



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS  
MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II  
(SÍNDROME DE HUNTER)”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA

Dra. Liliana Fernández Hernández

TUTOR DE TESIS

Dra. Ariadna González del Ángel



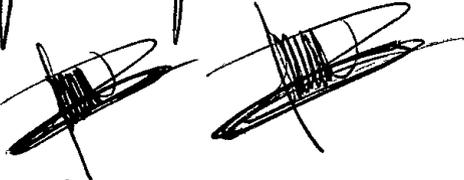
MÉXICO, D.F.

2011

**“ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON  
MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)”**



**DR. JOSÉ N. REYNÉS MANZUR**  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



**DRA. MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA**  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



**DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ**  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA



**DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL**  
TUTOR DE TESIS



**DR. MIGUEL ÁNGEL CANTARA ORTIGOZA**  
COTUTOR DE TESIS

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ariadna González del Ángel por su apoyo incondicional y su confianza en mí, por sus enseñanzas y por guiarme en la realización de este trabajo, por su estímulo constante para mi crecimiento profesional, sin usted no hubiera sido posible.

Al Dr. Miguel Ángel Alcántara por su hospitalidad y disponibilidad para ayudarme a realizar mi tesis, por aclarar mis dudas y por todo lo enseñado y aprendido.

A la Dra. Victoria Del Castillo por haberme dado la oportunidad de ser su alumna, por compartir conmigo conocimientos y experiencia, por guiarme en el camino de la educación.

A los médicos adscritos al Servicio de Genética Médica, Esther, Camilo y Emiy por el tiempo que tomaron para formarme y enseñarme, por transmitirme su conocimiento, por su apoyo y su cariño.

A todos los integrantes de Biología Molecular, Citogenética y Cultivo de tejidos, por acogerme en sus laboratorios, por toda la paciencia para enseñarme y por su amistad.

A Astrid, Berna y Benilde por ser mis maestras y amigas, por mostrarme el camino.

A Alma, Rosa, David y Karla por ser más que unos grandes maestros, por ser mis amigos y por haber hecho de la residencia una experiencia inolvidable.

A Vianney y Ximena por haber sido unas grandes compañeras y mis mejores amigas, por haber caminado junto a mí todo este tiempo, por haber dejado una huella en mi vida.

A mi mamá por el apoyo total, por ser el andamio de mi vida, por su amor, cariño y comprensión. Por las noches de desvelo a mi lado.

A mi papá por haberme enseñado la forma de luchar en la vida y de alcanzar mis ideales, por su guía y confianza en la realización de mis sueños.

A mi hermana, Lore, por ser mi mejor amiga, la persona que siempre me escucha, mi cómplice, por la vida que hemos compartido juntas, por enseñarme que no hay límites.

A ti, Rafael, mi compañero de vida, por cada sueño compartido, porque desde el principio hasta el día de hoy sigues dándome ánimo para terminar este proceso, por ser una parte de mí.

## INDICE

1. Resumen Estructurado.....	1
2. Antecedentes y marco teórico.....	3
2.1 Aspectos clínicos.....	3
2.1.1 Datos históricos.....	3
2.1.2 Incidencia y modo de herencia.....	3
2.1.3 Características clínicas.....	3
2.1.4 Diagnóstico.....	5
2.1.5 Pronóstico y Tratamiento.....	6
2.2 Características enzimáticas.....	7
2.3 Características moleculares.....	7
2.3.1 Gen.....	7
2.3.2 Espectro mutacional del gen.....	8
2.4 Correlación fenotipo-genotipo.....	9
3. Justificación.....	9
4. Planteamiento del problema.....	10
5. Objetivos.....	10
5.1 Objetivo general.....	10
5.2 Objetivos específicos.....	10
5.3 Objetivos secundarios.....	10
6. Material y método.....	11
6.1 Población objetivo.....	11
6.2 Población elegible.....	11
6.3 Tamaño de la muestra.....	11
6.4 Criterios de inclusión.....	11
6.5 Criterios de exclusión.....	11
6.6 Ubicación del estudio.....	11
6.7 Definición de variables.....	12
6.8 Descripción general del estudio.....	16
6.8.1 Descripción de etapas y estrategias moleculares en las fases del proyecto..	16
a) Extracción de DNA a partir de leucocitos totales de sangre periférica..	16
b) Fase I.....	16
c) Fase II.....	16
d) Asesoramiento genético.....	17
e) Relación fenotipo-genotipo.....	17
6.9 Consideraciones éticas.....	18
7. Resultados.....	19
8. Discusión.....	38
9. Conclusiones.....	46
10. Anexos.....	48
11. Bibliografía.....	58

## **“ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)”**

**COAUTORES:** Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza (Jefe de Laboratorio de Biología Molecular), Dra. Liliana Fernández Hernández (Médico residente de Genética Médica), Dra. Marcela Vela Amieva (Jefe de Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz), Dra. Benilde García de Teresa (Médico Especialista en Genética Médica, Laboratorio de Biología Molecular), Dra. Ariadna González del Ángel (Médico adscrito al Laboratorio de Biología Molecular y Subdirectora de Investigación Médica, INP)

### **1. RESUMEN ESTRUCTURADO**

**ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.** El Síndrome de Hunter, Mucopolisacaridosis tipo II, se hereda de forma recesiva ligada al X. Su incidencia se calcula en 1.3/100,000 recién nacidos vivos varones. La causa bioquímica es una deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal iduronato-2-sulfatasa (IDS), la cual conlleva a una acumulación progresiva de glucosaminoglucanos. En la mayoría de los pacientes los síntomas son severos y la muerte ocurre a edades tempranas. El gen *IDS* se localiza en Xq27.3-q28. A la fecha se han descrito >300 mutaciones patogénicas, que en su mayoría son del tipo puntual (80%), el resto presentan deleciones parciales o completas del gen *IDS* y loci aledaños e inversiones génicas entre el gen *IDS* y el pseudogen *IDSP1*. La mayoría de las mutaciones se originan en espermatogénesis y se transmiten con mayor frecuencia a partir de mujeres portadoras (>90%).

**JUSTIFICACIÓN.** A pesar de que la clonación del gen *IDS* y la descripción de las primeras mutaciones fueron en 1990, a la fecha no se ha reportado el espectro mutacional en pacientes mexicanos. El diagnóstico molecular confirma la sospecha diagnóstica y es el estándar de referencia para la detección del estado de portadora y diagnóstico prenatal.

#### **OBJETIVOS.**

- Caracterizar las mutaciones del gen *IDS* condicionantes de síndrome de Hunter o MPS II en una muestra de pacientes de origen mexicano y latinoamericano.
- Clasificar a los pacientes con diagnóstico confirmado de MPS II de acuerdo a la severidad del cuadro clínico por la presencia (forma severa) o ausencia (forma atenuada) de manifestaciones neurológicas (retraso mental, crisis convulsivas, hidrocefalia comunicante).
- Identificar a las mujeres emparentadas al caso índice como portadoras de la enfermedad con base al estudio molecular del gen *IDS*, en aquellas familias en quienes se haya caracterizado la mutación.
- Correlacionar el cuadro clínico de MPS II (severo o atenuado) de acuerdo con el genotipo identificado en los pacientes.
- Realizar diagnóstico prenatal en aquellas familias con mutación caracterizada y que así lo soliciten.

**MATERIAL Y MÉTODO.** En pacientes con sospecha clínica y/o bioquímica de MPS II mediante la obtención de DNA genómico se realizó la detección de la inversión génica por un ensayo de PCR restricción. En una segunda fase para los pacientes negativos a este cambio se realizó secuenciación automatizada directa de los 9 exones del gen *IDS* y sus bordes exón-intrón. Se correlacionó el tipo de mutación con el grado de severidad consignado. Dependiendo de la mutación caracterizada se buscó intencionadamente si la madre

del paciente era portadora de la enfermedad. Se brindó asesoramiento genético a las familias captadas de acuerdo a los genotipos observados, de igual manera a las familias que lo solicitaron se realizó diagnóstico prenatal mediante la obtención de DNA a partir de líquido amniótico durante embarazo.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN.** Se capturaron 6 pacientes con MPS II, 2 casos familiares y el resto sin antecedentes de la patología. Las manifestaciones clínicas más frecuentemente observadas fueron: retraso mental o psicomotor, artropatía, talla baja, visceromegalias e infecciones de vías aéreas de repetición. Debido al retraso mental todos se caracterizaron como fenotipo severo. La edad promedio de inicio de la sintomatología fue a los 19 meses de edad, concordante con la literatura, mientras que la edad promedio al diagnóstico se realizó de manera tardía.

La tasa de detección de mutaciones fue de 83%, en su mayoría fueron deleciones y rearrreglos génicos (49.8%), seguidos de mutaciones puntuales (33.3%), en un paciente no fue posible la caracterización del genotipo. Los porcentajes mencionados muestran diferencia a lo reportado en la literatura donde se refiere a las mutaciones puntuales como las más frecuentes (80%), lo anterior probablemente sea por el número pequeño de pacientes incluidos en el presente trabajo. Se identificaron dos mutaciones puntuales no reportadas previamente en la literatura y un rearrreglo complejo aún no caracterizado por completo, el cual se ha descrito con anterioridad en una sola ocasión en la literatura.

Se logró la identificación de madres portadoras en un 83% (4 de 5) muy cercano al porcentaje referido en la literatura (90%). En dos familias se realizó con éxito diagnóstico prenatal, lo que posterior a asesoramiento genético permitió a ambas madres la toma de decisiones antenatales.

Dos de los pacientes se encuentran en tratamiento con TRE, sin embargo por el alto costo de esta terapia, no se ha llevado a cabo en el resto de los pacientes, además ninguno fue candidato a TMO debido a que se recomienda su realización en el primer año y los pacientes fueron diagnosticados en edades posteriores.

El presente estudio es el primero en México que permite la identificación de genotipos responsables de síndrome de Hunter (MPS II) lo cual permite ofrecer a las familias la detección certera de portadoras y la opción de diagnóstico prenatal.

## 1. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

### 1.1 ASPECTOS CLÍNICOS

#### 1.1.1 DATOS HISTÓRICOS

Los errores innatos del metabolismo son un grupo raro de enfermedades, sin embargo en conjunto presentan una frecuencia mayor a lo supuesto. Las mucopolisacaridosis pertenecen a esta familia consistiendo en un defecto enzimático que conlleva a la acumulación de glucosaminoglucanos (GAGs). Los pacientes con mucopolisacaridosis se han beneficiado por el gran avance en la última década en su diagnóstico y tratamiento gracias a los métodos bioquímicos y a la biología molecular (Martin R., et al 2008). El Síndrome de Hunter, Mucopolisacaridosis tipo II, fue descrito por Charles Hunter, médico Canadiense en 1917, quien describió la enfermedad en dos hermanos varones.

#### 1.1.2 INCIDENCIA Y MODO DE HERENCIA

La incidencia del síndrome de Hunter se calcula en 1.3/100,000 recién nacidos vivos varones y el modo de herencia es recesiva ligada a X. Dos terceras partes de los pacientes por el involucro de sistema nervioso central representan la forma más severa. A pesar del tipo de herencia existen algunos reportes de mujeres afectadas, quienes generalmente presentan niveles bajos de iduronato-2-sulfatasa (I2S) y un fenotipo atenuado (Wraith J.E., et al. 2008).

#### 1.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La mucopolisacaridosis tipo II, es una enfermedad multisistémica, progresiva, en la mayoría de los pacientes los síntomas son severos y la muerte ocurre a edades tempranas. La edad de presentación es variable, así como la aparición de las complicaciones. Las manifestaciones clínicas suelen dividirse por aparatos y sistemas y estas incluyen:

**Facies:** Los pacientes típicamente tienen apariencia normal al nacimiento. La característica más común es la facies tosca, la cual se hace aparente entre los 2 y 4 años de edad, presentan regiones supraorbitarias prominentes, nariz ancha, labios gruesos, lengua grande, engrosamiento del lóbulo de la oreja progresiva debido al acumulo de glucosaminoglucanos en tejidos blandos y óseos, también se observa hipertricosis facial y corporal (Martin R., et al 2008) (Burrow A., et al 2008).

**Anormalidades esqueléticas:** Talla baja debida a detención en el crecimiento (talla final entre 120 y 150 cm), cuello corto, tórax en campana, xifosis, manos cortas en "garra". Los hallazgos esqueléticos se conocen como disostosis múltiple, los cuales se caracterizan por engrosamiento óseo, osificación irregular de epífisis en articulaciones de manos, hombros y codos, las costillas se observan engrosadas y los cuerpos vertebrales irregulares. Las complicaciones ortopédicas causadas por el involucro óseo y la artropatía severa, dan lugar a incapacidad importante con restricción motora. Los pacientes presentan erosión de articulaciones, la deformidad del acetábulo hace la cirugía poco exitosa y generalmente requieren silla de ruedas para disminuir el dolor articular, de predominio en cadera. El ejercicio y rehabilitación temprana y preventiva son claves importantes en la preservación de la función articular (Martin R., et al 2008).

**Sistema cardiovascular:** El involucro valvular con engrosamiento conlleva a regurgitación aórtica y/o mitral, así como estenosis. La cardiomiopatía es menos común pero se asocia a incremento del riesgo de arritmias. La cirugía de reemplazo valvular suele ser necesaria y la evaluación anual con ecocardiograma es esencial, en estos pacientes la profilaxis antibiótica para la prevención de endocarditis bacteriana es apropiada (Martin R., et al 2008).

**Sistema respiratorio:** La rinitis crónica y rinorrea persistente sin evidencia de infección son muy consistentes. Hipertrofia adenoidea y amigdalina, traqueomalacia, engrosamiento de cuerdas vocales y tejido redundante en vía aérea superior, así como engrosamiento lingual son contribuyentes a complicaciones de vías aéreas. Las manifestaciones como ronquido y respiración oral son los componentes mayores de apnea obstructiva del sueño, ésta suele empeorar con la edad, acompañada de cambios esqueléticos torácicos. Los episodios de hipoxia suelen manejarse con oxígeno a presión positiva. La adenoamigdalectomía se realiza frecuentemente para corregir la disfunción de la trompa de Eustaquio y mejorar la obstrucción respiratoria mientras que la colocación temprana de tubos de ventilación se recomienda en individuos severamente afectados (Martin R., et al 2008) (Wraith JE., et al 2008).

**Sistema gastrointestinal:** La distensión abdominal y las hernias causadas por la hepatoesplenomegalia progresiva son comunes; sin embargo, la acumulación de glucosaminoglucanos en hígado y bazo no causan disfunción de estos órganos. Los pacientes son propensos a periodos de diarrea sin causa aparente, se ha observado en biopsias rectales de pacientes afectados, acumulo de glucosaminoglucanos en células neurales del intestino por lo que se ha postulado una etiología autonómica de la diarrea (Peters C., et al 2000). Con la edad, la pérdida de musculatura y la inactividad física contribuyen a constipación. Las hernias abdominales pueden ser reparadas quirúrgicamente aunque suelen recurrir mientras que la diarrea puede ser manejada con medicamentos antidiarreicos y dieta (Martin R., et al 2008).

**Sistema nervioso central:** Las convulsiones son frecuentes, usualmente tónico clónico generalizadas las cuales responden adecuadamente al tratamiento estándar. La compresión progresiva de cordón espinal con mielopatía cervical resultante por engrosamiento de la dura madre e hiperplasia del ligamento transversal es común. La resonancia magnética de unión cráneo-cervical muestra depósito de glucosaminoglucanos alrededor del proceso odontoides. Sin tratamiento, la mielopatía puede ser irreversible por lo que debe tratarse de forma temprana con cirugía descompresiva (Martin R., et al 2008).

**Sistema nervioso periférico:** El síndrome de túnel del carpo es muy común (Burrow A., et al 2008), por lo que estudios de conducción nerviosa deben realizarse con periodicidad para monitoreo de los pacientes. La descompresión nerviosa de forma temprana mejora la calidad de los pacientes (Martin R., et al 2008).

**Oftalmológico:** La degeneración retiniana resulta en disminución de la agudeza visual y la poca adaptación a la obscuridad es común, se puede confirmar el diagnóstico mediante electroretinografía. El papiledema crónico sin evidencia de aumento de la presión intracraneal puede ser resultado del depósito de glucosaminoglucanos en la esclera. La revisión oftalmológica anual es requerida, así como la medición de la presión intraocular (Martin R., et al 2008).

**Audición:** La pérdida auditiva es común en pacientes con manifestaciones severas y se correlaciona con la severidad de las manifestaciones somáticas, éstas incluyen otitis medias de repetición secundaria a disfunción de la trompa de Eustaquio, disostosis de huesos del oído medio y daño nervioso (Wraith JE., et al 2008). Las alteraciones audiológicas usualmente consisten en sordera conductiva en etapas tempranas, sumándose un componente neurosensorial en etapas posteriores, la mayoría de los pacientes presentan ambos tipos al momento del diagnóstico.

**Tegumentos:** la piel es gruesa y poco elástica, suelen encontrarse pápulas hipocrómicas de entre 2 y 10 mm, primariamente en región escapular y posteriormente se diseminan a tronco y miembros torácicos, las cuales se consideran muy características de la entidad (Martin R., et al 2008).

**Desarrollo psicomotor:** en general es normal en los primeros meses de vida y el retraso en la adquisición de las habilidades inicia de forma progresiva entre los 18 y 24 meses de edad (Peters C., et al 2000). Dado el retraso intelectual de los pacientes es importante el inicio de estimulación temprana y terapia de rehabilitación para incrementar en lo posible su desarrollo. La mayoría de los pacientes muestran hiperactividad y conductas agresivas por lo que el apoyo psicológico y el manejo de la conducta, así como medicación debe ser considerada en estos pacientes; la hiperactividad generalmente responde al tratamiento con metilfenidato. La resonancia magnética de cráneo suele mostrar cambios de sustancia blanca y dilatación de espacios perivasculares (Martin R., et al 2008).

**Complicaciones anestésicas:** Las alteraciones por rigidez cervical se deben a la disostosis múltiple. La compresión medular puede presentarse en los pacientes incluso con manifestaciones leves lo que puede resultar en deterioro neurológico con la manipulación excesiva (Martin R., et al 2008).

#### 1.1.4 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico inicial se puede realizar de forma bioquímica mediante la medición de glucosaminoglucanos urinarios (heparán y dermatán sulfato) lo cual usualmente se utiliza como tamizaje en pacientes con la sospecha diagnóstica, la medición puede ser cuantitativa (medición de ácido urónico urinario total) o cualitativa (electroforesis), un resultado anormal sugiere la presencia de mucopolisacaridosis pero la sensibilidad de la prueba no es del 100%. La elevación de dermatán y heparán sulfato no hace el diagnóstico definitivo (Burrow A., et al 2008), sino que este se establece con la medición de la actividad enzimática en leucocitos, fibroblastos o plasma, la elección del tejido se basa en la facilidad de obtención de la muestra.

La deficiencia enzimática es diagnóstica en varones, sin embargo no define la severidad de la enfermedad, además la medición de la actividad enzimática no permite identificar portadoras. El análisis molecular confirma el diagnóstico de Síndrome de Hunter en varones además de ser la única opción de diagnóstico certero en portadoras. La identificación de la mutación es de gran importancia para el consejo genético y diagnóstico prenatal (Martin R., et al 2008).

