



REVISIÓN

Enfermedad de Wilson

María Dolores Hernández Villén^{a,*} y Sara López Martínez^b

^a Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

^b Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Virgen de la Luz, Cuenca, España

Recibido el 24 de febrero de 2010; aceptado el 23 de febrero de 2011

Disponible en Internet el 21 de abril de 2011

PALABRAS CLAVE

Enfermedad
de Wilson;
ATP7B;
Cobre;
Ceruloplasmina

Resumen La enfermedad de Wilson es un trastorno del metabolismo del cobre que se hereda de forma autosómica recesiva. Está causada por mutaciones en el gen ATP7B que codifica para una ATPasa tipo P implicada en el transporte de cobre dentro del hepatocito, tanto al interior del aparato de Golgi para su incorporación a la apoceruloplasmina como en la excreción biliar del exceso de metal del organismo. El defecto en la función de esta proteína da lugar a la acumulación progresiva de cobre, primero en el hígado y posteriormente en el encéfalo y en otros tejidos, con manifestaciones clínicas principalmente hepáticas, neurológicas, psiquiátricas y oftalmológicas. Actualmente sigue representando un desafío diagnóstico, debido a que es una patología poco común, con manifestaciones clínicas inespecíficas y limitaciones en la exactitud de las diversas pruebas diagnósticas disponibles. El riesgo de que permanezca sin diagnosticar y progrese a muerte, junto con la existencia de un tratamiento eficaz, ponen de manifiesto la importancia de que se realice un diagnóstico correcto y temprano, siendo esencial para ello la aportación del laboratorio clínico.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Wilson's disease;
ATP7B;
Copper;
Caeruloplasmin

Wilson's disease

Abstract Wilson's disease is an autosomal recessive disorder of copper metabolism. It is caused by mutations in the ATP7B gene, which encodes a P-type ATPase that functions in the transport of copper inside the hepatocyte, both into the trans-Golgi compartment for incorporation into apo-caeruloplasmin, and into the bile, for excretion of the excess metal. Defective function of this protein leads to progressive copper accumulation, first in the liver but ultimately in the brain and other tissues, with mainly hepatic, neurological, psychiatric and ophthalmologic signs and symptoms. Nowadays, it still represents a diagnostic challenge due to it being an uncommon disease, with unspecific clinical manifestations, and limitations in the accuracy of the available diagnostic tests. The risk that it remains undiagnosed together with the availability of effective treatments stresses the importance of an early and correct diagnosis, with the clinic laboratory playing an essential role.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mdhernandezv@sescam.jccm.es (M.D. Hernández Villén).

Introducción

La enfermedad de Wilson (EW) o degeneración hepatolenticular progresiva es un trastorno hereditario del metabolismo del cobre, caracterizado por un defecto de su excreción biliar que conduce a su acumulación en el organismo, principalmente en hígado y encéfalo, con efectos tóxicos por daño oxidante y progresión invariable a muerte en ausencia de tratamiento.

Ha sido considerada una enfermedad rara, más frecuente en algunas poblaciones, fundamentalmente en las que existe consanguinidad. La prevalencia citada en la mayor parte de la bibliografía es de un caso por cada 30.000 habitantes con una frecuencia de portadores de 1/90. Sin embargo, esta estimación se realizó hace más de 20 años¹ y debido a la dificultad para su diagnóstico, probablemente se trate de una subestimación. Con el aumento de la sensibilidad de las técnicas diagnósticas, estudios más recientes muestran prevalencias más altas².

Fue descrita inicialmente en 1912 por Kinnier Wilson, como un trastorno neurodegenerativo asociado con cirrosis hepática, de presentación familiar³. Sin embargo, su relación con el cobre fue establecida posteriormente en diversos trabajos que demostraron la presencia de un exceso de este metal en los tejidos de individuos afectados⁴⁻⁶. En 1952 se puso de manifiesto la deficiencia de ceruloplasmina en el suero de estos pacientes^{7,8} y en 1974 fue documentada la alteración de la excreción biliar de cobre⁹.

A pesar de que en las últimas décadas se ha producido un gran avance en el conocimiento de la enfermedad a nivel molecular, habiendo sido identificado tanto el defecto bioquímico como el genético, actualmente sigue representando un desafío diagnóstico debido a que es una patología poco común, con manifestaciones clínicas inespecíficas y para la que existen diversas pruebas diagnósticas pero todas ellas con posibles falsos positivos (FP) y negativos (FN). Por ello esta entidad sigue siendo una alternativa diagnóstica en los casos de enfermedad hepática y/o neurológica no explicable por otras causas.

El riesgo de que permanezca sin diagnosticar y progrese a muerte junto con la existencia de un tratamiento eficaz que puede revertir o enlentecer su avance en pacientes sintomáticos, o prevenir su aparición en los presintomáticos, detectados mediante estudios familiares, pone de manifiesto la importancia de que se realice en todos estos casos un diagnóstico correcto y temprano.

Fisiopatología

El cobre es un elemento traza esencial que actúa como cofactor de transferencia electrónica de diversas cuproenzimas como la ferroxidasa o ceruloplasmina (EC 1.16.3.1), citocromo-c oxidasa (EC 1.9.3.1), superóxido-dismutasa (EC 1.15.1.1), dopamina β-hidroxilasa (EC 1.14.17.1), tirosinasa (EC 1.14.18.1), y lisil oxidasa (EC 1.4.3.13). Participa así en procesos vitales como la oxidación del hierro, respiración celular, eliminación de radicales libres, biosíntesis de catecolaminas y melanina, así como en la formación de tejido conectivo¹⁰. Sin embargo, ese mismo potencial oxidoreductor le capacita en situaciones de exceso para generar radicales libres altamente tóxicos para el organismo¹¹.

Presente en alimentos como semillas, crustáceos, hígado y leguminosas, el cobre procedente de la dieta, una vez captado por los enterocitos duodenales, puede quedar unido a proteínas intracelulares (metalotioneínas) o bien ser exportado a la circulación a través de la membrana basolateral de esas células gracias a una proteína transportadora denominada ATP7A. Mutaciones en el gen que codifica este transportador dan lugar a la enfermedad de Menkes, caracterizada por un déficit de cobre en el organismo debido a un defecto en su absorción intestinal.

