



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**“AMPLIA HETEROGENEIDAD ALÉLICA CON PREDOMINIO DE  
GRANDES REARREGLOS COMPLEJOS DEL GEN *IDS* EN UNA  
MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE  
HUNTER”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN  
GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA:**

**ROCÍO RIUS DOMÍNGUEZ**

**TUTOR DE TESIS: DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ANGEL**

**COTUTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**



**MÉXICO, D. F. 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

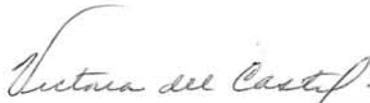
AMPLIA HETEROGENEIDAD ALÉLICA CON PREDOMINIO DE GRANDES  
REARREGLOS COMPLEJOS DEL GEN *IDS* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES  
MEXICANOS CON SÍNDROME DE HUNTER



DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ  
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA



DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL  
TUTOR DE TESIS



DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
COTUTOR DE TESIS

---

## **Agradecimientos**

Agradezco a los colaboradores que me permitieron formar parte de este proyecto:

Alcántara-Ortigoza Miguel A<sup>a</sup>

García-de Teresa Benilde<sup>a</sup>

González-del Angel Ariadna<sup>a</sup>

Berumen Jaime<sup>b,c</sup>

Guardado-Estrada Mariano<sup>c</sup>

Fernández-Hernández Liliana<sup>a</sup>

Navarrete-Martínez Juana Inés<sup>d</sup>

Maza-Morales Mariana<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana; Instituto Nacional de Pediatría. Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes-Cuicuilco, Coyoacán, 04530. México,

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Dr. Balmis 148, Cuauhtémoc, Doctores, 06726. México, Distrito Federal.

<sup>c</sup> Unidad de Medicina Genómica, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Cuauhtémoc, Doctores, 06726. México, Distrito Federal.

<sup>d</sup> Servicio de Genética. Hospital de Alta Especialidad PEMEX Picacho Sur. Boulevard Adolfo Ruíz Cortínez-Periférico Sur 4091, Fuentes del Pedregal, Tlalpan, 14140. México, Distrito Federal.

<sup>e</sup> Médico Residente de Pediatría, Instituto Nacional de Pediatría. Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes-Cuicuilco, Coyoacán, 04530, México, Distrito Federal.

## **Agradecimientos**

**A mi familia:** Ma, Fran, Iris, Paco, Dian, Laura, Lau, Mariana, Moni gracias por estar siempre conmigo, nunca lo hubiera logrado sin ustedes.

**A mis tutores:** la Dra. Ariadna y el Dr. Miguel Ángel, jamás podré terminar de agradecer todo el apoyo, dedicación y conocimiento que me otorgaron durante estos años.

**A Rey:** eres una excelente persona y el mejor compañero, fui muy afortunada de compartir esta residencia contigo,.

**A mis compañeros:** *Adri, Marisol, Moy, Elizabeth, Paulina, Samuel, Luisa, Apam, Sinhué, Dennise, Lore y Alan* muchas gracias por su amistad.

**A José:** eres un ejemplo de inteligencia y humildad, gracias por todo lo que me enseñaste, por creer en mi y echar porras con los artículos.

**A la Dra. Del Castillo:** gracias por abrirme las puertas a este Instituto que se volvió mi casa por 3 años y por su constante motivación.

**Al Departamento de Genética Humana del INP:** al área clínica, al laboratorio de citogenética, al laboratorio de biología molecular, al laboratorio de cultivo de tejidos; por ser los mejores maestros y hacer de mi una mejor persona.