El diagnóstico prenatal se puede realizar mediante ensayo enzimático en vellosidades coriónicas, permitiendo el diagnóstico rápido y temprano en fetos con riesgo para lo cual la determinación del sexo es importante, el estudio molecular es factible si se ha caracterizado la mutación responsable en la familia (Martin R., et al 2008).

### 1.1.5 PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

La clasificación tradicional en formas "moderada" y "severa" se basa en la supervivencia y en las manifestaciones en sistema nervioso central. La forma moderada se diagnostica entre los 4 y 8 años de edad y la mortalidad se presenta entre la segunda y tercera década por enfermedad cardíaca y respiratoria. Los pacientes con formas más severas presentan un cuadro progresivo con involucro multiorgánico por lo que habitualmente se diagnostican entre los 18 y 36 meses, en ellos, la mortalidad es debida al deterioro neurológico y falla cardiorespiratoria en la mitad de la segunda década (Martin R., et al 2008).

El tratamiento sintomático se basa en un manejo de soporte para la anticipación de posibles complicaciones, el cual puede incrementar la calidad de vida de los pacientes, por lo que el diagnóstico temprano es esencial. La terapia de reemplazo enzimático se lleva a cabo mediante la administración en infusión semanal de la enzima recombinante iduronato-2-sulfatasa, esta fue aprobada para el tratamiento del Síndrome de Hunter basado en ensayos controlados, doble ciego los cuales mostraron un beneficio clínico en los pacientes tratados con la enzima recombinante comparados con los pacientes tratados con placebo. El tratamiento no atraviesa la barrera hemato-encefálica por lo que el inicio temprano de la terapia retrasa de forma importante el retraso mental en los pacientes aunque no lo detiene (Wraith JE., et al 2008).

La enzima recombinante idursulfasa se produce en una línea celular humana y se purifica de la enzima lisosomal natural Iduronato-2-sulfatasa con el subsecuente catabolismo de los glucosaminoglucanos acumulados (Wraith JE., et al 2008). Los pacientes muestran una mejoría estadísticamente significativa y el tratamiento generalmente es bien tolerado, las reacciones adversas clásicas que suelen presentarse son fiebre y urticaria (Wraith JE., et al 2008). Está contraindicado durante infecciones activas o enfermedades intercurrentes (Burrow A., et al 2008).

La respuesta temprana al tratamiento depende de la severidad de los síntomas en cada paciente, las condiciones individuales y la edad de inicio del tratamiento. El primer signo observado en los pacientes, es un aumento positivo en las actividades de la vida diaria. Se refiere que a los dos meses muestran disminución de niveles de GAGs urinarios cercanos a niveles normales, de igual manera reducción en el tamaño hepático y esplénico, a los 3 meses inicia la mejoría de las contracturas articulares, a los 6 meses la mayoría de los pacientes han mejorado la distancia de caminata a los 6 minutos y estabilización de las pruebas de función pulmonar. La mayor respuesta se observa en los primeros 12 a 18 meses de tratamiento ya que después de este periodo la mayoría de los pacientes se han estabilizado (Wraith JE., et al 2008).

Otra opción de manejo es el trasplante de células hematopoyéticas (TMO) el cual tiene una alta morbimortalidad, especialmente los primeros días postrasplante por infecciones y enfermedad injerto contra huésped. En estudios de pacientes trasplantados se ha observado mejoría en la hepatoesplenomegalia y en las contracturas; poca mejoría en cambios de disotosis múltiple y nula en desarrollo cognitivo, ya que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Peters C., et al 2000). El TMO tiene mayor efectividad cuando se lleva a cabo de manera temprana; son pocos los estudios realizados en pacientes trasplantados en el mundo, sin embargo los reportes coinciden en mejoría clínica y en la supervivencia en los pacientes, cuidando los efectos adversos del tratamiento (Peters C., et al 2000).

EL TMO en los pacientes con Síndrome de Hunter tiene dos mecanismos principales: El reemplazo de macrófagos enzimáticamente defectuosos con acúmulo lisosomal y la transferencia de la enzima funcionante del donador (Peters C., et al 2000).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS ENZIMÁTICAS

La causa bioquímica del síndrome de Hunter es una deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal iduronato-2-sulfatasa (I2S), la cual cataliza la remoción del grupo sulfato en la posición 2 del L-ácido idurónico en heparán y dermatán sulfato como el primer paso en la vía de su degradación. La degradación de los GAGs ocurre primariamente en el compartimento lisosomal mediante ruptura de enlaces glucosídicos de azúcares terminales específicos; la deficiencia enzimática conlleva a una acumulación progresiva de glucosaminoglucanos en células, tejidos y órganos (Lome AC., 2008).

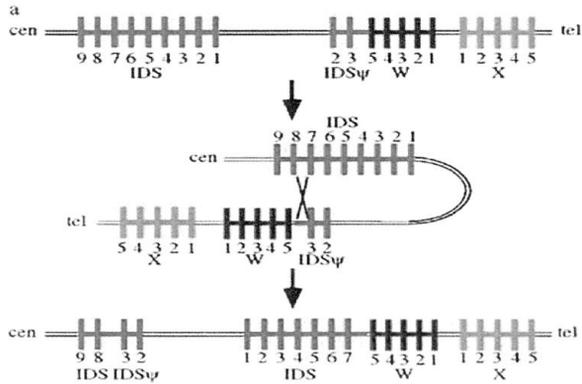
## 1.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

### 1.3.1 GEN

El gen *IDS* (GeneID: 3423, RefSeqGene NG\_011900.1) abarca 24 kb de las bandas Xq27.3-q28 y se organiza en 9 exones (figura 1) que codifican a la isoforma "a" principal y una secuencia en el intrón 7 que funge como un exón alternativo (7b) que se utiliza para codificar una proteína más pequeña (isoforma "b") (Wilson PJ, et al., 1990; Flomen RH, et al., 1993; Wilson PJ et al., 1993; Malmgren H et al., 1995). El gen *IDS* carece de elementos promotores tipo caja TATA, sin embargo posee en la región 5' elementos ricos en GC, típicos de los genes con expresión constitutiva (Wilson PJ et al., 1993). A través de estos elementos, el gen *IDS* dirige la transcripción de diferentes isoformas de mRNA sujetas a un amplio procesamiento post-transcripcional, que genera al menos tres isoformas de mRNA de las cuales la isoforma "a" o principal de 5.876 kb con un marco de lectura abierto de 1,650 nucleótidos (NCBI Reference Sequence: NM\_000202.4) codifica a la proteína completa de 550 a.a. o isoforma principal de la iduronato 2-sulfatasa (I2S, NCBI Reference Sequence: NP\_000193.1, EC 3.1.6.13, UniProtKB/Swiss-Prot P22304-1). El mRNA de la isoforma "b" es de 1.437 kb (NCBI Reference Sequence: NM\_006123.4) y utiliza como exón alternativo (exón 7b) una secuencia residente en el intrón 7. El mRNA de la isoforma "b" codifica a una proteína de 343 a.a., ya que en ella no se incluyen al exón 8 y 9 presentes en la isoforma "a" (NCBI Reference Sequence: NP\_006114.1, EC 3.1.6.13, UniProtKB/Swiss-Prot P22304-2). El no incluir a los exones 8 y 9 en el mRNA de la isoforma "b", sustituye a los últimos 207 a.a. por 7 a.a. ausentes en la isoforma principal, que además de generar una 3' UTR más corta, implica una enzima con un extremo carboxilo-terminal modificado con un peso predicho de 38.3 kDa (Malmgren H et al., 1995) La isoforma "c" consiste en un mRNA de 5.832 kb (NCBI Reference Sequence: NM\_001166550.1) y se predice, sin que hasta el momento se haya llegado a caracterizar *in vivo*, una proteína codificada de 460 a.a. (NCBI Reference Sequence: NP\_001160022.1; UniProtKB/TrEMBL B4DGD7), este mRNA sería traducido a una I2S con un extremo N-terminal modificado por el empleo alternativo de un sitio donador de splicing en el extremo 5' del transcrito con el consecuente uso de un codón de inicio diferente o alterno al utilizado por la isoforma "a".

A 20 kb del extremo telomérico del gen *IDS* se encuentra un pseudogen no procesado de 1.63 kb (*IDSP1*, *IDS2* o *IDS~~4~~*) originado durante la evolución por un evento de duplicación invertida, seguido de al menos tres delecciones grandes que eliminaron: a) del exón 1 a una parte del extremo 5' del exón 2, b) parte del extremo 3' del intrón 7 al exón 9 y finalmente c) dos tercios del intrón 3 hasta una porción del extremo 5' del

intrón 7. Así, la secuencia del pseudogen *IDSP1* sólo se conforma de una porción 3' del exón 2, el intrón 2 y el exón 3 completos, una porción del extremo 5' del intrón 3 y parte del extremo 5' del intrón 7. El *IDSP1* no se expresa y está orientado en dirección invertida a la secuencia del gen *IDS*, con quién muestra una homología del 88% (Rathmann M et al., 1995; Timms KM et al., 1995) (figura 1). Cabe mencionar, que la secuencia del intrón 7 del locus *IDSP1* presenta una homología del 96% con el intrón 7 del gen funcional *IDS*, y ello representa un "hot-spot" natural para generar recombinación en *cis*- entre ambos loci o incluso conversión génica, los cuales dan como resultado mutaciones severas por rearrreglos complejos (Lagerstedt K et al., 1997; Bunge S et al., 1998).



**Figura 1.** a) Esquema de la organización general del locus *IDS*, el pseudogen *IDSP1* (*IDSΨ*) y los loci *W* y *X* aledaños. Nótese que el pseudogen se encuentra en una posición invertida en dirección telomérica al gen funcional. b) El alto grado de homología a nivel de secuencia entre las secuencias intrónicas del pseudogen con el intrón 7 de *IDS* gen y el pseudogen provoca eventos de recombinación homóloga en *cis*- entre ambos loci. c) El resultado de la recombinación de *IDSΨ* con el intrón 7 de *IDS* provoca una inversión del gen funcional que separa los exones 8 y 9 del resto de la secuencia codificante. Cabe mencionar que aunque este tipo de mutación se considera severa, existe evidencia de que el gen *IDS* invertido continúa transcribiéndose a un nivel muy bajo, pero el mRNA resultante incluye secuencias de los loci aledaños *W* y *X* (ver texto). Este transcrito quimérico puede caracterizarse mediante RT-PCR con fines diagnósticos para identificar a los pacientes con este tipo de mutación (Timms et al., 1997).

### 1.3.2 ESPECTRO MUTACIONAL DEL GEN

En el locus *IDS* se ha evidenciado una gran heterogeneidad alélica responsable de MPS II, ya que a la fecha se han descrito más de 300 mutaciones patogénicas que en su mayoría son del tipo puntual (~80%) en regiones codificantes o en regiones intrónicas reguladoras del splicing (~10%) (Lualdi S et al., 2006), así como pequeñas deleciones/inserciones de menos de 20 pb (Rathmann M et al., 1996; Bunge S et al., 1998).

Prácticamente el 85% de las mutaciones puntuales en regiones codificantes ocurren en los exones 3, 5, 8 y 9 (Rathmann M et al., 1996). Por otro lado, hasta el 20-25% de los casos pueden presentar deleciones parciales o completas del gen *IDS* y loci aledaños, entre otros rearrreglos complejos como inversiones génicas generados por eventos de recombinación condicionados por un alto grado de homología entre el gen funcional *IDS* y el pseudogen aledaño *IDSP1* (Rathmann M et al., 1995; Bondeson ML et al., 1995b; Bunge S et al., 1998).

En MPS II se sabe que la mayoría de las mutaciones puntuales, particularmente del tipo transición C>T en islas CpG, se originan en espermatogénesis y por ende se transmiten con mayor frecuencia a partir de mujeres portadoras que heredaron una mutación *de novo* a través de línea germinal paterna (Rathmann M et al., 1996). Ello conlleva importantes consideraciones dentro del asesoramiento genético, ya que la madre de un caso único de MPS II presenta un riesgo muy alto (>90%) de ser portadora del padecimiento de acuerdo a datos obtenidos por Rathmann M y cols. (Rathmann M et al., 1996).

#### 1.4 CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

Debido a la amplia heterogeneidad alélica del gen *IDS* en pacientes no relacionados con MPS II, se ha dificultado el encontrar más de un paciente con la misma mutación (mutaciones "privadas"); ello aunado al hecho de que existen pocos pacientes reportados con seguimiento clínico y genotipo documentado, ha obstaculizado el establecimiento de una correlación fenotipo-genotipo (Froissart R et al., 1998; Vafiadaki et al., 1998; Li et al., 1999; Moreira da Silva et al., 2001).

Se ha observado que los pacientes con deleciones completas que se extienden a secuencias aledañas además de cursar con una actividad enzimática nula de I2S, invariablemente tienen un involucro más severo del SNC (retraso psicomotor, deterioro cognitivo progresivo) (Timms KM et al., 1997) y otros datos clínicos atípicos como ptosis y crisis convulsivas de inicio temprano (Wraith JE et al., 1991; Steén-Bondeson ML et al., 1992; Froissart et al., 1993; Timms KM et al., 1997) que hacen suponer un síndrome de genes contiguos (Wraith JE et al., 1991). Las crisis convulsivas se han descrito en pacientes cuya deleción del gen *IDS* se extiende hacia regiones del extremo centromérico y las cuales eliminan parcialmente la secuencia del locus *FMR-2*, un gen involucrado en una forma de retraso mental ligado al cromosoma X por inestabilidad de trinucleótidos (Wilson PJ et al., 1991; Froissart et al., 1993).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La actividad mínima o nula de la enzima iduronato 2-sulfatasa (I2S) condiciona la acumulación de glucosaminoglucanos (GAG's) de tipo heparán y dermatán sulfato en los lisosomas. (Naufeld & Muenzer 2001) La medición de la actividad enzimática de I2S en leucocitos, fibroblastos en cultivo o suero se considera el estándar de referencia para el diagnóstico de MPS II.

El diagnóstico molecular se utiliza para confirmar la sospecha clínica de los fenotipos atípicos o menos severos de pacientes con sospecha de MPS II. Así mismo, debido a que existe solapamiento de los valores de la actividad enzimática de la I2S en leucocitos de mujeres no portadoras y mujeres portadoras probablemente debido al patrón de inactivación del cromosoma X (Lin SP et al., 2006), el diagnóstico molecular se emplea como estándar de referencia para la detección del estado de portadora y el diagnóstico prenatal de fetos masculinos afectados a través de biopsia de vellosidades coriónicas o amniocentesis, cuando la mutación en la familia se ha identificado previamente (Bunge S et al., 1994, Neufeld EF & Muenzer J, 2001).

A pesar de que la clonación del gen *IDS* y la descripción de las primeras mutaciones patogénicas fueron en 1990 (Wilson PJ et al., 1990), a la fecha no se ha reportado el espectro mutacional del gen *IDS* en pacientes mexicanos con MPS II. Adicionalmente, en nuestro Instituto no se cuenta con la estandarización del ensayo

enzimático de I2S para la confirmación del diagnóstico de MPS II y por ello, las muestras de los pacientes con sospecha diagnóstica de MPS II se envían al extranjero donde se realiza la prueba enzimática en gota de sangre seca depositada en papel filtro; lo anterior, por lo general implica un retraso en la confirmación diagnóstica, la adecuada atención médica y un asesoramiento genético de certeza al paciente y a su familia. Cabe mencionar que el diagnóstico certero de MPS II no puede realizarse con base solamente a criterios clínicos, ya que la enfermedad comparte algunos datos con otras MPS como la tipo I y la deficiencia múltiple de sulfatasas. La importancia de establecer un diagnóstico certero determina la posibilidad de ofrecer a los pacientes con MPS II la terapia de reemplazo enzimático (TRE) con idursulfasa (Elaprased®), enzima recombinante humana de la I2S recientemente aprobada por la FDA (FDA, 2006) o el incluir a los pacientes en un programa de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, que aunque la experiencia en este tratamiento es muy limitada, aparentemente detiene la progresión de la enfermedad.

El presente estudio podría dar las bases para futuras investigaciones tendientes a determinar si el genotipo de los pacientes (mutaciones amorfas versus hipomorfas) predice la ocurrencia de potenciales efectos adversos como son la resistencia al tratamiento por formación de anticuerpos, ya que aunque se sabe que alrededor del 60% de los pacientes desarrollan anticuerpos posterior al tratamiento con idursulfasa (Elaprased®) (Okuyama T et al., 2010), se desconoce el impacto exacto de este hallazgo a largo plazo.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los tipos y la frecuencia de mutaciones patogénicas en el gen *IDS* en una muestra de pacientes referidos con sospecha diagnóstica de mucopolisacaridosis tipo II o síndrome de Hunter?

### 4. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL: Caracterizar las mutaciones del gen *IDS* condicionantes de síndrome de Hunter o MPS II en una muestra de pacientes de origen mexicano y latinoamericano.

#### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Clasificar a los pacientes con diagnóstico confirmado de MPS II de acuerdo a la severidad del cuadro clínico por la presencia (forma severa) o ausencia (forma moderada) de manifestaciones neurológicas (retraso mental, crisis convulsivas, hidrocefalia comunicante).
- b) Caracterización de las mutaciones y polimorfismos en el gen *IDS*, así como su frecuencia en pacientes con diagnóstico confirmado de MPS II.
- c) Identificar a las mujeres emparentadas al caso índice como portadoras de la enfermedad con base al estudio molecular del gen *IDS*, en aquellas familias en quienes se haya caracterizado la mutación.

#### 5.3 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- a) Correlacionar el cuadro clínico de MPS II (severo o moderado) de acuerdo con el genotipo identificado en los pacientes.
- b) Determinar si las mutaciones patogénicas encontradas en pacientes con MPS II son en su mayoría heredadas u originadas como eventos *de novo*.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 POBLACIÓN OBJETIVO

Pacientes masculinos con sospecha diagnóstica de MPS II basado en la presencia de fenotipo clínico compatible, aumento en los niveles de glucosaminoglucanos urinarios (GAG's), y/o niveles bajos de actividad enzimática de I2S documentada en gota de sangre seca, fibroblastos o leucocitos.

### 6.2 POBLACIÓN ELEGIBLE

Pacientes masculinos con fenotipo clínico o bioquímico de mucopolisacaridosis tipo II de origen Mexicano o Latinoamericano, así como sus familiares.

### 6.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se obtuvo a conveniencia dada la baja frecuencia del padecimiento. Se contó con 6 familias de origen Mexicano no relacionadas entre sí que se atienden en el INP.

### 6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico clínico compatible con mucopolisacaridosis tipo II, con valores elevados de GAG's urinarios (>8-29 mg de ácido glucurónico / g creatinina para niños con edades de 1-3 años; >6-23 para niños con edades de 3-6 años y >3-16 para mayores de 6 años)
- Pacientes con disminución de la actividad enzimática de I2S en leucocitos o fibroblastos.
- Pacientes del sexo masculino.
- De nacionalidad Mexicana o de cualquier país de Latinoamérica.
- De cualquier edad.
- Pacientes con disponibilidad de la madre para obtener DNA y/o RNA de leucocitos de sangre periférica que permita determinar el origen de la mutación caracterizada.
- Familiares de primer grado (madre y hermanas o hermanos) de pacientes con diagnóstico molecular confirmatorio de MPS II.
- Casos índice y sus familiares que autoricen su inclusión en el estudio mediante firma de carta de asentimiento (menores de 10 años) o consentimiento informado.