Unido a albúmina, transcupreína e histidina, el cobre es transportado por la vena porta al hígado, órgano de reserva y principal regulador de su homeostasis, puesto que la excreción biliar es la vía fundamental para su eliminación del organismo, no existiendo circulación enterohepática significativa¹². El hepatocito lo capta gracias a los transportadores de membrana CTR1 y CTR2^{13,14}. Debido a su potencial tóxico las concentraciones de cobre libre dentro de la célula son extremadamente bajas, uniéndose a una familia de proteínas llamadas chaperonas de cobre que liberan el metal específicamente a las distintas rutas que sintetizan cuproenzimas^{15,16}. ATOX1 es la chaperona que lo transfiere a una adenosina trifosfatasa tipo P (ATP7B), implicada tanto en el transporte activo de cobre al interior del aparato de Golgi para su incorporación a la apoceruloplasmina, como en su excreción biliar del organismo. La distribución intracelular de esta ATPasa, así como su función son sensibles al contenido de cobre en la célula. Cuando éste es normal o bajo la enzima se encuentra localizada en las membranas de la red trans-Golgi y actúa introduciendo el cobre y cediéndolo a la apoceruloplasmina sintetizada en el hígado, dando lugar a ceruloplasmina (holoceruloplasmina). Sin embargo, en situaciones de sobrecarga cúprica en el hepatocito, la ATP7B saturada de este metal redistribuye pasando a formar parte de vesículas y vacuolas que migran hacia los canalículos biliares promoviendo así la excreción biliar del exceso de cobre¹⁷.

El defecto metabólico responsable de la enfermedad de Wilson está en la disfunción de la proteína ATP7B que da lugar a la acumulación de cobre, inicialmente en el hígado. En principio, la metalotioneína y el glutatión del citoplasma celular juegan un papel importante protegiendo a la célula de sus efectos tóxicos, pero cuando se sobrepasa su capacidad, el metal libre produce un daño oxidativo en el hepatocito junto con activación de la apoptosis^{18,19}, liberándose al torrente circulatorio lo que provoca elevación de la concentración sérica de cobre libre. Éste será distribuido al resto de los tejidos donde también se podrá acumular, aumentando asimismo, su excreción en orina. La sobrecarga de cobre en los hematíes conduce a hemólisis intravascular con prueba de Coombs negativa. Adicionalmente la disfunción del enzima ATP7B da lugar a un defecto en la formación de ceruloplasmina, liberándose a la circulación apoceruloplasmina que carece de actividad ferroxidasa y cuya vida media es más corta que la de la ceruloplasmina, alcanzando así una concentración plasmática inferior. Puesto que la ceruloplasmina contiene más del 90% del cobre presente en la circulación, la concentración de cobre total sanguíneo habitualmente desciende de forma paralela a la de esta proteína.

Estructuralmente la proteína ATP7B consta de 8 dominios transmembrana que forman un canal para el paso del cobre,

y dos extremos terminales (-NH₂ y -COOH) intracitoplasmáticos. En el extremo amino terminal esta enzima posee 6 dominios MBS con regiones MxCxC fijadoras de cobre a las que se unen hasta 6 átomos del metal. Tras esta unión se inicia un ciclo en el que intervienen otros dominios intracitoplasmáticos característicos de la familia de enzimas ATPasa tipo P, e importantes para su actividad como el dominio N, esencial para la fijación del ATP (contiene la región SEHPL con una histidina en posición 1069) y el dominio P, con un ácido aspártico para la aceptación del fosfato liberado tras la hidrólisis del ATP. Ésta proporcionará la energía necesaria para el transporte del cobre y posteriormente se producirá la defosforilación del dominio P gracias a la actividad fosfatasa del dominio A, lo que permitirá el inicio de un nuevo ciclo de transporte¹⁷.

Herencia y defecto genético

Estudios familiares indicaron que la enfermedad mostraba un patrón de herencia autosómico recesivo²⁰. Los enfermos son por tanto homocigotos o, más frecuentemente, heterocigotos compuestos, siendo la penetrancia cercana al 100%²¹. Los progenitores son al menos, portadores heterocigotos de un alelo mutado y los hermanos tienen una probabilidad del 25% de padecer la enfermedad y un 50% de ser portadores heterocigotos, en tanto que el riesgo de enfermedad de los hijos es de 1/180.

Mediante análisis de ligamiento génico, en 1985 fue establecida la localización del gen responsable ATP7B, en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14.3)²² y en 1993 el gen fue identificado y clonado, demostrándose que se trataba de un locus muy conservado evolutivamente, que codificaba para una ATPasa transportadora de cobre y que compartía un alto grado de homología con el gen ATP7A, ligado al cromosoma X, que se expresa en la mayor parte de tejidos excepto en el hígado, y se traduce en una ATPasa similar a ATP7B, implicada en la enfermedad de Menkes²³⁻²⁵.

Se han descrito más de 400 mutaciones distintas en el gen ATP7B, tanto a lo largo de sus 21 exones como en su promotor y en regiones intrónicas. Cerca del 60% son mutaciones de sentido equivocado (*missense*)²⁶. Aunque la mayoría son raras y están presentes en una única familia algunas son más frecuentes observándose su predominio en determinadas poblaciones. Así, la mutación más común en pacientes del norte, centro y este de Europa es H1069Q, que da lugar a la sustitución de una histidina por una glutamina en la posición 1069 de la ATPasa. Sin embargo, esta mutación parece estar ausente en el este de Asia donde predomina R778L²⁷.

Muchos estudios se han centrado en establecer correlaciones genotipo-fenotipo. Sin embargo, esto resulta difícil debido al elevado número de mutaciones detectadas, lo que da lugar a que la mayoría de enfermos sean heterocigotos compuestos. Además la presentación clínica de la enfermedad es muy heterogénea, por lo que se ha sugerido que factores ambientales y variaciones genéticas en otros genes podrían modular la expresión clínica de la enfermedad. Pero independientemente de esto último, parece que mutaciones diferentes en el gen ATP7B pueden dar lugar a distintos efectos funcionales en la proteína, y por tanto, es probable que el tipo de mutación también modifique la expresión clínica. Así, mutaciones más graves como las que conllevan un

cambio en el marco de lectura o la aparición de un codón de parada, se cree que alteran completamente la función de la proteína por lo que sería de esperar un fenotipo más grave¹⁷.

Presentación clínica

Las manifestaciones clínicas de la EW pueden mostrar una considerable variación. Se han encontrado diferencias tanto en la edad de inicio como en la gravedad y tipo de presentación²⁸. Lo más frecuente es que se diagnostique entre los 5 y los 35 años²⁹, aunque también se han descrito casos en menores de 5 y en mayores de 50 años^{30,31}, por lo que no se puede descartar la enfermedad usando únicamente el criterio de la edad.

