
16. Jiménez G, Cambronero V, Morales C, Mora A, Guzmán C, Jiménez-Rivera C. Enfermedad de Wilson: experiencia pediátrica en Costa Rica. *Gastroenterol Hepatol*. 2009;32(4):274–8.
17. Rodriguez-Castro KI, Hevia-Urrutia FJ, Sturniolo GC. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J Hepatol*. 2015;7(29):2859–70.
18. Mukherjee S, Dutta S, Majumdar S, Biswas T, Jaiswal P, Sengupta M, et al. Genetic defects in Indian Wilson disease patients and genotype-phenotype correlation. *Parkinsonism Relat Disord* [Internet]. 2014;20(1):75–81. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=psyc11&NEWS=N&AN=2014-02629-014>
19. Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, et al. Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am J Med Genet*. 2004;131A(2):168–73.
20. Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, Kozak L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab*. 2005;86(1–2):277–85.

21. Fischer RT, Soltys KA, Squires Jr. RH, Jaffe R, Mazariegos G V, Shneider BL. Prognostic scoring indices in Wilson disease: a case series and cautionary tale. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2011;52(4):466–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415672>
22. Iida M, Terada K, Sambongi Y, Wakabayashi T, Miura N, Koyama K, et al. Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1998;428(3):281–5.
23. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiol Rev* [Internet]. 2007;87(3):1011–46. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00004.2006>
24. Ferenci P. Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1315(1):1–5.