### 6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Padres o hermanos no biológicos de los casos índice.
- Temporalmente, pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses.

### 6.6 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

La captación y evaluación clínica de los pacientes se efectuó en la consulta externa de Genética del INP a través de las coautoras Médicos Especialistas en Genética Médica y el estudio molecular del paciente y sus familiares se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del INP.

## 6.7 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>Edad</b>	Tiempo de existencia desde el nacimiento, en años.	-<5 años -5a1m-10a -10a1m-15a	Cuantitativa
<b>Sexo</b>	Condición orgánica que distingue a los hombres de las mujeres.	-Masculino	Cualitativa
<b>Edad de inicio de las manifestaciones</b>	Tiempo en años de la iniciación de las alteraciones clínicas	-<5 años -5a1m-10a -10a1m-15 a	Cuantitativa
<b>Edad al diagnóstico</b>	Tiempo en años en que se establece el diagnóstico de Síndrome de Hunter	-<5 años -5a1m-10a -10a1m-15 a	Cuantitativa
<b>Crisis convulsivas</b>	Contracción involuntaria de uno o más miembros o músculos del cuerpo.	-Presentes -Ausentes	Cualitativa
<b>Hidrocefalia comunicante</b>	Aumento anormal del líquido cefalorraquídeo acompañado de dilatación de ventrículos cerebrales.	-Presentes -Ausentes	Cualitativa
<b>Retraso mental</b>	Coefficiente intelectual disminuido.	-Leve -Moderado -Severo	Cuantitativa
<b>Retraso psicomotor</b>	Retraso en la adquisición de los hitos del desarrollo en comparación con una cohorte de edad relacionada. (menores de 5 años)	-Leve -Moderado -Severo	Cuantitativa

<b>GAG's urinarios</b>	Cadenas largas de carbohidratos consistentes en ácido hexurónico y aminoazúcares, azúcares sulfatados, azúcares ácidos y N- acetil derivados, medidos en orina	-Normal  -Elevado (dependiente de la edad)	Cuantitativa
<b>Facies tosca</b>	Rasgos faciales toscos	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Talla baja</b>	Distancia entre la parte más alta de la cabeza y el talón (piso) de un individuo.	-PC menor a la familiar  -PC <3	Cuantitativa
<b>Disostosis</b>	Alteración ósea debida a acumulo de mucopolisacaridos	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Ptosis</b>	Caida o pérdida del tono muscular de párpados	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Opacidad corneal</b>	Pérdida de la transparencia de la córnea	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Degeneración retiniana</b>	Deterioro de la mácula	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Artropatía</b>	Nombre genérico para las enfermedades de las articulaciones.	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Síndrome túnel carpal</b>	Neuropatía periférica que ocurre cuando el nervio mediano, se presiona o se atrapa dentro del túnel carpiano, a nivel de la muñeca.	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Canal estrecho medular</b>	Estenosis o angostamiento del canal medular, que ejerce presión sobre la médula espinal.	-Presente  -Ausente	Cualitativa
<b>Hepatomegalia</b>	Crecimiento del tamaño del hígado	-Presente  -Ausente	Cualitativa

<b>Esplenomegalia</b>	Crecimiento del tamaño del bazo	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Diarrea crónica</b>	Evacuaciones líquidas o heces no formadas, la cual dura más de 4 semanas.	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Otitis media de repetición</b>	Inflamación de la mucosa del oído medio en repetidas ocasiones	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Voz grave</b>	Sonido que el aire expedido de los pulmones produce al salir de la laringe haciendo que vibren las cuerdas vocales	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Hipoacusia</b>	Disminución en la percepción del sonido.	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Valvulopatía</b>	Alteración valvular cardíaca por acumulo de mucopolisacaridos	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Cardiomiopatía</b>	Alteración en tamaño o función corazón por acumulo de mucopolisacaridos	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Mutación</b>	Cualquier cambio permanente heredable en la secuencia del DNA genómico	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Polimorfismo</b>	Presencia en una población de dos o más genotipos alternativos, cada uno de los cuales presenta una frecuencia mayor que la que podría ser mantenida sólo por mutación recurrente, frecuencia del 1% en la población general.	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Mutación puntual de sentido erróneo</b>	Mutación que cambia un codón específico de un aminoácido por otro que especifica otro aminoácido	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Mutación puntual sin sentido</b>	Sustitución de una base en el DNA que produce un codón de terminación de cadena.	-Presente -Ausente	Cualitativa

<b>Mutación inserción</b>	<b>tipo</b>	Segmento de DNA de un cromosoma que se inserta en otro cromosoma	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Mutación tipo delección</b>		Pérdida de una secuencia de DNA de un cromosoma	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Delección intragénica</b>	<b>parcial</b>	Delección pequeña dentro de un gen que lo inactiva y tiene el mismo efecto que otras mutaciones nulas de dicho gen, no son reversibles.	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Fenotipo</b>		Características bioquímicas, fisiológicas y morfológicas observadas de un individuo, determinadas por su genotipo y el ambiente en que se expresa.	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Genotipo</b>		Constitución genética de un individuo que puede distinguirse a partir del fenotipo; los alelos presentes en un locus	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Mutación amorfa</b>		Mutación asociada con pérdida de una o más de las funciones normales de una proteína.	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Mutación hipomorfa</b>		Mutación asociada con reducción de una o más de las funciones normales de una proteína.	-Presente -Ausente	Cualitativa
<b>Portadora de MPS II</b>		Mujer heterocigota con un alelo mutado ligado al X.	-Presente -Ausente	Cualitativa

## 6.8 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Los pacientes incluidos en el estudio fueron evaluados por el servicio de Genética. El estudio molecular de las familias se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana del INP. A cada paciente y sus familiares se les realizó historia clínica con árbol genealógico y se asentaron los valores de GAG's urinarios y del resto de las variables a analizar en la Hoja de Recolección de Información (ANEXOS 1). La clasificación de los pacientes en los fenotipos de MPS II se realizó de acuerdo a si presentaban involucro del SNC como retraso mental (IQ <70 puntos), hidrocefalia comunicante o crisis convulsivas para los casos severos, y para las formas atenuadas, los pacientes debieron tener un IQ >80 puntos y ausencia del resto de las manifestaciones neurológicas.

### 6.8.1 DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS Y ESTRATEGIAS MOLECULARES EN LAS FASES DEL PROYECTO:

#### a) *Extracción de DNA a partir de leucocitos totales de sangre periférica.*

Prevía obtención del consentimiento informado de los padres y/o representantes legales de los casos (ANEXO 2.1) que se incluyeron con diagnóstico clínico sugestivo de MPS II, se tomaron 5-10 ml. de sangre periférica, colectada en tubos Vacutainer con EDTA, para la obtención de DNA genómico. Para el estudio del gen *IDS* en los familiares (madre, hermanos que aceptaron su inclusión al estudio, previa firma del consentimiento informado, ANEXO 2.2), se obtuvo el DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica (2.5-5 ml.) mediante la técnica de adsorción en columna de sílica con el kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Heidelberg, Germany). El DNA genómico obtenido se cuantificó y se valoró pureza e integridad mediante espectrofotometría y electroforesis en agarosa. Las muestras de DNA obtenidas se conservaron a 4°C hasta su análisis.

#### b) *FASE I. Detección de la inversión y conversión génicas de IDS por dos ensayos de PCR en DNA genómico y ensayo de restricción.*

Se emplearon las condiciones reportadas por Lualdi S et al., 2005 las cuales brevemente consisten en dos PCR separadas (set de oligos 1F/1R y 2F/2R) a 40 ciclos, 1.5 mmol de cloruro de magnesio y 58° C de alineación, seguido de tres ensayos de restricción con incubación a 37° C por 12 horas con 10 UI de las enzimas *Hinfl*, *SacI* y *Eco571* por reacción. La secuencia de los oligonucleótidos y los fragmentos resultantes para la inversión y conversión génica se señalan en la Tabla 2. La misma técnica en pacientes que resultaron positivos para la inversión o conversión génica de *IDS*, fue aplicada al DNA genómico de sus madres y otros familiares femeninos en riesgo de ser portadoras del rearreglo.

#### c) *FASE II. Secuenciación automatizada directa de los 9 exones del gen IDS y sus bordes exón-intrón a partir de DNA genómico.*

Se emplearon las condiciones de PCR y los oligonucleótidos (Tabla 1) descritos por Chang JH et al., 2005. Brevemente, con un programa de PCR de 35 ciclos, con temperaturas de alineación que oscilan entre los 52 y 60° C con 1-1.5 mmol de cloruro de magnesio se obtuvieron los amplicones de los pesos señalados en la tabla 1; éstos contienen la totalidad de la secuencia codificante del gen *IDS*, así como los sitios donador y aceptor de splicing de cada exón. Una vez corroborado el peso molecular y la calidad del amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa, éstos fueron purificados directamente del gel con el kit QIAquick Gel

Extraction Kit (QIAGEN, Heidelberg, Germany) para llevar al cabo la secuenciación automatizada de ambas cadenas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. Los electroferogramas resultantes fueron analizados con el programa Alamut version 1.51 para la identificación rápida y certera de las mutaciones y/o polimorfismos, su efecto a nivel de proteína y si afectan a los sitios donador y aceptor de splicing o ESE's o ISE's, predecir *in silico* su efecto en la maduración del mRNA. Se buscó si las mutaciones encontradas ya han sido reportadas como patogénicas o como variantes polimórficas, en caso de no haber sido previamente descritas fueron sometidas al análisis *in silico* a través del programa Pmut (<http://mmb2.pcbub.es:8080/PMut/>), PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html>) o Alamut version 1.51, además de su búsqueda dirigida en el DNA genómico de 100 controles masculinos sanos cuyas muestras se manejaron como anónimas, para excluirla como polimorfismo. Cuando se identificó una mutación puntual o delección/inserción <20 pb, se buscaron de manera dirigida (sólo se secuenció el exón involucrado) en el DNA genómico de sus madres y otros familiares femeninos en riesgo de ser portadoras del defecto.

En los casos en que no se obtuvo amplicón en alguno de los 9 exones, se consideró que el paciente presenta una delección parcial intragénica o completa del gen.

#### d) Asesoramiento genético.

Se brindó asesoramiento genético de certeza a las familias captadas de acuerdo a los genotipos observados (familias con alelos *IDS* caracterizados) o con riesgos empíricos (familias con alelos *IDS* sin mutación identificada). Todas las mutaciones caracterizadas en los casos índice se buscaron en sus madres para determinar la proporción de mutaciones heredadas u originadas como evento *de novo*. Esta información fue de especial utilidad para brindar a las familias un asesoramiento genético de certeza sobre los riesgos de recurrencia y las estrategias de prevención, como el diagnóstico molecular prenatal. Así, aquellas mujeres que resultaron portadoras del padecimiento con una mutación caracterizada y se encontraban en etapa reproductiva, se les brindó la opción de diagnóstico prenatal molecular a través de biopsia de vellosidades coriales o amniocentesis.

#### e) Relación Fenotipo-Genotipo

El genotipo caracterizado en los alelos *IDS* de cada paciente, fue comparado con el fenotipo observado. De acuerdo a la literatura, la correlación fenotipo-genotipo no está clara del todo (Froissart et al., 2002), pero existen mutaciones amorfas descritas como condicionantes siempre de fenotipos graves (por ejemplo: la inversión génica, las delecciones completas del gen o las mutaciones puntuales como la p.R468Q, p.R468L o p.R468G) (Neufeld EF&Muenzer J, 2001) y algunas que permiten la síntesis de una proteína con función residual (mutaciones hipomorfas) en ocasiones asociadas a un fenotipo "atenuado" de MPSII (por ejemplo: p.P231L) (Guffon N et al., 2009).

Se determinó en nuestros casos si cumplían la hipótesis que menciona que los pacientes con el fenotipo más severo con compromiso neurológico importante presentan una mutación amorfa grave. Se verificó en nuestra población si datos clínicos atípicos descritos en formas severas de MPS II como crisis convulsivas y ptosis, se encuentran en pacientes con la delección completa del gen, lo cual sugiere que el defecto se extiende a loci aledaños como el gen *FMR-2* (Wraith JE et al., 1991; Steén-Bondeson ML et al., 1992; Froissart et al., 1993; Timms KM et al., 1997).

Por otro lado, en pacientes con fenotipos atenuados de MPS II, se verificó si cursan con una mutación descrita como "leve" o cuya evaluación *in silico* prediga un efecto hipomorfo. Todas las mutaciones caracterizadas en los pacientes se correlacionaron con el efecto en la síntesis de proteína (codones de paro prematuro) o en los dominios afectados (mutaciones de sentido erróneo en sitios catalíticos o dominios altamente conservados de las sulfatasas humanas o en la secuencia de señalización para el lisosoma) a través de los programas BLAST de alineamiento de secuencias (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con los genes parálogos de IDS del humano (familia de sulfatasas) y los ortólogos IDS de otros organismos (por ejemplo: *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, etc.).

#### 6.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se solicitó el consentimiento informado de los padres de los casos índice menores de edad que cumplieron con los criterios de inclusión, para la obtención de 5-10 ml. de sangre venosa periférica, extracción del DNA y su posterior análisis, lo que representa un riesgo mínimo para el paciente.

Se pidió al padre o tutor del paciente que firme la carta de consentimiento informado del paciente o de los hermanos (hombres o mujeres) y al caso índice o hermanos carta de asentimiento informado si tiene la capacidad para emitir su voluntad de participar en el estudio (más de 10 años de edad y sin retraso mental); también se solicitó carta de consentimiento informado a la madre (ver ANEXOS 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4). La información personal, de identidad y del genotipo fue manejada en forma estrictamente confidencial, siguiendo las normas establecidas por la Declaración de Helsinki, las Buenas Prácticas Médicas y del ELSI (del inglés "Ethical, Legal and Social Issues"). El asesoramiento genético se brindó en todos los casos de acuerdo a los resultados obtenidos del estudio molecular.

**Tabla 1.** Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR y subsecuente secuenciación automatizada para la caracterización de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones/inserciones en los 9 exones y sus bordes exón-intrón del gen *IDS* (Chang JH et al., 2005 y diseño nuevo con Primer-BLAST).

OLIGONUCLEÓTIDO	T <sub>m</sub>	SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDO (5'-3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)
IDS Exón 1-(F)	60° C	ACG AGG AGG TCT CTG TGG CT	240
IDS Exón 1-(R)		GGA GGA AGG GAG AAG AGA TG	
IDS Exón 2-(F)	55° C	TCA GTG TCA GTG CAG GTT AC	276
IDS Exón 2-(R)		CTG TGC CAT CTG ACA ATA GC	
IDS Exón 3-(F)	58° C	AGA TGG CAG ACA TGT TTT GC	266
IDS Exón 3-(R)		GAG AAC CCA GAC TCT GGA CA	
IDS Exón 4-(F)	60° C	TGG GGA GTG GGG TGT TGA AAG ACT	320
IDS Exón 4-(R)		TCG GGC CTA ATG CTG AAG ATC CCA	
IDS Exón 5-(F)	60° C	TGG CCC CTG CCT GGA AAA CA	492
IDS Exón 5-(R)		TGC CTG GCG ATG GCA GGA TG	
IDS Exón 6-(F)	60° C	TTC CAG GTC AGG GCC GAG CA	483
IDS Exón 6-(R)		AGG ACA CCT CCA CCC CAG CA	
IDS Exón 7a-(F)	59° C	GGG AGA GAT GCA CAG GCA AGC A	359
IDS Exón 7a-(R)		TGC CCC AGG ATC CCA CTT TGT T	
IDS Exón 7b/8-(F)	60° C	CGC ATG TGT GGG AAC CGC CA	437
IDS Exón 7b/8-(R)		TCG CCT GCC TCC GGA AGT GA	
IDS Exón 8-(F)	55° C	CCC TTT CTG TGG TAA TTC CAA GTG	516
IDS Exón 8-(R)		ACC CAG AGT ATG GGA GAT GTT CAG	
IDS Exón 9-(F)	60° C	AGG GTG AGG TGC CGA GGT GG	692
IDS Exón 9-(R)		TCA CCA GCT GGA AGG GAG CAC A	

**Tabla 2.** Secuencia de los oligonucleótidos para la caracterización por PCR y ensayo de restricción a los fragmentos de unión resultantes de la inversión génica entre los loci *IDS* e *IDSP1*, así como la conversión génica de *IDS* (Lualdi S et al., 2005).

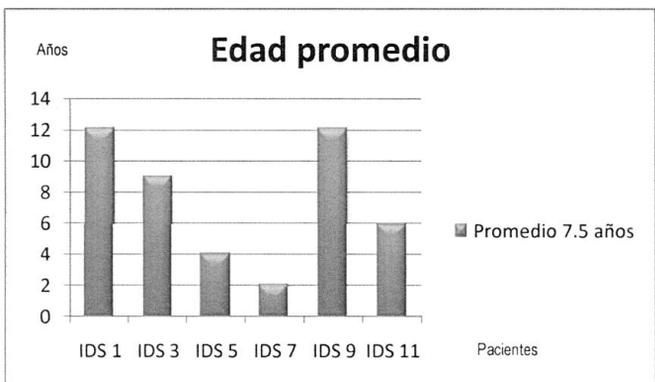
Primer	Secuencia oligonucleótidos (5'-3')	Enzima	Producto de PCR y productos de la restricción de un alelo <i>IDS</i> recombinante	Alelo <i>IDS</i> sin recombinación
IF	TGG GCA TGG GAT TTA ACA GGC T	<i>Hinfl</i>	1,310 pb  (556,397,271,71 y 15 pb)  o (556,451,397,271,110,71 y 15 pb)	<b>1315 pb</b>  <b>(451,397,271,110,71 y 15 pb)</b>
IR	AAC AGT GAG CTG TGG AAC TGC A	<i>SacI</i>  (en caso de recombinantes identificados por <i>Hinfl</i> )	1310 pb (Rec A o D)*  679,631 (Rec B o C)	NA
2F	AGC CGC GTT TCT TTC CTC ACT G	<i>Eco571</i> **	1,300 pb  (771,403 y 126 pb): Presencia de secuencias de <i>IDSP1</i>  o (1,174 y 126 pb):  Presencia de secuencias de <i>IDS</i>  Ambos patrones de restricción: sugestivos de conversión génica.	<b>Sin producto</b>
2R	GTG GCG GGA ATC TAA AAG GTC G			

\* Los cuatro tipos de rearreglos descritos en la inversión génica entre *IDS* e *IDSP1* se han denominado A, B, C y D basado en la numeración de nucleótidos involucrados en los intercambios genómicos de la unión proximal entre los intrones 7 de ambos loci.