Clínicamente puede presentarse como una enfermedad hepática o como un trastorno neuropsiquiátrico progresivo en el que la alteración hepática puede ser menos aparente u ocasionalmente ausente. En la VIII Reunión Internacional sobre las Enfermedades de Wilson y Menkes (2001) se propuso una clasificación fenotípica de los pacientes sintomáticos³².

Manifestaciones hepáticas

Son las más frecuentes entre los 5 años y la adolescencia. La presentación hepática es la manifestación inicial en el 40-50% de pacientes^{33,34}. El espectro de enfermedad hepática abarca desde cuadros asintomáticos con hepatomegalia, esplenomegalia o elevación de aminotransferasas que se detectan de forma incidental, hasta casos de fallo hepático fulminante. En algunos pacientes puede cursar como una hepatitis aguda con marcadores virales negativos y en otros presentar características indistinguibles de una hepatitis autoinmune³⁵, pero la forma de presentación más común es una enfermedad hepática crónica activa en la que puede haber evidencia de cirrosis bien compensada o descompensada. También pueden aparecer episodios transitorios de ictericia, asociada a hemólisis de bajo grado cuando la enfermedad hepática no es aún evidente²⁹.

En alrededor de un 5% de los pacientes aparece como un fallo hepático fulminante³⁶. Éste es más frecuente en mujeres, en la segunda década de la vida, y se presenta de forma aguda con ictericia y ascitis que progresa a encefalopatía, fallo hepático y con frecuencia fallo renal. Signos clave que ayudan a reconocer su origen son la presencia de anemia hemolítica con prueba de Coombs negativa (que también contribuye a la hiperbilirrubinemia), y de coagulopatía. También es característica una concentración de cobre total en suero normal o alta a expensas del aumento de cobre libre (consecuencia de su liberación masiva a la circulación) junto con la elevación marcada de la concentración de cobre en orina³⁷.

La progresión a carcinoma hepatocelular ha sido considerada rara en la EW, pero es probable que ocurra con más frecuencia de lo estimado²⁹.

Manifestaciones neurológicas

En el 40-45% de pacientes con EW, los primeros síntomas son neurológicos y neuropsiquiátricos^{33,34}. Suelen

presentarse durante la 2.^a y 3.^a décadas de la vida. Estos son principalmente trastornos del movimiento como distonía, incoordinación y temblores. También pueden aparecer disartria y disfagia, trastornos del sistema nervioso autónomo, así como pérdida de memoria, cefalalgias y convulsiones²¹.

Manifestaciones psiquiátricas

Alrededor del 50% de los pacientes con daño neurológico posee algún antecedente de trastornos de la conducta²¹. Otras manifestaciones son la depresión, ansiedad y psicosis³⁸.

Manifestaciones oftalmológicas

Mediante exploración oftalmológica con lámpara de hendidura se detectan anillos de Kayser-Fleischer (KF) por depósito del cobre en la córnea, en más del 95% de enfermos con manifestaciones neurológicas o psiquiátricas pero sólo en alrededor del 50% con clínica hepática. Tras el tratamiento suele observarse su regresión. También puede aparecer una catarata central «en girasol» por acumulación del cobre en el cristalino^{39,40}.

Manifestaciones más raras

Otras manifestaciones más raras incluyen lesiones renales con síndrome tubular, desmineralización ósea por la hipercalcemia y la hiperfosfatemia que provoca la disfunción tubular, miocardiopatía, pancreatitis, hipoparatiroidismo, abortos espontáneos repetidos e infertilidad³⁸.

Diagnóstico

La EW debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de individuos con anormalidades de la función hepática y/o trastornos neurológicos inexplicables por otras causas más frecuentes, fundamentalmente en niños o adultos jóvenes o cuando aparece hemólisis²⁹.

Puesto que ninguna prueba de forma aislada tiene suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la EW, éste requiere la utilización combinada de diversos datos clínicos, bioquímicos y genéticos, siendo inicialmente esencial la sospecha clínica de estos casos.

Como ayuda al diagnóstico, fundamentalmente en aquellos casos en los que éste presenta más dificultad (pacientes que no presentan sintomatología neurológica), ha sido propuesto un sistema de puntuación basado en la combinación de datos clínicos (presencia o ausencia de anillos de KF, síntomas neuropsiquiátricos y anemia hemolítica) y de laboratorio (concentraciones de cobre en orina de 24 h y de ceruloplasmina sérica, cuantificación de cobre en tejido hepático o en su defecto tinción de rodamina, y análisis de mutaciones)³². También se usan diversos algoritmos diagnósticos como los de la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD)²⁹. En éstos, los datos bioquímicos que se valoran inicialmente ante la sospecha de enfermedad son la disminución de la concentración sérica de ceruloplasmina (< 0,20 g/L) y el incremento del cobre en orina de 24 h (> 0,6 µmol/día = > 40 µg/día). Estos resultados

junto con la presencia de anillos de KF establecerán el diagnóstico, mientras que la ausencia de alguno de ellos indicará la realización de una biopsia hepática, reservándose generalmente el estudio molecular para aquellos casos en los que el contenido de cobre hepático no muestre resultados definitivos.

Examen oftalmológico

La presencia de anillos de Kayser-Fleischer es un importante indicador de la enfermedad aunque estos pueden no aparecer con mayor frecuencia en pacientes que presentan únicamente manifestaciones hepáticas y en aquellos todavía presintomáticos. Por otra parte, hay que tener en cuenta que también pueden estar presentes ocasionalmente en enfermos con colestasis crónicas como la cirrosis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria, así como en neonatos con colestasis. Sin embargo, la diferenciación en estos casos suele resultar sencilla.

Pruebas de función hepática

La actividad aminotransferasa en suero está generalmente aumentada excepto en edades muy tempranas. Sin embargo, en muchos individuos el grado de elevación puede ser moderado y no reflejar necesariamente la gravedad de la enfermedad²⁹. La descompensación hepática origina elevación de la concentración de bilirrubina sérica y reducción de la capacidad de síntesis proteica que se refleja en una disminución de la albúmina y de los factores de coagulación con prolongación del tiempo de protrombina. La presencia de anemia hemolítica contribuye a la hiperbilirrubinemia²¹. En casos de fallo hepático fulminante las elevaciones séricas de AST y ALT son típicamente mucho menores que las observadas en otras causas de fallo hepático agudo, y también la de fosfatasa alcalina que es desproporcionadamente baja en contraste con la ictericia, observándose con frecuencia una relación fosfatasa alcalina (UI/L)/bilirrubina total (mg/dL) séricas menor de dos³⁷.