**A los pacientes:** *por dejarme entrar en sus vidas y por todas las lecciones que he aprendido de ustedes.*

## ÍNDICE

1. Resumen .....	6
2. Antecedentes.....	7
3. Planteamiento del Problema .....	8
4. Justificación.....	9
5. Objetivos.....	9
6. Material y Método .....	10
7. Resultados.....	13
8. Discusión.....	15
9. Conclusión.....	21
10. Referencias .....	23
Tablas y Figuras .....	27

## 1. RESUMEN

La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o Síndrome de Hunter, es una enfermedad por atesoramiento lisosomal ligada al cromosoma X, condicionada por variantes patogénicas en el gen *IDS* (Xq28,9 exones) que conllevan a la deficiencia de la iduronato-2-sulfatasa (I2S), enzima clave en el catabolismo de heparán y dermatán sulfato. Su incidencia se calcula en 1.3/100,000 recién nacidos vivos varones, aunque en México esta cifra se desconoce. El análisis molecular del gen *IDS* confirma el diagnóstico en varones además de ser la única opción de diagnóstico certero en portadoras. Se ha descrito una amplia heterogeneidad alélica, con más de 479 variantes patogénicas en su mayoría de tipo puntual (~80%) y pequeñas deleciones/inserciones de menos de 20 pares de bases (pb). El 20-25% presentan deleciones parciales o completas del gen y de loci aledaños, entre otros rearrreglos complejos como inversiones, generados por eventos de recombinación debido al alto grado de homología entre *IDS* y el pseudogen aledaño *IDSP1*.

Se presenta el primer estudio que delimita el espectro mutacional en 25 pacientes mexicanos no relacionados con MPS II. Se determinó el genotipo responsable en 24/25 familias (96%) y reportamos 10 variantes patogénicas nuevas: c.133G>C, c.1003C>T, c.1025A>C, c.463\_464delinsCCAGCTATACGG, c.754\_767del, c.1132\_1133del, c.1463del, c.508-1G>C, c.1006+1G>T y [c.(-217\_103del)]. Se identificaron deleciones completas del gen *IDS* en cuatro pacientes con fenotipo severo, las cuales fueron delineadas mediante análisis de microarreglos de CNV/SNP, en dos pacientes se observó pérdida completa del gen *AFF2*, sin embargo sólo uno de ellos desarrolló crisis convulsivas, lo cual ha sido referido en la literatura en los pacientes con deleciones de genes contiguos. En nuestro estudio se

observa un aparente predominio de rearrreglos complejos (inversiones génicas IDS/IDSP1, deleciones parciales o completas del gen IDS y un alelo quimérico IDS-IDSP1) respecto a lo descrito en otras series (36% vs 18.9-29%) aunque esto puede atribuirse al tamaño de la muestra. La frecuencia de portadoras (80%) está acorde a lo reportado en la literatura (>70%) y esto permitió realizar diagnóstico prenatal en 3 ocasiones. Es de llamar la atención la identificación de mosaicismo somático y germinal en una familia. Finalmente, se describen dos pacientes que presentaron púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) y pancitopenia posterior al tratamiento con reemplazo enzimático con idursulfasa.

En conclusión, existe una amplia heterogeneidad alélica en pacientes mexicanos con MPSII, mientras que el análisis de microarreglos contribuye a delinear el fenotipo resultante para deleciones de *IDS* y loci aledaños.

## 2. ANTECEDENTES

La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o Síndrome de Hunter (OMIM #309900), es una enfermedad por atesoramiento lisosomal ligada al cromosoma X recesiva, condicionada por variantes patogénicas en el gen *IDS* (OMIM #300823) en Xq28 que conllevan a la deficiencia de la iduronato-2-sulfatasa (I2S), enzima clave en el catabolismo de heparán y dermatán sulfato. Distal y telomérico al gen *IDS*, se encuentra un pseudogen homólogo (*IDSP1*, 1.4 kb) localizado en orientación invertida y considerado un “hot spot” para recombinaciones homólogas no alélicas entre ambos loci, generando diferentes tipos de rearrreglos *IDS-IDSP1* y deleciones del gen *IDS* (1-4).

El análisis molecular del gen *IDS* confirma el diagnóstico en varones además de ser la única opción de diagnóstico certero en portadoras, lo que además brinda la posibilidad de realizar diagnóstico prenatal o preimplantacional. Se ha descrito una amplia heterogeneidad alélica, con más de 479 variantes patogénicas en su mayoría de tipo puntual (~80%) y pequeñas deleciones/inserciones de menos de 20 pb (5-7). El 20-25% presentan rearrreglos complejos como inversiones generados por eventos de recombinación debido al alto grado de homología entre *IDS* y el pseudogen aledaño *IDSP1*, así como deleciones parciales o completas del gen y de loci aledaños (8), los cuales se han asociado con crisis convulsivas de difícil control debido a la pérdida de genes adyacentes *AFF2* y/o *FMR1* (8-9).