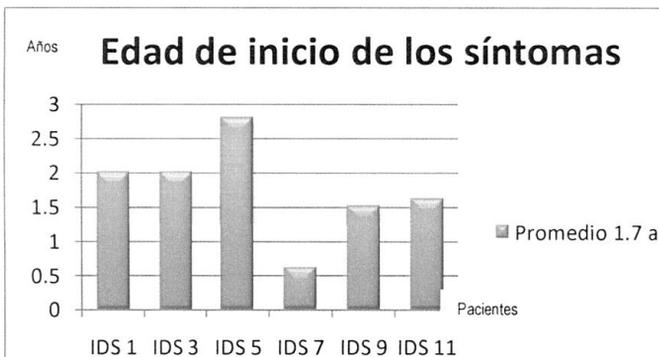
\*\* Ensayo de restricción para caracterizar las secuencias en la unión proximal en el "hot-spot" del intron 3, necesario para identificar eventos de conversión génica.

## 6. RESULTADOS

Se analizaron las muestras obtenidas de 6 pacientes con diagnóstico clínico, bioquímico y/o enzimático de Síndrome de Hunter (mucopolisacaridosis tipo II), así como la de sus familiares. La edad de los pacientes oscilo entre los 4 y los 12 años de edad, el promedio de edad fue 7.5 años. El promedio de edad de inicio de los síntomas fue al año 7 meses de edad y la edad del diagnóstico en promedio fue a los 3 años 3 meses de edad. Todos los pacientes presentaban un fenotipo severo, caracterizado por retraso psicomotor importante, dos pacientes presentaban crisis convulsivas.



*Figura 2: Gráfica que muestra las edades de los pacientes incluidos en este estudio con diagnóstico clínico, bioquímico y/o enzimático de síndrome de Hunter (Mucopolisacaridosis tipo II).*



*Figura 3: Gráfica que muestra la edad de inicio de los síntomas de los pacientes incluidos en el presente trabajo.*

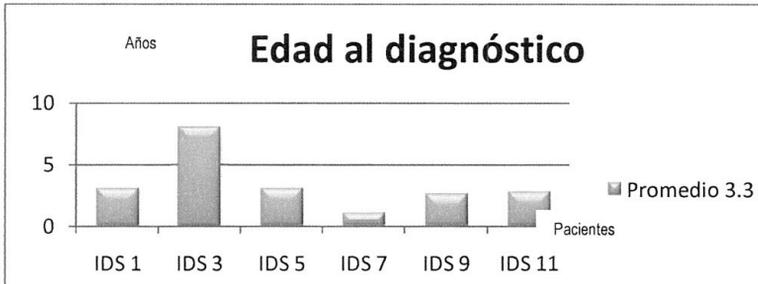


Figura 4: Gráfica que muestra la edad al diagnóstico de los pacientes incluidos con diagnóstico de síndrome de Hunter (Mucopolisacaridosis tipo II).

CARACTERISTICAS	IDS1	IDS3	IDS5	IDS7	IDS9	IDS11
Crisis Convulsivas	-	+	-	-	+	-
Hidrocefalia Comunicante	-	-	-	-	-	-
Retraso Mental	+	+	+	+	+	+
Retraso Psicomotor	+	+	+	+	+	+
Facies Tosca	+	+	+	+	+	+
Talla Baja	+	+	+	+	+	+
Disostosis Múltiple	+	+	+	+	+	+
Ptosis	-	-	+	-	+	+
Opacidad Corneal	-	-	-	-	-	-
Degeneración Retiniana	-	-	-	-	-	-
Artropatía	+	+	+	+	+	+
Síndrome de Túnel Carpal	-	-	-	-	+	-
Canal Medular Estrecho	-	-	+	-	-	-
Hepatomegalia	+	+	+	+	+	+
Esplenomegalia	-	+	+	+	-	+
Otitis Media de Repetición	+	+	-	-	+	+
Hipoacusia	+	+	+	-	+	-
Voz Grave	+	+	+	-	-	+
Diarrea Crónica	-	-	+	+	-	-
Valvulopatía	+	-	+	-	-	+
Cardiomiopatía	-	+	-	+	-	+

Tabla 3: Características clínicas de los pacientes incluidos en este estudio, (-) Ausente, (+) Presente

CARACTERISTICAS	Porcentaje Total
Retraso Mental	100%
Retraso Psicomotor	100%
Artropatía	100%
Hepatomegalia	100%
Esplenomegalia	66.66%
Otitis Media de Repetición	66.66%
Hipoacusia	66.66%
Voz Grave	66.66%
Ptosis	50%
Valvulopatía	50%
Cardiomiopatía	50%
Crisis Convulsivas	33.33%
Diarrea Crónica	33.33%
Síndrome de Túnel Carpal	16%
Canal Medular Estrecho	16%
Opacidad Corneal	0%
Degeneración Retiniana	0%
Hidrocefalia Comunicante	0%

Tabla 4: Frecuencia de características clínicas en los pacientes al momento de incluirlos en el estudio.

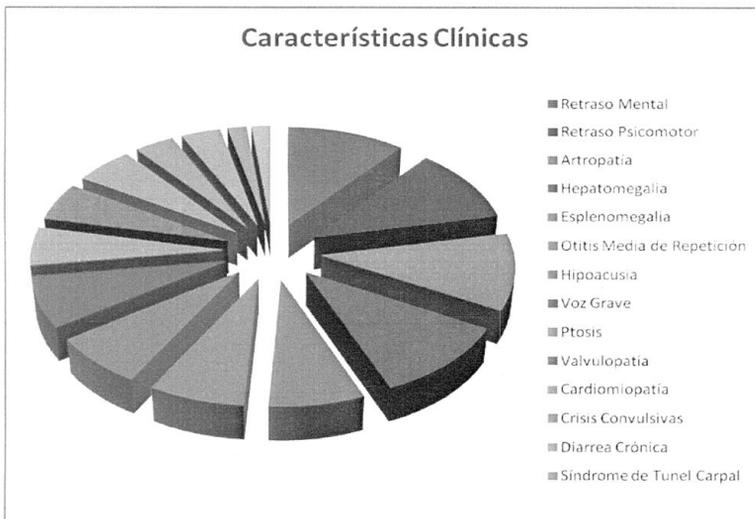


Figura 5: Gráfica que muestra la frecuencia de las características clínicas observadas en los pacientes incluidos.

## ESPECTRO MUTACIONAL DEL GEN IDS

TIPO DE MUTACIÓN	NÚMERO DE PACIENTES N=6	PORCENTAJE
Mutaciones puntuales	2	33.6%
Inversión IDS/IDSP1	1	16.6%
Delección completa del gen	1	16.6%
Rearreglos intragénicos	1	16.6%
Mutación no caracterizada	1	16.6%

Tabla 5: Espectro mutacional del gen IDS en 6 pacientes analizados.

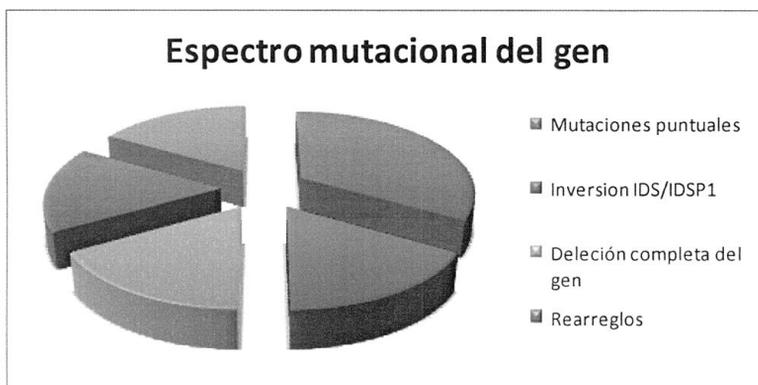


Figura 6: Espectro mutacional del gen IDS, el mayor porcentaje encontrado fue de mutaciones puntuales 33%, mientras que la inversión IDS/IDSP1, delección completa del gen y rearreglos intragénicos se observaron en el 16% cada uno.

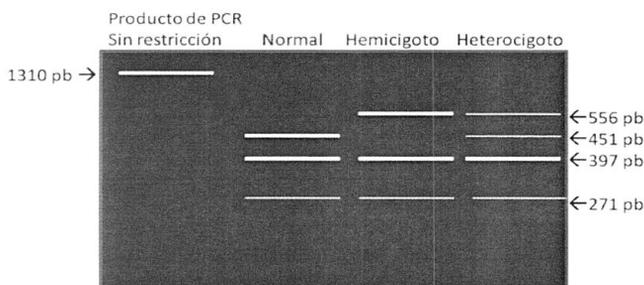
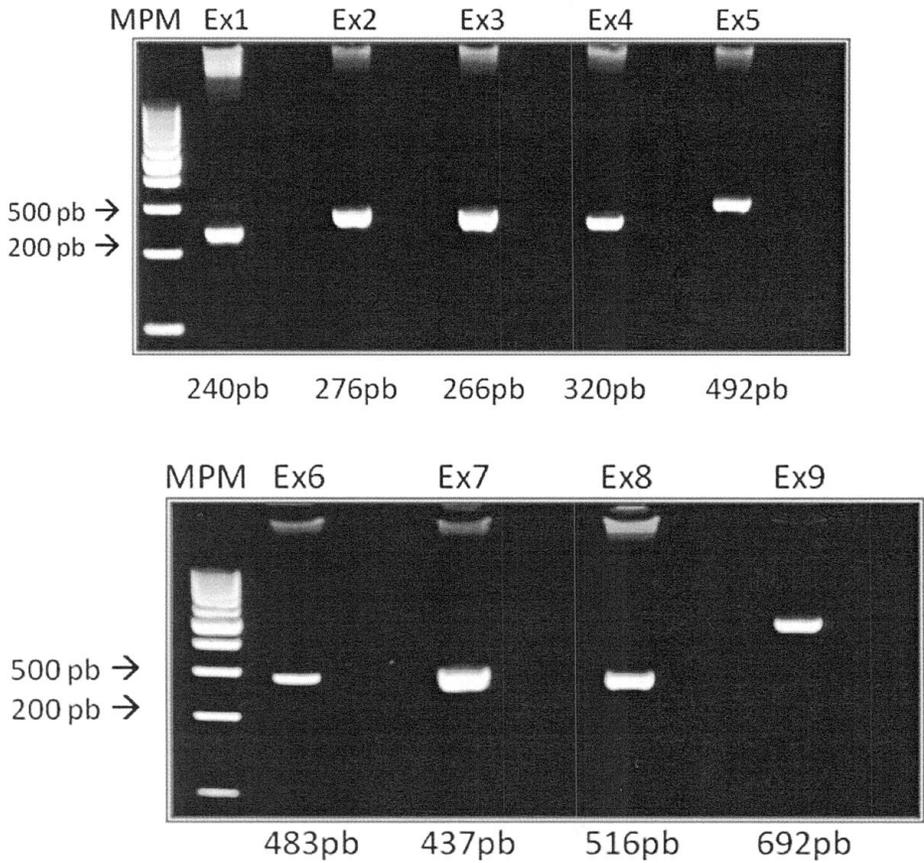


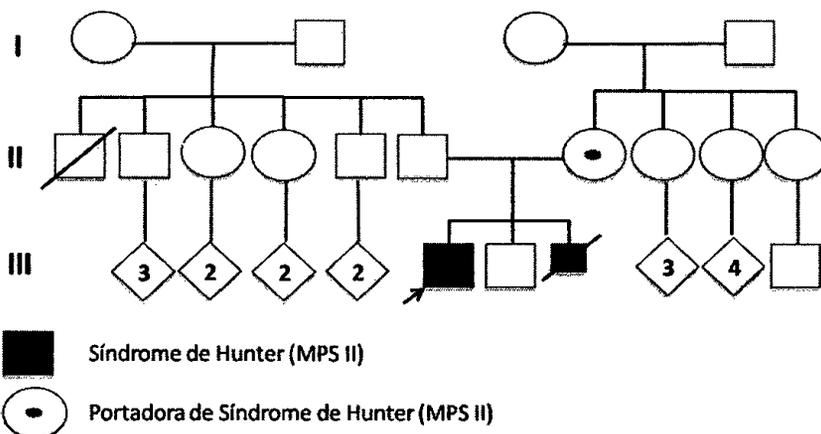
Figura 7: Ensayo de PCR (primer F específico de IDSP1 y primer R común para IDS e IDSP1). En los alelos IDSP1 sin la inversión, con ambos primers se logra amplificar solamente un segmento del intrón 3 y del intrón 7 de 1315 pb ubicados en el extremo telomérico de IDSP1; aunque el primer R común hibride en el intrón 7 de alelos IDS sin la inversión, la ausencia de hibridación de un primer F dentro de IDS impide la generación de un amplicón. El amplicón normal de IDSP1 presenta 5 sitios de restricción reconocidos por la enzima *HinfI*, lo cual genera 6 fragmentos de 451, 397, 271, 110, 71 y 15 pb. Cuando existe la inversión IDS/IDSP1, se yuxtapone la secuencia del intrón 3 del pseudogen donde hibrida el primer F y el intrón 7 de IDS donde hibrida el primer común R. Así el rearreglo permite la generación de un amplicón de 1,310 pb correspondiente a una secuencia híbrida del IDS e IDSP1. Este amplicón presenta sólo 4 de los 5 sitios de restricción *HinfI* presentes en el amplicón del alelo IDSP1 normal, por lo que se obtienen sólo 5 fragmentos de 556, 397, 271, 71 y 15 pb. Así la banda de 556 pb indica la presencia de un genotipo hemicigoto con un alelo positivo para la inversión IDS/IDSP1, en tanto la coexistencia de ambas bandas indica un estado heterocigoto para esta mutación.



*Figura 8: Esquema que representa el producto de amplificación mediante PCR de los 9 exones del gen IDS de acuerdo a los pesos moleculares de cada exón, mediante los oligonucleótidos descritos en la tabla 1; con ellos se amplifica la totalidad de la secuencia codificante del gen, así como los sitios donador y aceptor de splicing de cada exón. Posteriormente los amplicones se secuenciaron para la caracterización de las mutaciones puntuales.*

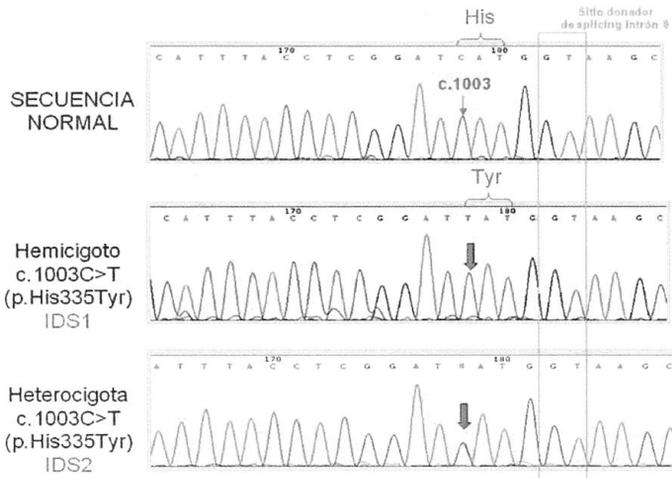
## IDS 1

Paciente masculino de 12 años 2 meses de edad con cuadro de MPS tipo II severo, sin antecedentes familiares del padecimiento. El inicio de las manifestaciones clínicas fue a los 2 años y la edad al diagnóstico 3 años. Niveles de GAGs urinarios de 145mg/gr de creatinina (5-50 mg/gr de creatinina) y la cuantificación de l2S de 26.2  $\mu$ moles/l.h. (71-187  $\mu$ moles/l.h.)



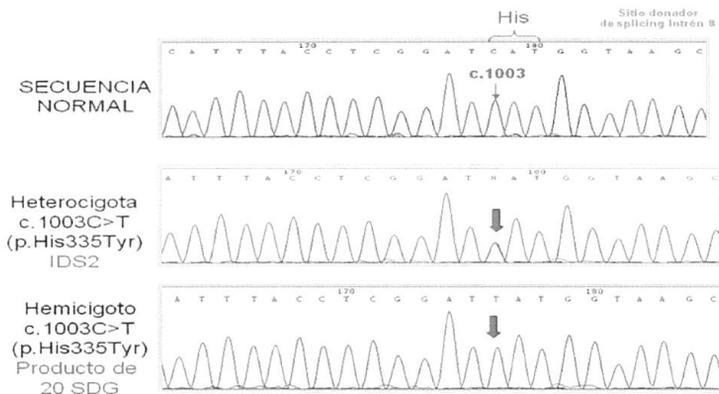
Se realizó la detección de la inversión y conversión génica de IDS por ensayo de PCR y restricción, la cual se encontró negativa, por lo que posteriormente se llevó a cabo la amplificación y secuenciación directa de los 9 exones del gen *IDS* y sus bordes exón-intrón. Se encontró una mutación puntual. c.1003C>T en el exón 7, la cual a nivel de proteína cambia una Histidina por una Tirosina (p.His335Tyr). El electroferograma se analizó con el programa Alamut version 1.51 que permite la identificación rápida y certera de la mutación, su efecto a nivel de proteína y la afección a los sitios donador y aceptor de splicing. La mutación no había sido previamente reportada y su evaluación *in silico* con el programa Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) la predice como patogénica con una sensibilidad de 0.27 y una especificidad de 0.97 (score 0.998).

Se realizó la búsqueda intencionada mediante la amplificación del exón 7 y la secuenciación de éste de la mutación en la madre, quien se encontró heterocigota para la mutación.



**Figura 9:** Secuenciación automatizada de una región del exón 7 del gen *IDS*. Se muestra al paciente *IDS1* hemicigoto para la mutación de sentido erróneo *c.1003C>T* (*p.His335Tyr*) y la identificación del estado heterocigoto en la madre (*IDS2*), la cual no refería antecedentes familiares de *MPS II*.

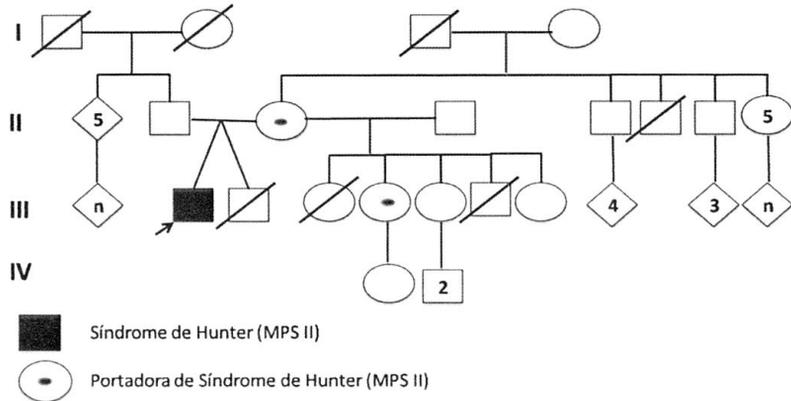
La madre del paciente *IDS1* solicitó posterior a la caracterización de su genotipo diagnóstico prenatal, por ultrasonido obstétrico se determinó que el feto era del sexo masculino, a las 20 SDG se realizó amniocentesis y se obtuvo el DNA genómico de los amniocitos sin cultivo. Se amplificó el exón 7 del gen *IDS*, detectando por secuenciación directa la mutación patogénica en el producto de la gestación, además se realizó amplificación por PCR del gen *SRY* lo cual corroboró el sexo masculino, se brindó asesoramiento genético y posterior a él, la madre decidió la interrupción de la gestación.