Concentración de ceruloplasmina (ferroxidasa) sérica

La ceruloplasmina es una glicoproteína sintetizada principalmente en el hígado, que contiene de seis a ocho sitios de fijación de cobre por molécula. Posee actividad ferroxidasa, estando implicada en el metabolismo del hierro. Así su ausencia, en la rara enfermedad hereditaria de la aceruloplasminemia, no produce acúmulo de cobre, mientras que estos pacientes pueden presentar hemosiderosis^{41,42}.

Una concentración extremadamente baja (< 0,05 g/L) debería ser considerada una fuerte evidencia para el diagnóstico de EW, especialmente en asociación con la presencia de anillos de Kayser-Fleischer²⁹.

Disminuciones menos intensas hacen necesaria la realización de más pruebas diagnósticas ya que es posible encontrar bajas concentraciones de ceruloplasmina en otras situaciones fisiopatológicas como en cualquier causa de hipoproteínemia (desnutrición, malabsorción, cirrosis, síndrome nefrótico), en la deficiencia de cobre, en enfermedades muy poco

Tabla 1 Factores que provocan elevación (FN) y descenso (FP) de las concentraciones sanguíneas de ceruloplasmina**Falsos negativos**

Inflamación, infección, neoplasia
Estrógenos: embarazo, anticonceptivos orales
Metodología analítica

Falsos positivos

Recién nacidos (< 6 meses)
Malnutrición (Kwashiorkor)
Pérdida proteica renal o digestiva (malabsorción)
Cirrosis
Deficiencia de cobre
Aceruloplasminemia hereditaria
Síndrome de Menkes
Hepatitis fulminante
20% Heterocigotos de E. de Wilson
Nutrición parenteral carente de cobre
Enfermedades neurológicas raras

frecuentes como el síndrome de Menkes y la aceruloplasminemia, así como en recién nacidos, hepatitis fulminante, en el 20% de individuos heterocigotos para la EW y en pacientes con alimentación parenteral carente de cobre^{37,41} (tabla 1).

Concentraciones séricas de ceruloplasmina dentro del intervalo de referencia no excluyen el diagnóstico, observándose con mayor frecuencia en pacientes con EW que presentan únicamente manifestaciones hepáticas⁴³. La elevación de estas concentraciones puede ser debida a la presencia de inflamación, puesto que la ceruloplasmina es un reactante de fase aguda, o al efecto de los estrógenos, en situaciones como el embarazo o el tratamiento con anolíticos.

Otra causa de falsos resultados negativos está relacionada con la metodología analítica. La ceruloplasmina sérica puede ser medida tanto por métodos inmunoquímicos como por métodos enzimáticos. Estos últimos miden sólo la molécula con actividad enzimática (holoceruloplasmina o ceruloplasmina), mientras que los primeros miden tanto ceruloplasmina como apoceruloplasmina (forma inactiva y de menor semivida presente también en la circulación), sobrevalorando la concentración de la proteína. Por ello, algunos autores han recomendado la medición de la actividad oxidasa de la enzima para el diagnóstico de la EW⁴⁴⁻⁴⁶.

Por otra parte, con frecuencia se usa el valor de 0,20 g/L como límite inferior del intervalo de referencia de la concentración sérica de ceruloplasmina en adultos, considerándolo como punto de decisión clínica. Sin embargo, los valores de referencia varían con factores como el método analítico, el material de calibración y la edad. En relación con esta última, las concentraciones son menores en neonatos alcanzando la concentración de adultos alrededor de los 6 meses. Posteriormente aumentan más hasta llegar a un máximo a los 2-3 años y después descienden lentamente hasta la adolescencia alcanzando entonces la concentración de adultos. Además mujeres embarazadas o en tratamiento con estrógenos presentan concentraciones más altas⁴⁷.

Respecto a la metodología, a pesar de que existe un material de referencia primario (CRM 470/ RPPHS), estudios recientes están poniendo de manifiesto la falta de

estandarización de los métodos que miden ceruloplasmina⁴⁸. Esto da lugar a que los resultados obtenidos por diferentes métodos no sean transferibles lo que imposibilita el uso de valores discriminantes fijos y obliga a utilizar puntos de corte específicos para cada técnica⁴⁹.

Así mismo, factores preanalíticos relacionados con la conservación de la muestra también podrían dar lugar a diferencias entre resultados como parecen indicar datos de un programa de control de calidad externo⁵⁰.

También hay que tener en cuenta el tipo de población y la presencia de diferentes tipos de mutaciones. Así en un estudio realizado en China en el que ha sido determinada la exactitud diagnóstica de las concentraciones de ceruloplasmina sérica, medida por métodos inmunoquímicos, para el diagnóstico de EW, encuentran que el mejor punto de corte para la población estudiada es 0,14 g/L, es decir, inferior a 0,20 g/L, por lo que sugieren que cada laboratorio debería establecer este punto de corte para su población que no necesariamente tiene que coincidir con el límite inferior del intervalo de referencia⁴⁷.

Concentración de cobre sérico total

Puesto que la ceruloplasmina contiene más del 90% del cobre presente en la circulación, la concentración de cobre sérico total habitualmente evoluciona de forma paralela a la de esta proteína sérica, pudiendo verse afectada por las mismas causas de falsos positivos y negativos. Así, en pacientes con EW generalmente desciende aunque en aquellos que cursan con fallo hepático agudo, la concentración de cobre sérico puede estar marcadamente elevada debido a la liberación masiva de metal desde el hígado, a pesar de la disminución de la concentración de ceruloplasmina²⁹. Su utilidad es por ello limitada.

La técnica utilizada habitualmente para su determinación en el laboratorio clínico es la espectrofotometría de absorción atómica de llama. Los intervalos de referencia en mujeres y hombres adultos son respectivamente 12,6-24,3 $\mu\text{mol/L}$ (80-154 $\mu\text{g/dL}$) y 11,0-22,0 $\mu\text{mol/L}$ (70-140 $\mu\text{g/dL}$), aunque de forma similar a los de la concentración de ceruloplasmina, varían con la edad, el embarazo, la terapia con estrógenos y antiepilépticos⁵¹.