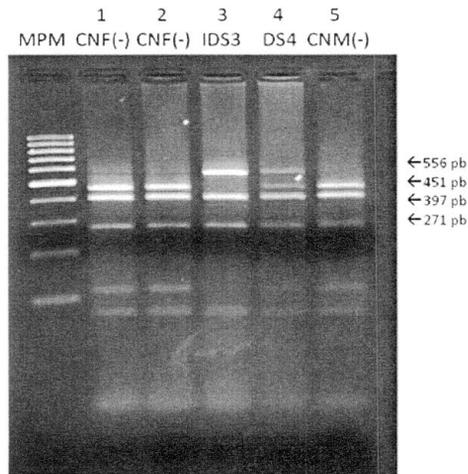
**Figura 10:** Secuenciación automatizada del exón 7 del gen *IDS*. Se muestra a la madre *IDS2* heterocigota para la mutación de sentido erróneo *c.1003C>T* (*p.His335Tyr*) y la identificación del estado hemicigoto en el producto de embarazo de 20 SDG. Se realizó detección de *SRY* comprobando sexo masculino (resultado no mostrado).

### IDS 3

Paciente masculino de 9 años 2 meses de edad con cuadro de MPS tipo II severo, sin antecedentes de la enfermedad en la familia. El inicio de las manifestaciones clínicas fue a los 2 años y la edad al diagnóstico 8 años. Los datos de niveles de GAGs urinarios y la cuantificación de I2S no se registraron en el expediente al momento de inclusión al estudio.



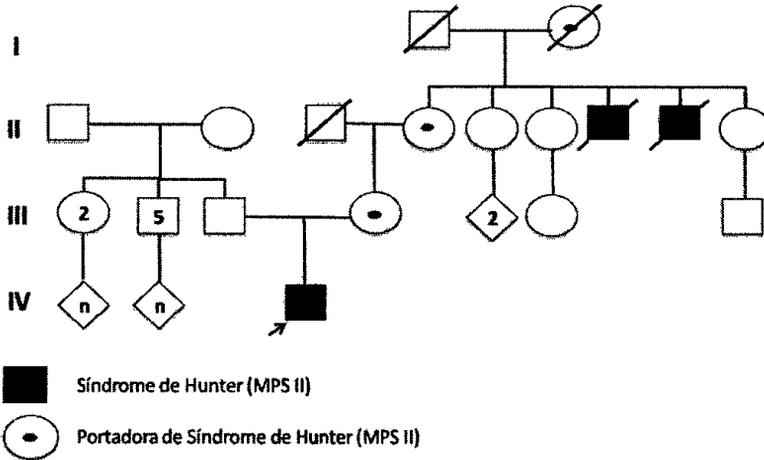
Se realizó la detección de la inversión y conversión génica de IDS por ensayo de PCR y restricción, la cual se encontró positiva. En el estudio familiar se determinó que la madre y hermana son heterocigotas para la inversión IDSP1/IDS. El paciente inició terapia de reemplazo enzimático a la edad de 9 años y medio.



**Figura11:** Ensayo de PCR (primer F específico de IDSP1 y primer R común para IDS e IDSP1) y restricción con la enzima *Hinf*I para la identificación de heterodúplex (banda de 556 pb.) resultantes de la inversión génica por recombinación IDS/IDSP1. El paciente IDS3 muestra patrón de hemicigoto y su madre, IDS4, muestra patrón de heterocigota (portadora). La hermana del paciente también es portadora de la inversión génica IDS/IDSP1 (resultado no mostrado) CNF(-): control femenino normal, CNM(-): control masculino normal.

## IDS 5

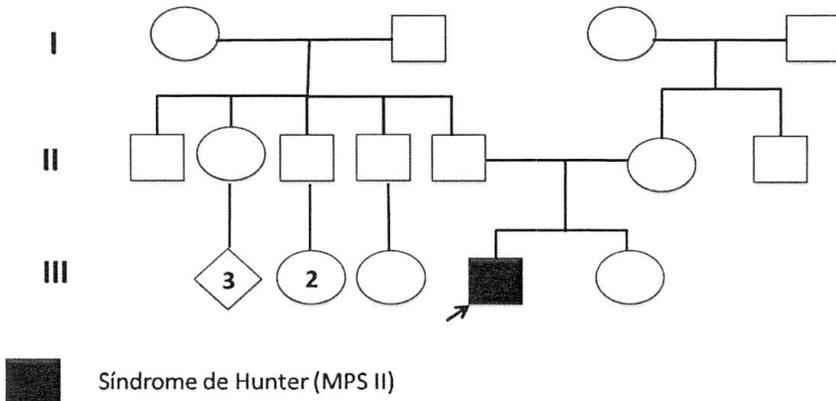
Paciente masculino de 4 años 2 meses de edad con cuadro de MPS tipo II severo, se consideró un caso familiar por antecedente de dos tíos por rama materna fallecidos con el mismo diagnóstico. El inicio de las manifestaciones clínicas fue a los 2 años 8 meses y la edad al diagnóstico 3 años. Los niveles de GAGs urinarios no se registraron en el expediente al momento de inclusión al estudio. La cuantificación de I2S fue de 1.2  $\mu\text{moles/l.h}$  (71-187  $\mu\text{moles/l.h}$ .)



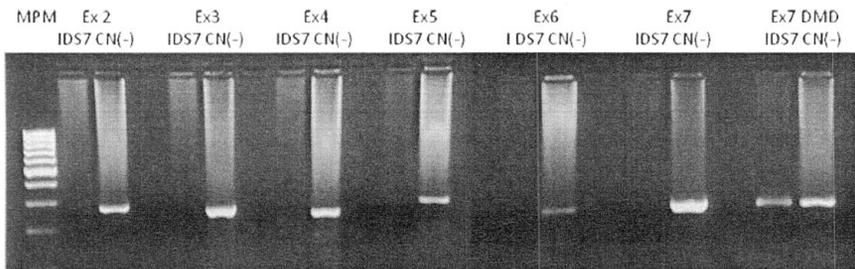
Se realizó la detección de la inversión y conversión génica de IDS por ensayo de PCR y restricción, la cual se encontró negativa por lo que posteriormente se realizó la amplificación directa de los 9 exones del gen *IDS* y sus bordes exón-intrón para su secuenciación directa. En el análisis de los electroferogramas no se encontró ninguna mutación patogénica en el paciente ni polimorfismos.

## IDS 7

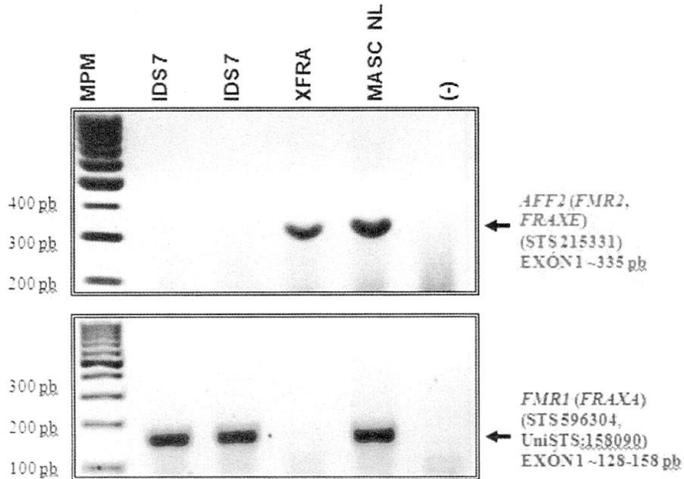
Paciente masculino de 2 años de edad con cuadro de MPS tipo II severo, sin antecedentes familiares relacionados al padecimiento de base. El inicio de las manifestaciones clínicas fue a los 6 meses y la edad al diagnóstico 1 año. Niveles de GAGs urinarios de 204.6mg/gr de creatinina (5-50 mg/gr de creatinina) y la cuantificación de IDS de 9.9  $\mu$ moles/l.h (71-187  $\mu$ moles/l.h.)



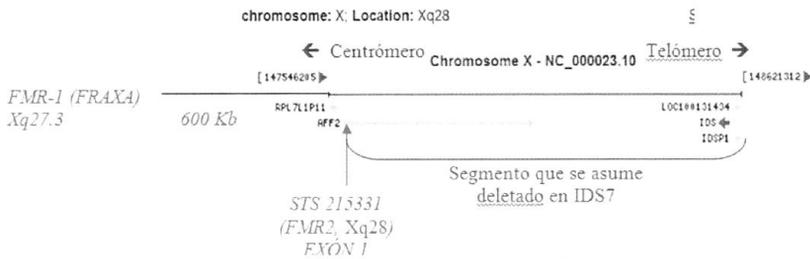
Se realizó la detección de la inversión y conversión génica de IDS por ensayo de PCR y restricción, la cual se encontró negativa, en el análisis por amplificación directa de los 9 exones del gen IDS y sus bordes exón-intrón, no se logró la amplificación de ningún exón en varias repeticiones por lo que se estableció que el paciente presenta una delección completa del gen IDS. Se llevo a cabo el análisis por PCR del gen *FMR2*, ya que se encuentra aledaño, se amplificó la región polimórfica 5'UTR (exón 1) de éste, la cual se encontró deletada, se amplificó de igual manera la región polimórfica del gen *FMR1*(Xq27.3), la cual mostró amplificación.



**Figura 12:** Amplificación por PCR de los 9 exones del gen IDS, mediante los oligonucleótidos descritos en la tabla 1; éstos contienen la totalidad de la secuencia codificante del gen, así como los sitios donador y receptor de splicing de cada exón. Se muestra que en los carriles del paciente (IDS7) no se obtuvo amplicón en ninguno de los exones, por lo que se determinó que el paciente presenta una delección completa del gen. En el último carril se amplificó el exón 7 del gen DMD como control positivo dentro del cromosoma X, el cual mostró amplicón en el paciente como en un control. CN(-) Control masculino normal (se observa amplicón en todos los exones), (-) control blanco de la reacción.

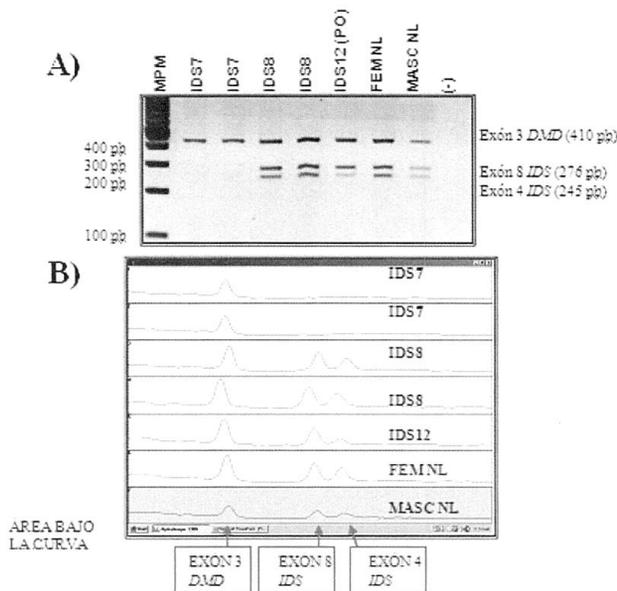


**Figura 13:** PCR de dos STS (secuencias etiqueta corta) polimórficos ubicados en región 5' no traducible de los genes *FMR2* (Xq28) y *FMR1* (Xq27.3) en el paciente IDS7 con síndrome de Hunter atribuible a una delección completa del gen *IDS* y del pseudogen aledaño *IDS1* (datos no mostrados). Nótese la ausencia de amplificación del segmento polimórfico de *FMR2* y la integridad de STS de *FMR1* en IDS7, hallazgo compatible con un síndrome de genes contiguos en el paciente. XFRA: Control masculino positivo a la mutación por expansión de trinucleótidos (CGG) en el gen *FMR1* condicionante del síndrome de X frágil, MASC NL: control masculino normal. (-) control blanco de la reacción.



**Figura 14:** Esquema que muestra la localización del gen *IDS* (Xq28) y la localización aledaña del gen *FMR2*, se ejemplifica el fragmento que se postula deletado en el paciente IDS 7, correspondiente aproximadamente a 1.2 Mb

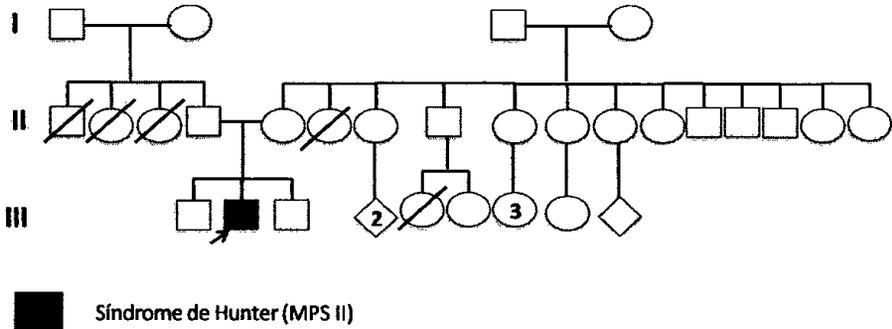
Se buscó de manera dirigida en la madre del paciente el riesgo de ser portadora a través de la evaluación de dosis génica de los exones mediante el diseño de un ensayo de PCR múltiple semicuantitativo y el análisis densitométrico con el programa Alphamager® de los exones 4 y 8 del gen *IDS* (exones problema) y del exón 3 del gen *DMD* (exón control). El cálculo de los cocientes de los valores promedios en pixeles del área bajo la curva de cada uno de los amplicones problema y el amplicón control obtenidos son compatible con una dosis génica normal, con lo cual se asume que la delección completa del gen *IDS* en IDS7 se originó como evento *de novo*, aunque el estudio no descarta la posibilidad de mosaicismo germinal.



**Figura 15:** Evaluación de la dosis génica mediante PCR múltiple semicuantitativo (A) y análisis densitométrico con el programa Alphamager® (B) de los exones 4 y 8 del gen IDS (exones problema) y del exón 3 del gen DMD (exón control) con la finalidad de asignar o descartar el estado de portadora en la madre (carril IDS8) de un caso único con síndrome de Hunter (carril IDS7, exones 4 y 8 de IDS ausentes) atribuible a una delección completa del gen IDS, la cual abarca hacia el extremo telomérico al pseudogen IDSP1 (datos no mostrados) y hacia el extremo centromérico al gen FMR2. Como controles, se utilizaron el DNA genómico de una mujer portadora obligada de una delección parcial intragénica que elimina a los exones 4 al 7 del gen IDS (carril IDS12 PO), el de una mujer normal (carril FEM NL) y el de un varón sano (MASC NL). (-) control blanco de la reacción. El cálculo de los cocientes de los valores promedios en pixeles del área bajo la curva de cada uno de los amplicones problema y el amplicón control obtenidos en las muestras IDS8 y FEM NL fueron de 0.9-1.14 y de 2.0-2.7, respecto a la muestra MASC NL. Lo anterior es compatible con una dosis génica normal para los tres segmentos en IDS8, con lo cual se asume que la delección completa del gen IDS en IDS7 se originó como evento de novo, aunque el estudio no descarta la posibilidad de mosaicismo germinal. Así mismo se aprecia que el área bajo la curva para el exón 4 en IDS12 PO se encuentra reducida en un ~50% respecto al control femenino sano, mientras que el exón 3 del gen DMD y el exón 8 del gen IDS, muestran una dosis génica similar a dicho control.

## IDS 9

Paciente masculino de 12 años 5 meses de edad con cuadro de MPS tipo II severo, aparentemente caso único en la familia. El inicio de las manifestaciones clínicas fue al año 5 meses y la edad al diagnóstico 2 años 5 meses. Niveles de GAGs urinarios de 723mg/gr de creatinina (5-50 mg/gr de creatinina) y la cuantificación de I2S no se registró en el expediente al momento de inclusión al estudio



Se analizó la inversión y conversión génica de IDS por ensayo de PCR y restricción, la cual se encontró negativa. Se llevo a cabo la amplificación directa de los 9 exones del gen IDS y sus bordes exón-intrón para posteriormente realizar la secuenciación directa. Se encontró una mutación puntual. c.133G>C en el exón 2, la cual a nivel de proteína cambia un Acido Aspártico por una Histidina (p.Asp45His). El electroferograma se analizó con el programa Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) para la identificación rápida y certera de la mutación, su efecto a nivel de proteína y la afección a los sitios donador y aceptor de splicing. La mutación no había sido previamente reportada, sin embargo se predice como patogénica con una especificidad de 1.00 (score 1.00).

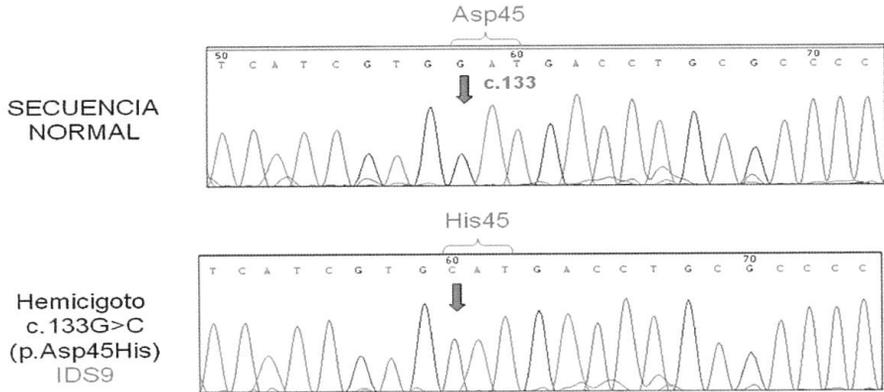


Figura 16: Secuenciación automatizada del exón 2 del gen IDS. Se muestra al paciente IDS9 hemicigoto para la mutación de sentido erróneo c.133G>C (p.Asp45His). La mutación no ha sido previamente reportada.

Se realizó la búsqueda intencionada mediante la amplificación del exón 2 y la secuenciación de éste para determinar si la madre portaba la mutación, el análisis de secuenciación mostró que ella es heterocigota para la mutación por lo que se establece que es portadora de la enfermedad.

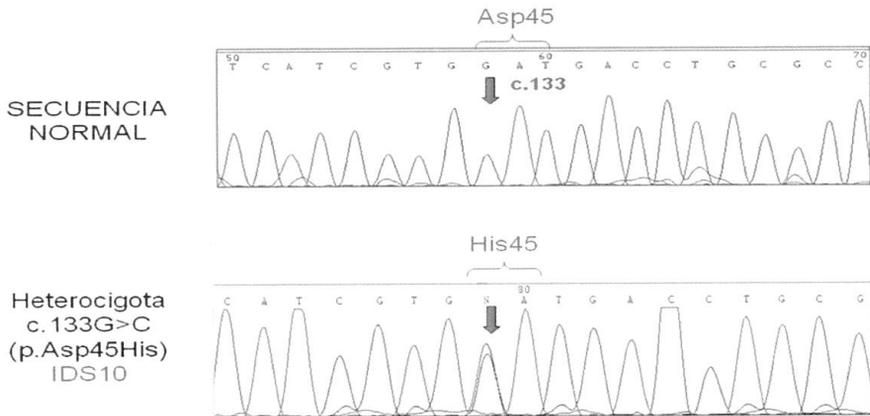
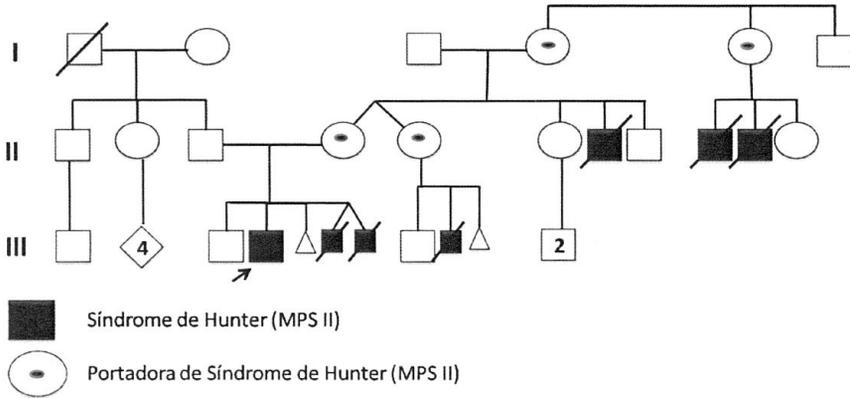


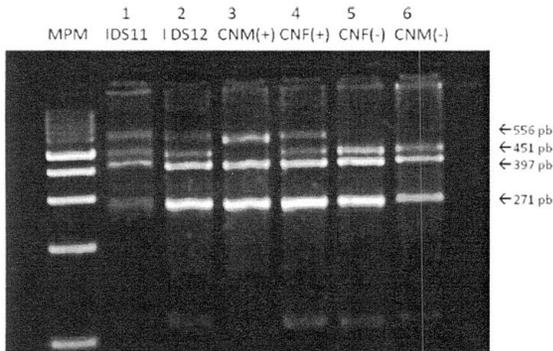
Figura 17: Secuenciación automatizada del exón 2 del gen IDS. Se muestra a IDS10, madre del caso índice IDS9, quien es heterocigota para la mutación de sentido erróneo c.133G>C (p.Asp45His).

**IDS 11**

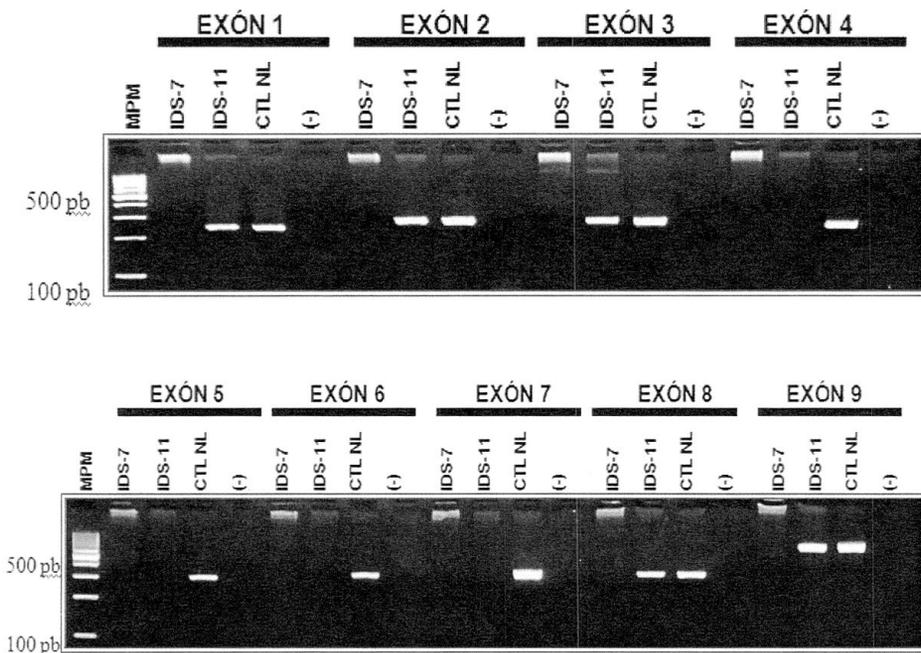
Paciente masculino de 6 años 4 meses de edad con cuadro de MPS tipo II severo, caso familiar. El inicio de las manifestaciones clínicas fue al año 6 meses de edad y la edad al diagnóstico a los 2 años 7 meses. Los niveles de GAGs no se registraron en el expediente al momento de inclusión al estudio, la cuantificación de IDS fue de 24.37  $\mu$ moles/l.h (71-187  $\mu$ moles/l.h.)



Se realizó la detección de la inversión y conversión génica de IDS por ensayo de PCR y restricción, la cual se encontró con patrón de heterocigoto. Al llevar a cabo la amplificación directa de los 9 exones del gen IDS y sus bordes exón-intrón se encontró una delección que involucra los exones 4 al 7, ante este resultado se estableció que el paciente presenta un rearreglo complejo en el gen IDS debido a que mostró un patrón de hemicigoto para la inversión IDSP1/IDS. También se estableció que la madre es heterocigota para la inversión IDSP1/IDS.

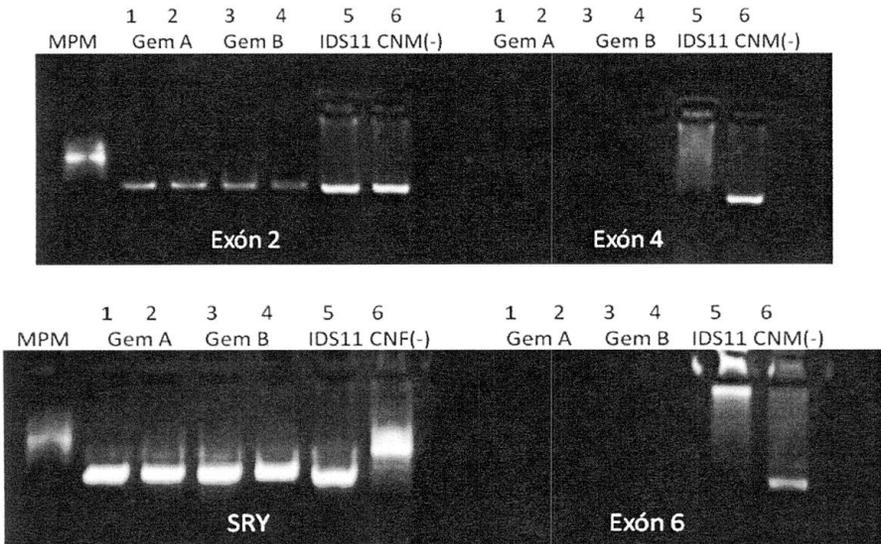


**Figura 18:** Ensayo de PCR (primer F específico de IDSP1 y primer R común para IDS e IDSP1) y restricción con la enzima *HinfI* para la identificación de heterodúplex (banda de 556 pb.) resultantes de la inversión génica por recombinación IDS/IDSP1. Se identificó un rearreglo complejo que involucra un patrón de restricción anómalo en el ensayo de IDS11, IDS 12 muestra patrón de heterocigota. CNF(+): control femenino positivo, heterocigota. CNM(+): control masculino positivo, hemicigoto. CNF(-): control femenino normal, CNM(-): control masculino normal. (-) control blanco de la reacción.



**Figura 19.** Electroforesis de los productos de PCR correspondientes a los 9 exones del gen IDS. Carril IDS-7: Paciente con la delección completa del gen IDS que se extiende hacia los loci IDSP1 y AFF2 (FMR2); nótese la ausencia de producto de PCR en las 9 reacciones monoplex de PCR de punto final. Carril IDS-11: Paciente con un rearrreglo complejo del gen IDS aún no caracterizado completamente, pero el cual involucra la delección de los exones 4 al 7 del gen IDS; nótese la presencia de sólo los productos de PCR correspondientes a los exones 1 al 3 y del 8 al 9. Carril CTL NL: control masculino sano. Carril (-): control negativo de la reacción. MPM: marcador de pesos moleculares, escalera de 100 pb.

La madre del paciente IDS11 solicitó diagnóstico prenatal de un embarazo gemelar bicoriónico biamniótico cuyos fetos eran del sexo masculino por ultrasonido obstétrico. Se realizó amniocentesis a las 16 SDG de ambos sacos amnióticos y se obtuvo el DNA genómico de los amniocitos sin cultivo. Se demostró la delección de los exones 4 al 7 así como la amplificación de SRY lo que corroboró que ambos productos eran masculinos y afectados. El diagnóstico se corroboró posteriormente en ambos cordones umbilicales, posterior a la interrupción de la gestación.



**Figura 20.** Resultados del diagnóstico prenatal molecular. El ensayo de PCR del gen SRY por duplicado resultó positivo en ambas muestras (gemelo "A" y "B"). Carriles 1 y 2: Gem A, carriles 3 y 4: Gem B. La identificación de la delección de los exones 4 al 7, se realizó con ensayo PCR monoplex por duplicado de los exones 2 (no deletado en IDS11), 4 y 6 (deletados en IDS11), el cual reveló la ausencia de los exones 4 y 6 involucrados en la delección de IDS11. Carriles CNM(-): control masculino sano, CNF: control femenino sano. (-) control blanco de la reacción. El resultado una vez recibidas ambas muestras de líquido amniótico, se obtuvo en un lapso de 6 horas y debido a que ambos fetos masculinos se encontraban afectados, la madre decidió interrumpir la gestación a las 17 SDG. La corroboración de los genotipos se hizo en muestras de DNA provenientes de material de aborto (cordón umbilical), sin encontrar discrepancias de resultados (datos no mostrados).

## 7. DISCUSIÓN

Las manifestaciones clínicas en el síndrome de Hunter se clasifican de manera tradicional en formas "moderada" y "severa", de acuerdo al involucro a nivel de SNC. Dos terceras partes de los pacientes se considera que cursan con la forma severa debido a la presencia de: retraso mental grave, crisis convulsivas e hidrocefalia comunicante, siendo lo más frecuente el retraso mental. El 100% de nuestros pacientes fueron clasificados con fenotipo severo debido a que cursaban con retraso mental, dos de ellos tenían además crisis convulsivas y ninguno mostró hidrocefalia comunicante al momento de su inclusión en el estudio. La forma moderada generalmente se diagnostica entre los 4 y 8 años de edad y su mortalidad es entre la segunda y tercera década de la vida, por enfermedad cardíaca y respiratoria. Los pacientes con formas más severas presentan progresión con mayor rapidez, con involucro multiorgánico y generalmente se diagnostican entre los 18 y 36 meses. Dentro de las formas severas, la mortalidad es secundaria al deterioro neurológico y a falla cardiorrespiratoria durante la mitad de la segunda década (Martin R., et al 2008).

La edad promedio de inicio de sintomatología en las formas severas es aproximadamente al año y medio de edad; en el presente estudio, encontramos que la edad de inicio de la sintomatología concuerda con la literatura, siendo en promedio a los 19 meses de edad; mientras que la edad promedio al diagnóstico se realizó de manera tardía (3.3 años) comparado a lo reportado en la literatura (18 a 36 meses), probablemente lo anterior se deba a que el estudio se realizó en un Instituto Nacional de tercer nivel y la referencia de los pacientes a este nivel de atención médica suele ser tardado en nuestro medio o bien al hecho de que los médicos de primer contacto no sospechan el diagnóstico ante las primeras manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas descritas en la literatura en el síndrome de Hunter más frecuentes son: facies tosca, la cual se hace aparente entre los 2 y los 4 años de edad, la talla baja, los hallazgos esqueléticos conocidos como disostosis múltiple, las infecciones de vías aéreas crónicas, la hepato-esplenomegalia, el retraso mental y el síndrome de túnel carpal (Martin R., et al 2008). Los pacientes incluidos en el presente estudio concuerdan en la presencia de manifestaciones más frecuentemente reportadas en la literatura, a excepción del síndrome del túnel carpal, el cual presenta una menor incidencia en nuestro estudio (16%) comparado a lo reportado en la literatura (> 50%) (Froissart et al., 2007), lo cual puede ser debido al número pequeño de casos descritos en este trabajo. Sin embargo, también se menciona que el síndrome de túnel carpal puede iniciar a edades tan tempranas como 29 meses pero los síntomas clínicos inician en promedio a los 7 a 8 años de edad, por lo que el diagnóstico definitivo debe realizarse mediante velocidades de conducción nerviosa (Kwon, et al., 2011), este último estudio no se llevo a cabo en este trabajo por lo que podría ser otra explicación por la que observamos una frecuencia menor de esta complicación en nuestros pacientes.

El síndrome de Hunter (MPS II) presenta un espectro mutacional con heterogeneidad importante, a la fecha se han descrito más de 330 mutaciones patogénicas en la base de datos HGMD (Human Gene Mutation Database; <http://www.hgmd.org>), se han documentado hot-spots que predisponen sitios de mayor susceptibilidad a mutaciones ya que prácticamente el 85% de las mutaciones puntuales en regiones codificantes ocurren en los exones 3, 5, 8 y 9; sin embargo, la gran mayoría de las mutaciones identificadas son únicas o privadas ya que sólo se describen en una familia. La mayoría de las mutaciones descritas son de tipo puntual (Chkioua, et al; 2011) y algunas de estas mutaciones se han examinado en estudios de expresión, sin embargo, la correlación entre genotipo-fenotipo sigue siendo no certera (Sukegawa, et al; 2006).

Lo descrito en la literatura ejemplifica que la secuenciación automatizada de los 9 exones y los bordes exón-intrón del gen *IDS* (Xq28) detecta alrededor del 82% de las mutaciones puntuales responsables del fenotipo. En este apartado se incluyen las mutaciones de sentido erróneo (missense), sin sentido (non-sense) y las que alteran el splicing. En el restante 17% de los pacientes, se demuestran pequeñas deleciones e inserciones intra-exónicas que conservan (in-frame) o corren el marco de lectura (frameshift) del gen *IDS* y rearrreglos gen/pseudogen que en ocasiones como consecuencia deletan uno o más exones del gen (Froissart et al., 2007).

Durante el presente estudio se pudieron definir de manera objetiva los rearrreglos derivados de la inversión y conversión génica del gen *IDS* mediante el ensayo PCR y restricción; las deleciones intragénicas y las deleciones completas por medio de la amplificación directa de los 9 exones del gen *IDS* y sus bordes exón-intrón; así como las mutaciones puntuales con base a la secuenciación directa de cada uno de los exones. En el 33.3% de los pacientes se caracterizaron mutaciones puntuales y en el 49.8% deleciones y rearrreglos, contrario a lo referido previamente en la literatura, ya que el porcentaje mayor lo ocupan los cambios puntuales, lo anterior puede deberse al número pequeño de casos analizados en el presente trabajo. En el restante 16.6%, que representa un paciente, no se ha caracterizado la mutación responsable, sin embargo, esa pendiente realizar el análisis de mRNA.

El estudio del mRNA del gen *IDS* mediante RT-PCR y secuenciación automatizada de la región codificante del cDNA, puede ser complementario al análisis de secuenciación automatizada de los 9 exones del gen *IDS*, ya que puede identificar de manera indirecta mutaciones en la región promotora que impidan la expresión del gen *IDS* o la identificación de mutaciones intrónicas (creación de sitios crípticos de splicing) que alteran el procesamiento del transcrito (Timms KM, et al; 1998), por lo que este estudio deberá realizarse en un futuro en el paciente IDS5 en quien aún no se caracteriza la mutación responsable.

El estudio molecular del gen *IDS* mediante el análisis de DNA genómico y mRNA, permite identificar de manera eficaz más del 90% del total de las mutaciones responsables de la patología, en el presente estudio se han identificado el 83% de éstas al analizar el DNA genómico; con la realización del análisis del mRNA mediante RT-PCR esperamos aumente este porcentaje de detección.

#### IDS 1

En este paciente, se caracterizó una mutación puntual c.1003C>T en el exón 7, la cual a nivel de proteína cambia una Histidina por una Tirosina (p.His335Tyr), esta mutación de sentido erróneo no ha sido previamente reportada, sin embargo, en la revisión de la literatura se identificó una mutación previamente descrita en el mismo codón pero con el cambio de otro aminoácido (p.Hys335Arg) en dos familias con un fenotipo severo dentro de una muestra de 121 pacientes no relacionados realizado en Francia. (Froissart et al; 2002).

Las mutaciones de sentido erróneo en las regiones codificantes del gen son consideradas de importancia funcional cuando cambian la polaridad de un aminoácido en una región altamente conservada o en regiones funcionalmente documentadas codificantes de proteínas. El residuo His335 corresponde a una posición conservada en la familia de las sulfatasas y funge como sitio de unión a calcio por lo que un cambio de aminoácido en esta posición muy probablemente es patológico (Froissart et al; 2002).

La evaluación *in silico* con el programa Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) predice a la mutación como patogénica con una sensibilidad de 0.27 y una especificidad de 0.97 (score 0.998). Consideramos que la localización cercana (3 nt) al sitio donador del intrón 8 podría alterar un sitio enhancer exónico de splicing, lo cual deberá corroborarse a través de RT-PCR y secuenciación automatizada.

El 80% de las mutaciones en el gen *IDS* son de tipo puntual, así como del tipo transición C>T, en concordancia con la mutación observada en nuestro paciente, además con relación a su localización, el exón 7 tiene una tasa de mutación de aproximadamente del 6% (Rathmann, et al; 1996). El fenotipo esperado para los pacientes con mutaciones puntuales es de moderado a severo, dependiendo de la ausencia total o parcial de la función proteica, en nuestro paciente el fenotipo es severo por lo que es posible que la mutación identificada altere de manera importante la función de la proteína. La madre del paciente se caracterizó como heterocigota para la mutación, en congruencia con lo previamente reportado en la literatura, donde el riesgo de ser portadora de la enfermedad es >90% ya que éstas mutaciones se originan en espermatogénesis y por ende se transmiten con mayor frecuencia a partir de mujeres portadoras que heredaron una mutación *de novo* a través de línea germinal paterna (Rathmann M et al., 1996).

### IDS 3

El gen *IDS*, como se ha explicado previamente, contiene la secuencia de un pseudogen ubicado a 20kb hacia el extremo telomérico y en la orientación opuesta del gen funcional, este pseudogen (*IDSP1*) tiene una región altamente homóloga a los exones 2 y 3 del gen *IDS*, así como a los intrones 2, 3 y 7. Esta región es responsable de los rearrreglos génicos ya que facilita la recombinación intracromosómica. Estas recombinaciones sugieren ser resultado de inversiones debido a la orientación invertida de las secuencias involucradas (Lualdi, et al; 2005). El estudio molecular mediante PCR restricción, permite la identificación certera de las mutaciones originadas por rearrreglos debidos a inversiones y conversiones que no pueden ser caracterizados por secuenciación del gen, el método presenta ventajas significativas sobre otros métodos convencionales como el análisis mediante Southern blot utilizado para identificar alelos complejos, debido a su menor costo, menor tiempo, menor cantidad de DNA requerida y sobre todo no requiere la utilización de radioactividad, así mismo, la PCR restricción también permite la identificación de portadoras de manera eficaz y rápida (Lualdi, et al; 2005).