Se recomienda el empleo de suero obtenido en tubos de vacío específicos para elementos traza (una vez comprobado que no presentan concentraciones detectables de cobre) o bien con jeringa de plástico, y evitar los tubos con gel separador. Se permite un cierto grado de hemólisis ya que el cobre se reparte en partes aproximadamente iguales entre el suero y los eritrocitos, siendo recomendable realizar las extracciones a la misma hora del día (por ejemplo entre las 8 y 10 horas) debido al ritmo circadiano que presentan las concentraciones de este elemento en el suero. El suero puede conservarse en tubos de polipropileno o poliestireno bien tapados durante 15 días a temperatura ambiente o de manera prácticamente indefinida a -20°C ⁵¹.

Concentración de cobre sérico no unido a ceruloplasmina (ferroxidasa) o cobre «libre»

Concentraciones de cobre sérico total normales o elevadas junto con la disminución de los niveles de ceruloplasmina

sérica indican un incremento de la concentración de cobre «libre». En individuos sanos ésta representa menos del 10% de la concentración de cobre sérico total mientras que en la EW este porcentaje puede elevarse al 30-50%. Así en la mayoría de estos pacientes no tratados se observan concentraciones de cobre no unido a ceruloplasmina superiores a $3,15 \mu\text{mol/L}$ ($20 \mu\text{g/dL}$) (intervalo de referencia: $0,79-1,57 \mu\text{mol/L}$ [$5-10 \mu\text{g/dL}$]), pero hay que tener en cuenta otras posibles causas de elevación como el fallo hepático agudo de cualquier etiología^{52,53}, la colestasis crónica y la intoxicación por cobre.

Su determinación es laboriosa, requiriendo extracción con metil-isobutil-cetona tras su acoplamiento con amino-pirrolidin-ditiocarbamato⁵¹. Por ello, habitualmente se emplea una estimación indirecta⁴⁴ basada en el porcentaje de cobre que contiene la ceruloplasmina (0,3%):

[Cobre no unido a ceruloplasmina($\mu\text{mol/L}$)]

= [Cobre total($\mu\text{mol/L}$)]

– [Cobre unido a ceruloplasmina($\mu\text{mol/L}$)]

[Cobre unido a ceruloplasmina($\mu\text{mol/L}$)]

= [ceruloplasmina(g/L)] $\times 47,2$

El principal problema de su estimación es que depende del error asociado a dos determinaciones séricas, la de cobre y principalmente la de ceruloplasmina, ya que como se ha comentado, numerosos factores producen variabilidad en los resultados de esta última, de forma que su sobrevaloración puede dar lugar a resultados negativos en el cálculo del cobre libre, recomendándose por ello, especialmente para este fin, la cuantificación de ceruloplasmina por métodos enzimáticos.

Todo esto limita la utilización de este parámetro para el diagnóstico⁵⁴ aunque sí puede presentar utilidad en la evaluación de la eficacia del tratamiento de estos pacientes.

Concentración de cobre en orina de 24 h

La excreción de cobre en orina refleja la concentración de cobre sérico no unido a ceruloplasmina en la circulación.

Su determinación basal puede ser útil tanto para el diagnóstico como en la monitorización del tratamiento. En pacientes sintomáticos se encuentra elevado, usándose habitualmente como punto de corte para el diagnóstico valores superiores a $1,6 \mu\text{mol/día}$ ($100 \mu\text{g/día}$)^{53,55}. Sin embargo, pueden encontrarse cifras inferiores en pacientes presintomáticos en aquellos con enfermedad hepática crónica estable y en los que presentan manifestaciones neurológicas sin afectación hepática. Por ello, el límite superior del intervalo de referencia, alrededor de $0,6 \mu\text{mol/día}$ ($40 \mu\text{g/día}$), parece ser un mejor punto de corte porque aumenta la sensibilidad diagnóstica^{29,56}.

Por otra parte, al interpretar estos resultados también hay que tener en cuenta otras causas que producen elevación del cobre en orina en ausencia de EW, fundamentalmente la lesión hepática grave de cualquier etiología, la ingestión de quelantes de cobre, la contaminación del

Tabla 2 Factores que provocan descenso (FN) y elevación (FP) de las concentraciones de cobre en orina

Falsos negativos

Pacientes presintomáticos
Pacientes con enfermedad hepática estable
Pacientes con manifestaciones neurológicas
Errores en la recogida de muestra: muestra incompleta

Falsos positivos

Hepatitis crónica activa
Colestasis crónica
Fallo hepático agudo
Ingestión de quelantes de cobre
Contaminación con cobre del recipiente de recogida
Heterocigotos de enfermedad de Wilson
Errores en la recogida de muestra: muestra excesiva

recipiente de recogida de la orina, y la condición de portador heterocigoto⁵³ (tabla 2).

La excreción de cobre en orina de 24 h también puede determinarse tras administración de D-penicilamina, un agente quelante de cobre que promueve su eliminación urinaria. Esta prueba sólo ha sido estandarizada en la población pediátrica, en la que se administran dos dosis orales de 500 mg de D-penicilamina, una al comienzo y otra 12 horas más tarde a lo largo de las 24 h de la recolección de orina. Usando como punto de corte valores superiores a $25,2 \mu\text{mol/día}$ ($1.600 \mu\text{g/día}$) se obtuvo una sensibilidad (SD) del 88,2% y una especificidad (ED) del 98,2%⁵², superando la exactitud diagnóstica de las determinaciones basales. Posteriormente se ha realizado una reevaluación de este prueba que confirma su utilidad en el diagnóstico de EW en niños con enfermedad hepática activa (SD = 92%) pero no en familiares asintomáticos (SD = 46%) en los que no permite excluir la enfermedad⁵⁷.

Esta prueba ha sido usada también en adultos, pero siguiendo diferentes protocolos. Un reciente estudio realizado en España sugiere su utilidad como prueba de cribado para seleccionar aquellos pacientes en los que estaría indicado realizar una biopsia hepática, evitando así en muchos casos los riesgos y costes que este procedimiento invasivo lleva asociados. En este trabajo, que usó la misma pauta de administración de penicilamina que en la infancia, se encontró que el mejor punto de corte en la población adulta es menor ($16,6 \mu\text{mol/día}$ = $1.057 \mu\text{g/día}$) que el descrito para niños⁵⁸.

La utilidad de estas determinaciones puede verse limitada si las condiciones de recogida de la muestra no son las óptimas. Las orinas han de recogerse durante 24 h ya que las concentraciones de cobre en muestras de orina aisladas presentan una elevada variabilidad intraindividual. Es esencial evitar tanto los errores en la recogida de orina de 24 h como la contaminación del contenedor de muestra con cobre exógeno. Hay que tener en cuenta que lo primero puede resultar complicado, fundamentalmente en niños y que muestras incompletas o excesivas producirán sub o sobreestimaciones respectivamente. Se ha recomendado usar recipientes de plástico previamente lavados con HNO_3 1 mol/L ⁵¹, sin embargo esto no suele ser necesario con los envases usados en la actualidad.

Tabla 3 Factores que provocan descenso (FN) y elevación (FP) de las concentraciones de cobre en biopsia hepática*Falsos negativos*

Muestras con fibrosis extensa y pocas células parenquimatosas
Muestras insuficientes

Falsos positivos

Colestasis crónica
Cirrosis infantil de la India
Síndrome de Alagille
Tumores hepáticos
Recién nacido

Contenido de cobre en biopsia hepática

La medición cuantitativa de cobre hepático sigue siendo considerada la prueba bioquímica más importante para el diagnóstico de la enfermedad, pero debido a su carácter invasivo se reserva para aquellos casos con sospecha de EW en los que otras pruebas no muestran resultados definitivos.

En individuos no tratados, valores inferiores a 0,63-0,79 mmol/kg de tejido seco (40-50 µg/g), casi siempre excluyen el diagnóstico de EW, mientras que resultados iguales o superiores a 3,9 mmol/kg de tejido seco (≥ 250 µg/g) son habitualmente considerados diagnósticos de EW en ausencia de otras patologías en las que también se observan estas elevaciones como la enfermedad hepática colestática o la cirrosis infantil de la India²⁹ (tabla 3). Las cifras en individuos heterocigotos, aunque generalmente altas, no suele exceder estas últimas.

Valores inferiores a 3,9 mmol/kg de tejido seco (250 µg/g), sin embargo, no excluyen la enfermedad. Así este punto de corte ha sido considerado demasiado alto y criticado por estar basado en estudios que incluyeron pocos casos. El valor de 1,2 mmol/kg de tejido seco (75 µg/g) ha mostrado aumentar considerablemente la SD de la prueba (83,3% vs. 96,5%) aunque se pierde algo de ED (98,6% vs. 95,4%). Por ello, en pacientes con resultados entre 1,2 y 3,9 mmol/kg de tejido seco (75 y 250 µg/g), se recomienda realizar otros estudios, fundamentalmente genéticos⁵⁹.

El principal problema de la determinación de cobre hepático es que en la EW la distribución del cobre dentro del hígado con frecuencia no es homogénea. Por ello la concentración puede ser infravalorada debido al error de muestreo. Tanto especímenes escasos como los que presentan extensa fibrosis y pocas células parenquimatosas, pueden dar lugar a falsos negativos. Se requiere, por tanto, un adecuado tamaño de muestra (1 cm \times 1,6 mm) que se seca en un recipiente exento de elementos traza a 90 °C hasta masa constante y se somete posteriormente a hidrólisis ácida con HNO₃ ultrapuro.

La cuantificación del cobre, tanto en tejido como en orina, por espectrofotometría de absorción atómica de llama, presenta el inconveniente de no diferenciar entre valores normales y bajos, pero esto no suele ser una limitación cuando se usa para el diagnóstico de la EW puesto que estos pacientes presentan concentraciones elevadas.

Las tinciones histoquímicas de cobre, ej. rodamina, orceína, no pueden sustituir la determinación cuantitativa

de cobre hepático, puesto que presentan una escasa capacidad discriminante.

Otras pruebas como la medida de la incorporación de radioisótopos del cobre a la ceruloplasmina son en la actualidad poco utilizadas debido a la dificultad para obtener estos isótopos. Una alternativa es el uso de ⁶⁵Cu, isótopo no radiactivo del cobre que puede ser detectado por espectrometría de masas. Sin embargo esta metodología presenta limitaciones para diferenciar entre individuos heterocigotos y enfermos, además de no estar disponible en la mayor parte de laboratorios²⁹.

Pruebas de imagen

La tomografía computarizada y preferentemente la resonancia magnética revelan en presencia de enfermedad neurológica, daño en ganglios basales y en ocasiones en otras zonas del encéfalo⁶⁰.

Estudio genético

Actualmente el estudio genético resulta todavía complicado y caro debido al elevado número de mutaciones descritas. Sin embargo, su importancia en el diagnóstico es cada vez mayor fundamentalmente en ciertas poblaciones en las que se observa un predominio de determinadas mutaciones específicas, lo que permite realizar un cribado inicial de la enfermedad estudiando solamente determinadas regiones de gen ATP7B. Así en España se ha identificado una mutación más frecuente, Met645Arg, y se ha descrito que el estudio de las mutaciones más comunes puede identificar cerca del 74% de alelos mutados⁶¹. Por otra parte, en la isla de Gran Canaria se ha encontrado una alta prevalencia de una mutación rara, Leu708Pro⁶².

Estudio familiar

Debe realizarse en familiares de primer grado, siendo la probabilidad de enfermedad en hermanos del 25% mientras que en hijos del 0,5%.

Se usan las mismas pruebas que para el diagnóstico teniendo en cuenta sus limitaciones en individuos presintomáticos.

El estudio de mutaciones, cada vez más disponible, resulta útil cuando éstas han sido identificadas en el paciente índice. La presencia del mismo genotipo en un familiar confirma el diagnóstico, permitiendo así un tratamiento precoz y el consejo genético.

En los casos en los que no haya sido posible detectar ambas mutaciones, el estudio familiar puede realizarse mediante el análisis del haplotipo de marcadores polimórficos que flanquean el gen ATP7B y se heredan ligados a éste. Requiere el estudio del caso índice y de los padres para identificar la pareja de cromosomas con alelos mutados. Los hermanos que presenten esta pareja (idéntica combinación de marcadores polimórficos que el caso índice) habrán heredado la enfermedad, mientras que los que sólo posean uno de ellos serán portadores heterocigotos. En estos estudios hay que tener en cuenta la rara posibilidad de fenómenos de recombinación³⁸.

Tratamiento

El tratamiento farmacológico de la EW se basa en el uso de quelantes de cobre que promueven la excreción del metal por orina, o de sales de cinc que reducen su absorción intestinal, o bien de una combinación de ambos.

Esta enfermedad fue mortal hasta que en 1951 se introdujo el primer tratamiento farmacológico, el dimercaptopropanol (BAL) i.m., que fue rápidamente reemplazado por la D-penicilamina (1956), otro agente quelante de cobre que, administrado vía oral, induce además la síntesis de metalotioneína reduciendo su fracción libre intracelular⁶³. Éste ha sido el principal fármaco utilizado durante muchos años en el tratamiento inicial de pacientes sintomáticos aunque actualmente está siendo desplazado por otros quelantes con menos efectos secundarios como la Trientina y el tetratiomolibdato amónico (éste todavía no disponible)^{64,65}.