El fenotipo reportado en la literatura de los pacientes con inversión *IDSP1* se considera severo en congruencia con lo caracterizado en nuestro paciente, debido a que la recombinación entre *IDS* y *IDSP1* puede generar deleciones parciales o totales e inversiones del locus *IDS*. Este tipo de rearrreglo complejo por recombinación homóloga se ha observado en cerca del 9% de los pacientes (Bondenson ML et al.).

### IDS 7

En este paciente se identificó mediante el análisis por amplificación directa de los 9 exones del gen *IDS* y sus bordes exón-intrón una deleción completa del gen. Además, se llevo a cabo el análisis por PCR del pseudogen *IDSP1* y de la región polimórfica 5'UTR (exón 1) del gen *FMR2*, ya que se encuentra aledaño, los cuales se encontraron deletados, mientras que si se obtuvo amplificación de la región polimórfica del gen *FMR1*(Xq27.3), lo anterior permitió definir que el paciente presenta un síndrome de genes contiguos.

El fenotipo en nuestro caso es severo debido a retraso mental profundo, sin embargo no muestra crisis convulsivas de inicio temprano y/o ptosis palpebral, los cuales se han descrito en la literatura en un escaso

número de pacientes en los que se ha evidenciado un síndrome de genes contiguos, los reportes de Steén-Bondeson ML et al., 1992 y Timms KM et al., 1997, sugieren que las crisis convulsivas son debidas a la delección completa del gen *IDS* que se extiende hacia regiones del extremo centromérico y las cuales deletan parcialmente la secuencia del locus *FMR-2*, gen condicionante de retraso mental ligado al cromosoma X por inestabilidad de trinucleótidos. La ptosis palpebral se ha definido en tres pacientes con este genotipo y se sugiere que podrían deberse a delecciones grandes que involucran al menos otros 6 genes y pseudogenes ubicados en una región duplicada hacia el extremo 3' o telomérico de *IDS* y cuya función es desconocida. Finalmente, Froissart, et al en el 2002, identificaron a un paciente con una delección completa del gen *IDS* la cual incluía el locus *FMR-1*, los autores concluyen que el involucro de *FMR-1* en la delección contribuyó a que su paciente tuviera un retraso mental más severo.

Nuestro paciente inició terapia de reemplazo enzimático a los 8 meses de edad, actualmente tiene 2 años y ha presentado mejoría clínica en las manifestaciones ortopédicas, con disminución de la hepatoesplenomegalia y con menor frecuencia de cuadros de infecciones de vías aéreas.

Se buscó de manera dirigida en la madre del paciente el riesgo de ser portadora a través de la evaluación de dosis génica de los exones mediante el diseño de un ensayo de PCR múltiple semicuantitativo y el análisis densitométrico con el programa Alphasizer®, con los resultados encontrados se asume que la delección completa del gen *IDS* en *IDS7* se originó como evento de novo. El estudio que realizamos no descarta la posibilidad de mosaicismo germinal en la madre; sin embargo, dado que no existen reportes de mosaicismo germinal corroborados molecularmente en *MPSII*, consideramos que la posibilidad de que la madre de nuestro paciente presente este evento con riesgo de recurrencia en futura descendencia es sumamente baja.

## IDS 9

Se caracterizó una mutación puntual c.133G>C en el exón 2, la cual a nivel de proteína cambia un Acido Aspártico por una Histidina (p.Asp45His), esta mutación de sentido erróneo no ha sido previamente reportada, pero en la revisión de la literatura se menciona una mutación en el mismo codón pero con el cambio de otro aminoácido (p.Asp45Asn) acido Aspártico por Asparagina, en un paciente de 4 años de edad con un fenotipo moderado (sin afección a nivel de SNC), los autores corroboraron mediante la utilización de un modelo proteico de estructura terciaria que este residuo es altamente conservado en la familia de las sulfatasas, junto con Asp46, Cys84, Lys135 y Asp335 (Vafiadaki, et al; 1998). El fenotipo del paciente reportado se define como moderado en contraste con el paciente de nuestro estudio, quien presenta retraso mental profundo, por lo que se requerirán describir más casos con mutaciones en este codón para determinar si se puede hacer una correlación fenotipo-genotipo.

La mutación caracterizada en nuestro paciente afecta una región altamente conservada en la familia de las sulfatasas, el residuo Asp45. (Sukegawa, et al; 2006) y la evaluación *in silico* con el programa Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) predice a la mutación como patogénica con una especificidad de 1.00 (score 1.00), lo cual considera al cambio como altamente patológico, pero también predice que por la localización del cambio es muy poco probable que altere algún sitio de enhancer exónico de splicing, por lo anterior, consideramos que el cambio observado en nuestro paciente es patológico, aún cuando no se haya descrito previamente en la literatura, sin embargo para corroborar esto y descartar que no se trata de un polimorfismo, debemos buscarlo de manera dirigida en 100 controles sanos.

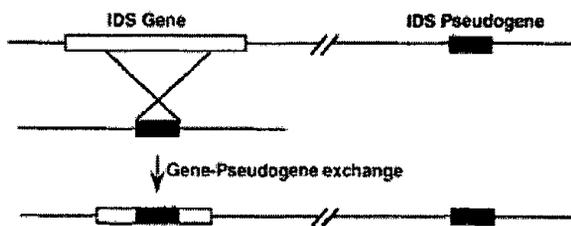
La mayoría de las mutaciones descritas en el gen *IDS* corresponden a cambios de sentido erróneo, a pesar de que nuestro paciente presenta una mutación de este tipo, lo más frecuente es encontrar transiciones tipo C>T, a diferencia de nuestro caso que es una transversión G>C, debido al cambio de purina por pirimidina los cuales siempre se predicen con mayor patogenicidad. Por otro lado, el exón 2 donde se localiza esta mutación presenta una tasa mutacional de aproximadamente 5%, lo cual lo hace uno de los menos frecuentemente involucrados en esta patología.

Con relación al estudio en la familia de nuestro caso, la madre del paciente se caracterizó como heterocigota para la mutación, acorde a lo previamente reportado en la literatura, donde el riesgo de ser portadora de la enfermedad es >90% (Rathmann M et al., 1996). Esta familia es un ejemplo de la ventaja de identificar la mutación responsable en el caso índice y la detección de portadoras, ya que en el asesoramiento genético se puede ofrecer la opción de diagnóstico prenatal molecular en futuras gestaciones.

### IDS 11

Los rearrreglos complejos se han caracterizado dentro del 20% de las alteraciones estructurales grandes que involucran al gen *IDS*, dentro de las cuales se incluyen las deleciones completas del gen y las deleciones intragénicas. Nuestro paciente muestra una deleción de los exones 4 al 7 del gen *IDS* mostrando un patrón de heterocigoto (fragmentos de 556, 451, 397 y 271 pb) en el ensayo de PCR restricción con enzima *HinfI* (Luaidi, et al; 2005). Existen hasta la fecha casos reportados de rearrreglos intragénicos complejos que como consecuencia producen la deleción de uno o varios exones del gen *IDS*, específicamente se ha reportado el caso de un paciente con un genotipo aparentemente igual al de nuestro paciente y con fenotipo severo. (Biro, et al; 1996).

Los autores observaron una deleción intragénica de 12 kb (que abarcaba del exón 4 al 7 del gen *IDS*) y por secuenciación del fragmento de 2.4kb resultante de la unión evidenciaron una secuencia híbrida (ya que se encontraba formado por secuencias tanto del gen *IDS* como del pseudogen *IDSP1*), este fragmento contenía 491 pb del intrón 3 y 1.6 kb del intrón 7 del pseudogen y 300 pb del extremo 3' del intrón 7 del gen, lo que ejemplifica un mecanismo de recombinación homóloga desigual entre *IDS/IDSP1*.



**Figura 21:** Esquema que muestra un fenómeno de recombinación homóloga desigual en meiosis femenina entre el gen *IDS* y el pseudogen *IDSP1* como un mecanismo propuesto para explicar la deleción parcial intragénica de los exones 4 al 7 de *IDS* con inserción de secuencias pertenecientes a *IDSP1* (Biro, et al; 1996).

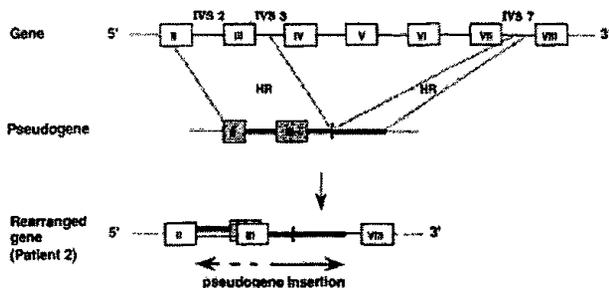


Figura 22: Esquema que representa el mecanismo propuesto para explicar la generación de la delección intragénica de los exones 4 al 7 y su reemplazo con secuencias de IDSP1 resultado de una recombinación homóloga desigual entre secuencias con alto grado de homología (HR) del exón 2, intrón 3 e intrón 7 de IDSP1 y las secuencias correspondientes del gen funcional IDS (Biot, et al; 1996). Nótese que el pseudogen insertado en IDS se encuentra en dirección invertida.

El análisis extendido mediante la amplificación de los puntos de ruptura entre los exones 3 y 7 y la secuenciación de estos, así como del segmento de unión como fue realizado por Biot, et al; 1996 se podría realizar en nuestro caso en un futuro con la finalidad de entender mejor la formación de este rearreglo complejo, sin embargo para fines diagnósticos y de asesoramiento genético, el resultado mostrado en el presente trabajo es suficiente.

La madre del paciente presenta el genotipo heterocigoto mediante el estudio de PCR restricción. En el reporte de Biot, et al; 1996, no mencionan a la madre del paciente, por lo que desconocemos si el caso era *de novo* o era un caso familiar. Se realizó diagnóstico prenatal a esta familia en un embarazo bicoriónico biamniótico, identificando a ambos productos masculinos y afectados, lo cual evidencia otra de las aplicaciones del diagnóstico molecular en las familias que tienen caracterizado su genotipo.

El diagnóstico definitivo de portadoras del síndrome de Hunter no puede establecerse mediante la actividad enzimática, ya que pueden mostrar niveles normales, debido al fenómeno de inactivación al azar del cromosoma X (Lin SP et al., 2006), por lo anterior, el análisis molecular se considera el estándar de referencia para ello en mujeres emparentadas al caso índice (madre, hermanas, tías o primas), como se ejemplifica en esta familia.

En MPS II se sabe que la mayoría de las mutaciones puntuales, particularmente del tipo transición C>T en islas CpG, se originan en espermatogénesis y por ende se transmiten con mayor frecuencia a partir de mujeres portadoras que heredaron una mutación *de novo* a través de línea germinal paterna (Rathmann M et al., 1996). Ello conlleva importantes consideraciones dentro del asesoramiento genético, ya que la madre de un caso único de MPS II presenta un riesgo muy alto (>90%) de ser portadora del padecimiento. Según lo observado en el presente estudio donde hasta la fecha se ha podido realizar el estudio de 5 madres de los pacientes y el 83% de ellas han resultado heterocigotas aún cuando no existían antecedentes familiares del padecimiento y sólo una de ellas (16%) no resultó portadora de la enfermedad. Como se discutió anteriormente, no se puede descartar en esta madre la presencia de un mosaicismo germinal, sin embargo, la posibilidad es muy baja ya que en MPS II no se ha corroborado molecularmente este fenómeno en alguna familia (Froissart, et al. 1997).

La correlación fenotipo-genotipo debido a la gran heterogeneidad genética en síndrome de Hunter ha sido difícil de establecer, lo que es evidente en todos los estudios reportados en la literatura es que depende del tipo de mutación, siendo las puntuales las más frecuentes y dentro de ellas las de sentido erróneo las de mejor pronóstico, recalando que si el cambio se encuentra en un dominio conservado de la familia de las sulfatasas presentan un fenotipo severo. Las deleciones parciales o totales del gen y los rearrreglos complejos así como las inversiones con el pseudogen predicen poca función residual por lo que el fenotipo tiende a ser más severo (Froissart, et al; 2002); concordante con lo observado en el presente estudio.

Cuando la mutación se encuentra caracterizada en la familia, mediante la obtención de biopsia de vellosidades coriales (BVC) o amniocentesis en etapas tempranas del embarazo, es posible identificar el genotipo en el feto y determinar si se encuentra afectado o sano, de acuerdo a estos resultados en el asesoramiento genético se le debe brindar a la familia la opción de inicio de tratamiento temprano (ejem. TMO o TRE), con la finalidad de disminuir y manejar a tiempo las complicaciones o bien la interrupción de la gestación como medida de prevención ante una enfermedad en la que no se cuenta tratamiento curativo (Bunge S et al., 1994, Neufeld EF & Muenzer J, 2001).

La identificación certera del espectro mutacional en el síndrome de Hunter (MPS II), además de establecer la posibilidad de la detección temprana del padecimiento, el inicio precoz del manejo médico y del diagnóstico prenatal en las familias, podría orientar hacia la respuesta al tratamiento. Se han iniciado estudios respecto a la correlación del genotipo con la respuesta al trasplante de médula ósea (TMO) y reemplazo enzimático (TRE), con resultados prometedores. Froissart, y cols, en el 2002, siguió a ocho pacientes con genotipos caracterizados posterior a TMO, el 75% correspondía a mutaciones puntuales y el 25% a deleciones completas del gen y rearrreglos intragénicos; la mayoría de los pacientes presentaron mejoría a nivel visceral (función respiratoria, cardíaca y ortopédica). La mejoría en el desarrollo cognitivo tuvo respuestas muy variables, éstas dependiendo del fenotipo, la edad de realización de TMO y el tipo de mutación, teniendo mejores resultados algunas mutaciones puntuales como por ejem. c.1715C>T en el exón 9 que a nivel de proteína (p.Gln531X), condiciona el cambio de una Glutamina por un codón de paro y la cual fue caracterizada en un paciente de 30 años de edad con un fenotipo moderado. Las mutaciones puntuales en los residuos A85 y P86, por ejemplo c.377G>A que condiciona el cambio de una Alanina por una Treonina y c.381C>T que condiciona el cambio de una Prolina por una Leucina (p.P86L) afectan dominios conservados de sulfatasas, por lo que el fenotipo identificado en ellos fue severo y la respuesta al tratamiento media (resolución de visceromegalias y recuperación ortopédica a excepción del síndrome de túnel carpal, del cual requirieron manejo quirúrgico pero el desarrollo neuropsicológico no tuvo cambios que revelaran mejoría), mientras que los pacientes con deleciones grandes tuvieron pobre respuesta al tratamiento (disminución de coeficiente intelectual de 65-75 a 30-40, sin mejoría en la frecuencia de infecciones de vía aéreas de repetición).

A pesar de los múltiples esfuerzos por encontrar manejos terapéuticos para el síndrome de Hunter, es conocido que ninguno de los tratamientos actuales tiene un efecto sobre SNC debido a que ninguno de estos traspasa la barrera hemato-encefálica; múltiples estudios apoyan el manejo con reemplazo enzimático con idursulfatasa como el de primera elección debido a la seguridad y eficacia confirmada, además de que se han reportado efectos adversos con una frecuencia baja, con poca morbilidad, dado que lo más comúnmente observado es fiebre y urticaria (65%), mientras que el desarrollo de una reacción anafiláctica no es habitual (<1%) (Wraith JE., et al 2008). La incidencia de las reacciones adversas es mayor entre las semanas 4 y 12

pero disminuye gradualmente; cuando se presentan los eventos adversos, se interrumpe la infusión y para prevenirlos se puede premedicar con antihistamínicos y/o corticosteroides. (Burrow et. al, 2008)

Se han detectado anticuerpos contra la idursulfatasa en el 50% de los pacientes, la prevalencia mayor se detecta a las 27 semanas de inicio del tratamiento (44.4% de los pacientes), sin embargo sólo el 31.7% de los pacientes continúan con anticuerpos positivos después de 53 semanas de manejo médico. A pesar de la presencia de estos IgG anti-idursulfatasa se ha observado disminución de la excreción de los glucosaminoglucanos urinarios por lo que parece que no interfieren con el efecto deseado de la TRE; sin embargo se requiere un seguimiento a más largo plazo para establecer con certeza si tienen un significado biológico en los pacientes (Burrow, et al. 2008, Burton et al, 2011).

El trasplante de células hematopoyéticas (TMO), presenta una alta morbi-mortalidad, especialmente los primeros días post-trasplante por infecciones y enfermedad injerto contra huésped (Peters C., et al 2000). En los pocos estudios que hay en la literatura, donde los pacientes con síndrome de Hunter han sido trasplantados, se describe una mejoría clínica así como una mayor supervivencia, pero dado que no tiene efecto sobre el deterioro intelectual, el uso del TMO en estos pacientes es controversial (Peters C., et al 2000).

El presente estudio es el primero en México que permite el diagnóstico certero de mutaciones en pacientes con MPSII, aunado a esto, el hecho de conocer el genotipo permite ofrecer a las familias la detección certera de portadoras y la opción de diagnóstico prenatal en futuras gestaciones, ya sea como medida de prevención o para toma decisiones con relación a las opciones de tratamiento a utilizar al nacimiento. Finalmente, es probable que mediante el conocimiento del genotipo en algunos casos también se pueda predecir la respuesta al tratamiento ya sea con TRE o TMO.

## 8. CONCLUSIONES

Las manifestaciones clínicas más frecuentemente observadas en nuestros pacientes con síndrome de Hunter fueron: retraso mental o psicomotor, artropatía, talla baja, visceromegalias e infecciones de vías aéreas de repetición; mientras que no observamos casos con hidrocefalia o degeneración retiniana.

El síndrome del túnel carpal presentó una menor incidencia en nuestro estudio comparado a lo reportado en la literatura.

La edad promedio de inicio de la sintomatología en nuestros pacientes fue a los 19 meses de edad, concordante con la literatura, mientras que la edad promedio al diagnóstico se realizó de manera más tardía, comparado con lo referido en literatura.

Si bien el diagnóstico de Síndrome de Hunter (MPS II) se realiza convencionalmente de manera clínica, y bioquímica, el abordaje molecular permite confirmar la sospecha clínica y brindar un asesoramiento genético certero así como la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal como lo muestra el presente trabajo.

Mediante la técnica de PCR restricción se logró la identificación de los rearrreglos derivados de la inversión y conversión génica en un paciente (16.66%). Por medio de la amplificación directa de los 9 exones del gen *IDS* y sus bordes exón-intrón se identificaron deleciones completas del gen y parciales en dos pacientes (33.3%) y con base a la secuenciación directa de cada uno de los exones mutaciones puntuales en dos pacientes más (33.3%), sólo en un caso no se logró identificar la mutación patogénica (16.6%).

El estudio molecular del gen *IDS* permite identificar de manera eficaz más del 90% del total de las mutaciones responsables de la patología, en el presente estudio se han identificado el 83% de éstas; con la realización del análisis del mRNA mediante RT-PCR, en un futuro esperamos aumentar este porcentaje.

En el presente estudio se identificaron dos mutaciones puntuales no reportadas previamente en la literatura y un rearrreglo complejo, el cual se ha descrito con anterioridad sólo en una ocasión.

Las mutaciones caracterizadas correlacionan con el fenotipo severo observado en todos los pacientes incluidos en el estudio, dado que presentan retraso mental.

Durante el presente estudio se logró la identificación de madres portadoras en un 83% (4 de 5), de las cuales sólo dos referían antecedentes familiares del padecimiento, muy cercano al porcentaje referido en la literatura (90%), lo que permitió brindar un asesoramiento genético de certeza.

La caracterización del genotipo responsable de la enfermedad permitió que se realizara con éxito diagnóstico prenatal en dos familias, lo que posterior a asesoramiento genético permitió a ambas madres la toma de decisiones antenatales.

Dos de los pacientes se encuentran en tratamiento con TRE, sin embargo por el alto costo de esta terapia, no se ha llevado a cabo en los otros pacientes, además, ninguno de los pacientes del presente estudio fue candidato a TMO debido a que se recomienda su realización en el primer año y los pacientes fueron diagnosticados en edades posteriores.

El presente estudio es el primero en México en el cual se realiza la identificación de genotipos responsables de síndrome de Hunter (MPS II) lo cual permite ofrecer a las familias la detección certera de portadoras y la opción de diagnóstico prenatal.

Es probable que mediante la caracterización del genotipo en algunos casos también se pueda predecir la respuesta al tratamiento ya sea con TRE o TMO.

9. ANEXOS

**ANEXO 1: HOJA DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN: PACIENTES.**

**"ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II  
(SÍNDROME DE HUNTER)"**

NOMBRE: \_\_\_\_\_

No. EXPEDIENTE: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_

MANIFESTACIONES CLÍNICAS:

EDAD DE INICIO DE LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS \_\_\_\_\_

EDAD AL DIAGNÓSTICO \_\_\_\_\_

CRISIS CONVULSIVAS	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
HIDROCEFALIA COMUNICANTE	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
RETRASO MENTAL	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
RETRASO PSICOMOTOR	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
F ACIES TOSCA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
TALLA BAJA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
DISOSTOSIS MÚLTIPLE	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
PTOSIS	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
OPACIDAD CORNEAL	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
DEGENERACIÓN RETINIANA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
ARTROPATÍA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
SX TÚNEL CARPAL	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
CANAL MEDULAR ESTRECHO	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
HEPATOMEGALIA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
ESPLENOMEGALIA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
OTITIS MEDIA DE REPETICIÓN	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
HIPOACUSIA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
VOZ GRAVE	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
DIARREA CRÓNICA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
VALVULOPATÍA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
CARDIOMIOPATIA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
DIARREA CRÓNICA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>

GAG'S URINARIOS: \_\_\_\_\_

CUANTIFICACIÓN I2S: \_\_\_\_\_

MUTACIÓN \_\_\_\_\_

POLIMORFISMO \_\_\_\_\_

ANALISIS MOLECULAR EN LA MADRE \_\_\_\_\_

HERMANOS \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO 2.1

### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: "ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)".

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. POBLACIÓN OBJETIVO: OBTENCIÓN DE DNA Y RNA.

México, D. F., a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo \_\_\_\_\_ participe en el proyecto "ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)", que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 5-10 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. **Se me ha explicado que por la toma de la muestra ocasionalmente se presenta leve molestia al momento de la venopunción y de manera infrecuente, hematoma (moretón) e inflamación local que resuelve a los pocos días.**

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (DNA y RNA) de mi hijo el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden ser las responsables de la enfermedad Mucopolisacaridosis tipo II o síndrome de Hunter. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en mi familia.

Entiendo que los datos personales de mi hijo en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA/RNA de mi hijo quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio del síndrome de Hunter y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada. Además, en el entendido que la participación de mi hijo es total y absolutamente voluntaria, podemos abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo en cualquier servicio de la Institución.

#### DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido que mi hijo participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de



## ANEXO 2.2

### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: "ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)".

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. PADRES Y OTROS FAMILIARES DE LOS PACIENTES DE LA POBLACIÓN OBJETIVO.

México, D. F., a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_

Por medio de la presente, yo con parentesco (padre, madre u otro parentesco) \_\_\_\_\_, del paciente \_\_\_\_\_ hago constar que estoy de acuerdo en **participar** en el proyecto "ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)", que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere de 3 a 5 ml. de sangre periférica, la cual será obtenida por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. **Se me ha explicado que por la toma de la muestra ocasionalmente se presenta leve molestia al momento de la venopunción y de manera infrecuente, hematoma (moretón) e inflamación local que resuelve a los pocos días.**

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá mi material genético (DNA) el cual determina mis características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en el síndrome de Hunter o mucopolisacaridosis tipo II en mi descendencia. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer las causas genéticas del síndrome de Hunter o mucopolisacaridosis tipo II y que dicho estudio posiblemente podría ayudar a prevenir la ocurrencia de esta enfermedad en otro miembro de mi familia. Se me ha explicado que los resultados del estudio genético se me explicarán a través de un asesoramiento genético por parte de las Dras. Ariadna Estela González del Ángel (tel. 10 84 09 00 ext. 1306) y Lilita Fernández Hernández, donde se me explique el riesgo de recurrencia del del síndrome de Hunter o mucopolisacaridosis tipo II en otro miembro de mi familia.

Entiendo que mis datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y éstos no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi persona recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado también que mi muestra de DNA quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y los datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio del síndrome de Hunter o mucopolisacaridosis tipo II, siempre y cuando se preserve la confidencialidad de la información derivada. Se me ha asegurado que toda información derivada del análisis de mi muestra de DNA para este estudio es absolutamente confidencial y con fines exclusivamente destinados al desarrollo del trabajo de investigación. Además, en el entendido que mi participación es total y absolutamente voluntaria, puedo abandonar el estudio

y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

#### DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este proyecto de investigación. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

#### Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma
Obtuvo el consentimiento: _____	_____	_____
	Nombre	Fecha

Investigador responsable: Dra. Ariadna Estela González del Angel. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel. 10840900 ext. 1306.

Presidente del Comité de Ética: Dr. Marco Antonio Yamazaki. Tel. 10 84 09 00 ext. 1581.

### ANEXO 2.3

#### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

**“ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)”.**

**CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO. POBLACIÓN OBJETIVO PACIENTES, HERMANOS O HERMANAS: OBTENCIÓN DE DNA Y RNA.**

México, D. F., a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Yo, \_\_\_\_\_ quien soy \_\_\_\_\_ (Paciente, \_\_\_\_\_ Hermano o \_\_\_\_\_ Hermana) \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en participar en el proyecto **“ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)”**, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 5-10 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. **Se me ha explicado que por la toma de la muestra ocasionalmente se presenta leve molestia al momento de la venopunción y de manera infrecuente, hematoma (moretón) e inflamación local que resuelve a los pocos días.**

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (DNA y RNA) de mi persona el cual determina mis características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden ser las responsables de la enfermedad Mucopolisacaridosis tipo II o síndrome de Hunter. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en mi familia.

Entiendo que mis datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi persona recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que mi muestra de DNA/RNA quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio del síndrome de Hunter preservando siempre la confidencialidad de la información derivada. Además, en el entendido



## ANEXO 2.4

### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: "ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)".

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. HERMANAS Y HERMANOS MENORES DE EDAD: OBTENCIÓN DE DNA Y RNA.

México, D. F., a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo (a) \_\_\_\_\_ quien es (Hermano o Hermana) de \_\_\_\_\_ participe en el proyecto "ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR EN FAMILIAS MEXICANAS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)", que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 5-10 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. **Se me ha explicado que por la toma de la muestra ocasionalmente se presenta leve molestia al momento de la venopunción y de manera infrecuente, hematoma (moretón) e inflamación local que resuelve a los pocos días.**

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (DNA y RNA) de mi hijo (a) el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden ser las responsables de la enfermedad Mucopolisacaridosis tipo II o síndrome de Hunter. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en mi familia (saber si mi hija es portadora del padecimiento).

Entiendo que los datos personales de mi hija en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo (a) recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA/RNA de mi hijo (a) quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio del síndrome de Hunter y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada. Además, en el entendido que la participación de mi hijo (a) es total y absolutamente voluntaria, podemos



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcántara MA, García-Cavazos R, Hernández-U E, González-del Angel A, Carnevale A, Orozco L. Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. *Ann Genet* 2001; 44: 149-153.
2. Alcántara Ortigoza MA, Aguinaga Ríos M, González del Angel A, Zavaleta Abreu MJ, Acevedo Gallegos S, Mayén Molina DG, Del Castillo Ruiz V. Prenatal molecular diagnosis of a DMD carrier female fetus by chorionic villus sampling and linkage analysis. *Ginecol Obstet Mex.* 2009; 77(2):103-109.
3. Birot AM, Bouton O, Froissart R, Maire I, Bozon D. IDS Gene-Pseudogene Exchange Responsible for An Intragenic Deletion in a Hunter Patient. *Hum Mut* 1996; 8:44-50.
4. Bondeson ML, Malmgren H, Dahl N, Carlberg BM, Pettersson U: Presence of an IDS-related locus (IDS2) in Xq28 complicates the mutational analysis of Hunter syndrome. *Eur J Hum Genet* 1995(a); 3: 219–227.
5. Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tønnesen T, Carlberg BM, Pettersson U. Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1995(b); 4: 615–621.
6. Bonuccelli G, Regis S, Filocamo M, Corsolini F, Caroli F, Gatti R. A deletion involving exons 2-4 in the iduronate-2-sulfatase gene of a patient with intermediate Hunter syndrome. *Clin Genet.* 1998; 53(6):474-7.
7. Bunge S, Steglich C, Beck M et al: Mutation analysis of the iduronate-2-sulfatase gene in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Hum Mol Genet* 1992; 1: 335–339.
8. Bunge S, Steglich C, Lorenz P, Beck M, Xu S, Hopwood JJ, Gal A. Prenatal diagnosis and carrier detection in mucopolysaccharidosis type II by mutation analysis. A 47,XXY male heterozygous for a missense point mutation. *Prenat Diagn.* 1994 Sep;14(9):777-80.
9. Bunge S, Rathmann M, Steglich C, Bondeson ML, Tylki-Szymanska A, Popowska E, Gal A. Homologous nonallelic recombinations between the iduronate-sulfatase gene and pseudogene cause various intragenic deletions and inversions in patients with mucopolysaccharidosis type II. *Eur J Hum Genet.* 1998 Sep-Oct;6(5):492-500.
10. Burrow A, Leslie N. Review of the use of idursulfase in the treatment of mucopolysaccharidosis II. *Biologics: Targets & Therapy* 2008; 2(2): 311–320.
11. Chkioua L, et al. Molecular analysis of iduronate-2-sulfatase gene in Tunisian patients with mucopolysaccharidosis type II. *Diag Patol* 2011; 6:42-47
12. Cudry S, Froissart R, Bouton O, Maire I, Bozon D. The 2.1-, 5.4- and 5.7-kb transcripts of the IDS gene are generated by different polyadenylation signals. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1447(1):35-42.
13. FDA, Consumer. Treatment for Hunter syndrome approved. *FDA Consum.* 2006(a); 40: 4.
14. FDA, Consumer. First treatment for Hunter Syndrome. *FDA Consum.* 2006(b); 40: 5.
15. Filocamo M, Bonuccelli G, Corsolini F, Mazzotti R, Cusano R, Gatti R. Molecular analysis of 40 Italian patients with mucopolysaccharidosis type II: New mutations in the iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Hum Mutat.* 2001; 18(2):164-5.

16. Flomen RH, Green PM, Bentley DR, Giannelli F, Green EP. Detection of point mutations and a gross deletion in six Hunter syndrome patients. *Genomics*. 1992; 13(3):543-50.
17. Flomen RH, Green EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F. Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 5–10.
18. Froissart R, Blond JL, Maire I, Guibaud P, Hopwood JJ, Mathieu M, Bozon D. Hunter syndrome: gene deletions and rearrangements. *Hum Mutat* 1993; 2: 138–140.
19. Froissart R, Millat G, Mathieu M, Bozon D, Maire IL. Processing of iduronate-2-sulphatase in human fibroblasts. *Biochem J* 1995; 309:425–430.
20. Froissart R; Maire I, Millat G, Cudry S, Birot A-M, Bonnet V, Bouton O, Bozon D. Identification of iduronate sulfatase gene alterations in 70 unrelated Hunter patients. *Clin. Genet* 1998; 53: 362-368.
21. Froissart R, Moreira da Silva I, Guffon N, Bozon D, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II-genotype/phenotype aspects. *Acta Paediatr Suppl* 2002; 91(439):82-7.
22. Froissart R, Da Silva IM, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatr Suppl*. 2007; 96: 71–7.
23. Gort L, Chabás A, Coll MJ. Hunter disease in the Spanish population: molecular analysis in 31 families. *J Inherit Metab Dis*. 1998; 21(6):655-61.
24. Gouw SC, van den Berg HM. The Multifactorial Etiology of Inhibitor Development in Hemophilia: Genetics and Environment. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35(8):723-734.
25. Grosso M, Balzano N, Rippa E, Villani GR, Salvatore F, Izzo P, di Natale P. Molecular genetic characterization and prenatal diagnosis in a family with Hunter disease. *Biochem Mol Biol Int*. 1995; 35(6):1261-7.
26. Guffon N, Bertrand Y, Forest I, Fouilhoux A, Froissart R. Bone marrow transplantation in children with Hunter syndrome: Outcome after 7 to 17 years. *J Pediatr* 2009; 154: 733-7.
27. Kishnani PS, Goldenberg PC, DeArmedy SL, Heller J, Benjamin D, Young S, Bali D, Smith SA, Li JS, Mandel H, Koerber D, Rosenberg A, Chen YT. Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab* 2010; 99(1):26-33.
28. Lagerstedt K, Karsten SL, Carlberg B-M et al. Double-strand breaks may initiate the inversion mutation causing the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 627–633.
29. Li P, Bellows AB, Thompson JN. Molecular basis of iduronate-2-sulphatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *J Med Genet*. 1999; 36: 21–
30. Li P, Thompson JN, Hug G, Huffman P, Chuck G. Biochemical and Molecular Analysis in a Patient With the Severe Form of Hunter Syndrome After Bone Marrow Transplantation. *Am J Med Gen*. 1996; 64:531-535
31. Lin SP, Chang JH, Lee-Chen GJ, Lin DS, Lin HY, Chuang CK. Detection of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) in Taiwanese: biochemical and linkage studies of the iduronate-2-sulfatase gene defects in MPS II patients and carriers. *Clin Chim Acta* 2006; 369(1):29-34.
32. Lorne AC. The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. *Expert. Rev. Mol. Med*. 2008; 10(1):1-18

33. Lualdi S, Regis S, Di Rocco M, Corsolini F, Stroppiano M, Antuzzi D, Filocamo M. Characterization of iduronate-2-sulfatase gene-pseudogene recombinations in eight patients with Mucopolysaccharidosis type II revealed by a rapid PCR-based method. *Hum Mutat.* 2005; 25(5):491-7.
34. Lualdi S, Pittis MG, Regis S, Parini R, Allegri AE, Furlan F, Bembi B, Filocamo M. Multiple cryptic splice sites can be activated by IDS point mutations generating misspliced transcripts. *J Mol Med* 2006; 84(8):692-700.
35. Malmgren H, Carlberg BM, Pettersson U, Bondeson ML. Identification of an alternative transcript from the human iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics.* 1995; 29(1):291-3.
36. Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Muñoz V, Muenzer J. Recognition and Diagnosis of Mucopolysaccharidosis II (Hunter Syndrome). *Pediatrics.* 2008; 121:377-386
37. McKinnis E, Sulzbacher S, Rutledge J, Sanders J, Scoot R. Bone marrow transplantation in Hunter syndrome. *J Pediatrics.* 1996;129 (1):145-148
38. Moreira da Silva I, Froissart R, Marques dos Santos H, Caseiro C, Maire I, Bozon D. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II in Portugal: identification of four novel mutations. *Clin Genet.* 2001; 60(4):316-8.
39. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. Chapter 136. pp. 3421-3452. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS. *The metabolic and molecular bases of Inherited Disease.* 8<sup>th</sup> Ed. 2001. McGraw-Hill Medical Publishing Division.
40. Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T. Japan Elaprase Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab* 2010; 99(1):18-25.
41. Peters C, Krivit W. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis IIB (Hunter syndrome). *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1097–1099.
42. Rathmann M, Bunge S, Steglich C, Schwinger E, Gal A: Evidence for an iduronate-sulfatase pseudogene near the functional Hunter syndrome gene in Xq27.3–q28. *Hum Genet* 1995; 95: 34–38.
43. Rathmann M, Bunge S, Beck M, Kresse H, Tytki-Szymanska A, Gal A: Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): Mutation 'hot spots' in the iduronate-2-sulfatase gene. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1202–1209.
44. Sardiello M, Annunziata I, Roma G, Ballabio A. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet* 2005; 14:3203–3217.
45. Steén-Bondeson ML, Dahl N, Tønnesen T, Kleijer WJ, Seidlitz G, Gustavson KH, Wilson PJ, Morris CP, Hopwood JJ, Pettersson U. Molecular analysis of patients with Hunter syndrome: implication of a region prone to structural alterations within the IDS gene. *Hum Mol Genet.* 1992; 1(3):195-8.
46. Sukegawa K, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fukao T. Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: Enzymatic activity, protein processing and structural analysis; *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29:755-61
47. Timms KM, Lu F, Shen Y, Pierson CA, Muzny DM, Gu Y, Nelson DL, Gibbs RA. 130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfate sulfatase locus. *Genome Res.* 1995 5(1):71-8.

48. Timms KM, Bondeson ML, Ansari-Lari MA, Lagerstedt K, Muzny DM, Dugan-Rocha SP, Nelson DL, Pettersson U, Gibbs RA. Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6(3):479-86.
49. Timms KM, Hockett LE, Belmont JW, Shapira SK, Gibbs RA. DNA deletion confined to the iduronate-2-sulfatase promoter abolishes IDS gene expression. *Hum Mutat* 1998; 11:121-126.
50. Vafiadaki E, Cooper A, Heptinstall LE, Hatton CE, Thornley M, Wraith JE. Mutation analysis in 57 unrelated patients with MPS II (Hunter's disease). *Arch Dis Child* 1998; 79:237-241
51. Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J Inher Metab Dis.* 1999; 22:638-648.
52. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS et al: Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8531–8535.
53. Wilson PJ, Suthers GK, Callen DF, Baker E, Nelson PV, Cooper A, Wraith JE, Sutherland GR, Morris CP, Hopwood JJ. Frequent deletions at Xq28 indicate genetic heterogeneity in Hunter syndrome. *Hum Genet.* 1991; 86(5):505-8.
54. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP: Sequence of the human iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics* 1993; 17: 773–775.
55. Wraith JE, Cooper A, Thornley M, Wilson PJ, Nelson PV, Morris CP, Hopwood JJ. The clinical phenotype of two patients with a complete deletion of the iduronate-2-sulphatase gene (mucopolysaccharidosis II–Hunter syndrome). *Hum Genet* 1991; 87(2):205-6.
56. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, Meldgaard L, Malm G, . Van der Ploeg A, Zeman J. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 267–277