También son útiles las sales de cinc que bloquean la absorción intestinal del cobre induciendo la síntesis de metalotioneína intestinal que lo secuestra favoreciendo su eliminación en heces⁶⁶. Este es el tratamiento más seguro y simple, y suele usarse en pacientes presintomáticos y como terapia de mantenimiento a largo plazo, aunque también se ha descrito su eficacia como tratamiento inicial en combinación con agentes quelantes.

El tratamiento debe ser iniciado lo más precozmente posible, incluyendo a los individuos presintomáticos y mantenido durante toda la vida. Se debe recomendar una dieta pobre en cobre y también se ha sugerido que la adición de antioxidantes, principalmente vitamina E mejora la sintomatología.

El trasplante hepático está indicado en pacientes con cirrosis hepática terminal que no responden al tratamiento con quelantes y en caso de fallo hepático fulminante.

Los objetivos de la monitorización del tratamiento incluyen la confirmación de la mejoría clínica y bioquímica, el cumplimiento de la terapia y la identificación de efectos adversos.

Las pruebas de laboratorio deberían incluir parámetros de valoración de la función hepática y del metabolismo del cobre, así como hemograma y análisis de orina en todos los pacientes tratados con quelantes para controlar la posible aparición de efectos secundarios como neutropenia, trombocitopenia y proteinuria.

La estimación del cobre no unido a ceruloplasmina puede suministrar una guía útil para evaluar la eficacia del tratamiento. En pacientes con buena respuesta el valor de esta estimación se normalizará.

La excreción de cobre en orina de 24 h inmediatamente tras el inicio del tratamiento con agentes quelantes puede superar los 15,7 $\mu\text{mol}/\text{día}$ (1.000 $\mu\text{g}/\text{día}$). Posteriormente durante el tratamiento crónico debería estar entre 3,2 y 7,9 $\mu\text{mol}/\text{día}$ (200-500 $\mu\text{g}/\text{día}$). Durante el tratamiento con zinc estos valores no deberían superar la cifra de 1,2 $\mu\text{mol}/\text{día}$ (75 $\mu\text{g}/\text{día}$).

En pacientes tratados con quelantes, una excreción de cobre en orina de 24 h inferior a 3,2 $\mu\text{mol}/\text{día}$ (200 $\mu\text{g}/\text{día}$) o valores excesivamente altos pueden indicar no adherencia al tratamiento. En estos casos la estimación de cobre no unido a ceruloplasmina dará un resultado elevado (> 2,36 $\mu\text{mol}/\text{L}$ [> 15 $\mu\text{g}/\text{dL}$]).

Además, valores de cobre en orina por debajo de 3,2 $\mu\text{mol}/\text{día}$ (200 $\mu\text{g}/\text{día}$) también pueden aparecer por depleción excesiva de cobre como consecuencia de una sobredosificación o tras tratamientos prolongados. En estas circunstancias la estimación de cobre no unido a ceruloplasmina será muy baja (< 0,79 $\mu\text{mol}/\text{L}$ [< 5 $\mu\text{g}/\text{dL}$]) y frecuentemente se asociará a disminución de la concentración de ceruloplasmina sérica, neutropenia y anemia con hemosiderosis e hiperferritinemia²⁹. La medición de la concentración sérica de cinc y de su excreción en orina de 24 h pueden ser también útiles para monitorizar el cumplimiento de la terapia en pacientes tratados con sales de este metal.

Actualmente se lleva a cabo un estudio europeo (Proyecto EUROWILSON, www.eurowilson.org) para el registro de todos los pacientes de nuevo diagnóstico en los países de la Unión Europea, con el objetivo de obtener la máxima información posible de la enfermedad, lo que sin duda ampliará los conocimientos actuales facilitando tanto el diagnóstico temprano y el tratamiento de pacientes sintomáticos y presintomáticos, como los estudios familiares y el consejo genético.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Scheinberg I, Sternlieb I. Wilson's Disease. *Major Probl Intern Med*. 1984;23:1-24.
2. Chloé M, Mak, Ching-Wan Lam. Diagnosis of Wilson's Disease: A comprehensive review. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2008;45:263-90.
3. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 1912;34:295-507.
4. Walshe JM. History of Wilson's disease: 1912 to 2000. *Mov Disord*. 2006;21:142-7.
5. Cumings JN. The copper and iron content of brain and liver in the normal and hepato-lenticular degeneration. *Brain*. 1948;71:410-5.
6. Mandelbrote BM, Stanier MW, Thompson RHS, Thurston MN. Studies on copper metabolism in demyelinating diseases of the central nervous system. *Brain*. 1948;71:212-28.
7. Scheinberg IH, Gitlin D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration. *Science*. 1952;116:484-5.
8. Bearn AG, Kunkel HG. Biochemical abnormalities in Wilson's disease. *J Clin Invest*. 1952;31:616.
9. Frommer DJ. Defective biliary excretion of copper in Wilson's disease. *Gut*. 1974;15:125-9.
10. Culotta VC, Gitlin JD. Disorders of copper transport. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Nueva York: McGraw-Hill; 2001. p. 3105-26.
11. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:321-36.
12. Tao TY, Gitlin JD. Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease. *Hepatology*. 2003;37:1241-7.
13. Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:6842-7.
14. Van den Berghe PV, Folmer DE, Malingré HE, Van Beurden E, Klomp AE, Van de Sluis B, et al. Human copper

- transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J.* 2007;407:49–59.
15. O'Halloran TV, Culotta VC. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem.* 2000;275:25057–60.
 16. Huffman DL, O'Halloran TV. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:677–701.
 17. De Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LWJ. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet.* 2007;44:673–88.
 18. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, et al. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/FAS) mediated apoptosis. *Nat Med.* 1998;4:588–93.
 19. Mufti AR, Burstein E, Csomos RA, Graf PC, Wilkinson JC, Dick RD, et al. XIAP is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Mol Cell.* 2006;21:775–85.
 20. Bearn A. A genetical analysis of 30 families with Wilson disease. *Ann Hum Genet.* 1960;24:33–9.
 21. Brewer GJ. Enfermedad de Wilson. En: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editores. *Harrison. Principios de Medicina Interna*. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana; 2006. p. 2546–8.
 22. Frydman M, Bonné-Tamir B, Farrer LA, Conneally PM, Magazanik A, Ashbel S, et al. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:1819–21.
 23. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transpotting P-type ATPase similar to the Menkes gen. *Nat Genet.* 1993;5:327–37.
 24. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet.* 1993;5:344–50.
 25. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and Characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197:271–7.
 26. HGMD® home page. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff [consultado 11/2/2011]. Disponible en: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
 27. Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet.* 2006;120:151–9.
 28. Riordan SM, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol.* 2001;34:165–71.
 29. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *AASLD Practice Guidelines. Hepatology.* 2008;47:2089–111.
 30. Beyersdorff A, Findeisen A. Morbus Wilson: Case report of two-year-old child as first manifestation. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41:496–7.
 31. Ala A, Borjigin J, Rochwarger A, Schilsky M. Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar for diagnosis. *Hepatology.* 2005;41:668–70.
 32. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.* 2003;23:139–42.
 33. Brewer GJ. Wilson's disease: A clinician's Guide to Recognition. En: *Diagnosis and Management*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2001.
 34. Walshe JM. Wilson's disease: The presenting symptoms. *Arch Dis Child.* 1962;37:253–6.
 35. Milkiewicz P, Saksena S, Hubscher SG, Elias E. Wilson's disease with superimposed autoimmune features: report of two cases and review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15:570–4.
 36. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SHB, et al. U. S. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective Study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med.* 2002;137:947–54.
 37. Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson's disease. *Pediatr Transplantation.* 2002;6:15–9.
 38. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet.* 2007;369:397–408.
 39. Wiebers DO, Hollenhorst RW, Goldstein NP. The ophthalmologic manifestations of Wilson's disease. *Mayo Clin Proc.* 1977;52:409–16.
 40. Cairns JE, Williams HP, Walshe JM. "Sunflower cataract" in Wilson's disease. *BMJ.* 1969;3:95–6.
 41. Hellman NE, Gitlin GD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:439–58.
 42. Xu X, Pin S, Gathinji M, Fuchs R, Harris ZL. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1012:299–305.
 43. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology.* 1997;113:212–8.
 44. Walshe JM. Wilson's disease: the importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. *Ann Clin Biochem.* 2003;40:115–21.
 45. Macintyre G, Gutfreund KS, Martin WR, Camicioli R, Cox DW. Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin. *J Lab Clin Med.* 2004;144:294–301.
 46. Gnanou JV, Thykadavil VG, Thuppal V. Pros and Cons of immunochemical and enzymatic method in the diagnosis of Wilson's disease. *Indian J Med Sci.* 2006;60:371–5.
 47. Mak CM, Lam CW, Tam S. Diagnostic accuracy of serum ceruloplasmin in Wilson disease: determination of sensitivity and specificity by ROC curve analysis among ATP7B- genotyped subjects. *Clin Chem.* 2008;54:1356–62.
 48. Twomey PJ. Effect of a different caeruloplasmin assay method on the relationship between serum copper and caeruloplasmin. *Postgrad Med J.* 2008;84:549–51.
 49. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comité de Garantía de Calidad y Acreditación de Laboratorios. Transferibilidad de los resultados producidos en el laboratorio clínico. *Química Clínica.* 1996;15:442–4.
 50. Beetham R, White P, Riches P, Bullock D, Mackenzie F. Use of CRM 470/RPPHS has not achieved true consensus for ceruloplasmin measurement. *Clin Chem.* 2002;48:2293–4.
 51. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Metodología recomendada para la medición del contenido de cobre en especímenes biológicos. *Química Clínica.* 2002;21:62–6.
 52. Martins da Costa C, Baldwin D, Portmann B, Lolin Y, Mowat AP, Mieli-Vergani G. Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology.* 1992;15:609–15.
 53. Tu JB, Blackwell RQ. Studies on levels of penicillamine-induced cupriuresis in heterozygotes of Wilson's disease. *Metabolism.* 1967;16:507–13.
 54. Twomey PJ, Viljoen A, House IM, Reynolds TM, Wierzbicki AS. Relationship between serum copper, ceruloplasmin, and non-ceruloplasmin-bound copper in routine clinical practice. *Clin Chem.* 2005;51:1558–9.
 55. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut.* 2007;56:115–20.

56. Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut*. 2000;46:415–9.
57. Müller T, Koppikar S, Taylor RM, Carragher F, Schlenck B, Heinz-Erian P, et al. Re-evaluation of the penicillamine challenge test in the diagnosis of Wilson's disease in children. *J Hepatol*. 2007;47:270–6.
58. Foruny JR, Boixeda D, López-Sanromán A, Vázquez-Sequeiros E, Villafruela M, Vázquez-Romero M, et al. Usefulness of penicillamine-stimulated urinary copper excretion in the diagnosis of adult Wilson's disease. *Scand Journal of Gastroenterol*. 2008;43:597–603.
59. Ferenci P, Steindl-Munda P, Vogel W, Jessner W, Gschwandler M, Stauber R, et al. Diagnostic value of quantitative hepatic copper determination in patients with Wilson's disease. *Clin Gastroenterol and Hepatol*. 2005;3:811–8.
60. Aisen AM, Martel W, Gabrielsen TO, Glazer GM, Brewer G, Young AB, et al. Wilson disease of the brain: MR Imaging. *Radiology*. 1985;157:137–41.
61. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population. Identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet*. 2005;68:61–8.
62. García-Villarreal L, Daniels S, Shaw SH, Cotton D, Galvin M, Geskes J, et al. High prevalence of the very rare Wilson disease gene mutation Leu708Pro in the Island of Gran Canaria (Canary Islands, Spain): a genetic and clinical study. *Hepatology*. 2000;32:1329–36.
63. Walshe JM. Wilson's disease. New oral therapy. *Lancet*. 1956;267:25–6.
64. Walshe JM. The management of penicillamine nephropathy in Wilson disease. A new chelating agent. *Lancet*. 1969;294:1401–2.
65. Brewer GJ, Hedera P, Kluin KJ, Carlson M, Askari F, Dick RB, et al. Treatment of Wilson's disease with ammonium tetrathiomolybdate: III. Initial therapy in a total of 55 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy. *Arch Neurol*. 2003;60:379–85.
66. Brewer GJ, Dick RD, Johnson VD, Brunberg JA, Kluin KJ, Fink JK. Treatment of Wilson's disease with zinc: XV. Long-term follow-up studies. *J Lab Clin Med*. 1998;132:264–78.