Desafortunadamente, la alta proporción de mutaciones “privadas” y la ausencia de un consenso estandarizado para delinear el espectro de severidad en MPS II, dificulta una clara correlación fenotipo-genotipo (5,7,10), pero se asume que los rearrreglos grandes se asocian con fenotipo severo, caracterizado por involucro importante del sistema nervioso central (SNC) (5,7).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se busca conocer cuáles son los tipos y la frecuencia de mutaciones patogénicas en el gen *IDS* en una muestra de pacientes mexicanos referidos con sospecha diagnóstica de MPSII o síndrome de Hunter.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de que la terapia de reemplazo enzimático (TRE) está disponible desde el 2008, en nuestro país, la prevalencia de síndrome de Hunter o MPS II y su espectro mutacional son desconocidos. El conocer el genotipo de pacientes permite brindar un asesoramiento genético de certeza, identificación de portadoras, determinar riesgos de recurrencia y ofrecer la opción de diagnóstico prenatal en las familias.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **General**

Caracterizar las mutaciones del gen *IDS* condicionantes de síndrome de Hunter o MPSII en una muestra de pacientes de origen mexicano.

##### **Específicos**

- Caracterización de las variantes en el gen *IDS*, así como su frecuencia en pacientes con diagnóstico confirmado de MPS II.
- Identificar a las mujeres emparentadas al caso índice como portadoras de la enfermedad con base en el estudio molecular del gen *IDS*, en aquellas familias en quienes se haya caracterizado la mutación.
- Determinar si las mutaciones patogénicas encontradas en pacientes con MPS II son en su mayoría heredadas u originadas como eventos *de novo*.

## 6. MATERIAL Y METODO

### a) Descripción de la población de estudio.

Se incluyeron 25 pacientes masculinos, mexicanos, no relacionados (entre 2 y 16 años de edad, Tabla 1) con diagnóstico enzimático (n=14), enzimático y molecular (n=4) o sospecha clínica de MPS II (n=7), así como 24 madres de los casos índice y otros familiares en riesgo, varones (n=1), mujeres (n=16). La historia familiar positiva de MPS II se documentó en 7/24 pacientes (28%), en un caso no se tuvo información de datos familiares. Los pacientes se clasificaron como fenotipo severo (n=20/25), leve (n=3/25) y desconocido (2/25) con base en el involucro neurológico (Tabla 1). Se realizaron tres diagnósticos moleculares prenatales en dos familias no relacionadas cuyas madres eran portadoras obligadas (IDS1 e IDS11). El estudio fue aprobado por los Comités de Bioética e Investigación (22/2010).

### b) Estudio molecular del gen *IDS*.

Las muestras de DNA genómico se obtuvieron a partir de leucocitos de sangre periférica o mucosa oral en todos los participantes (también se obtuvieron muestras de sedimento urinario y raíces del pelo en la madre del paciente IDS31). El diagnóstico prenatal se realizó entre las 16 y 20 semanas de gestación y el DNA genómico se obtuvo de amniocitos cultivados (n=1) y no cultivados (n=3, dos de un embarazo gemelar). El sexo fetal se identificó mediante amplificación de un fragmento del gen *SRY* (270 pb). Se realizó confirmación del genotipo *IDS* mutado, posterior a la terminación médica del embarazo, en DNA genómico derivado de muestras de cordón umbilical de dos pacientes (embarazo gemelar).

El genotipo *IDS* de cuatro casos no familiares de MPS II (IDS31, -51, -62, y -71), previamente reportado por un laboratorio externo, fue corroborado utilizando un método directo con el propósito de establecer el estado de portadora en sus familiares femeninos. El algoritmo molecular utilizado en los 21 pacientes restantes, en quienes el genotipo *IDS* no estaba previamente caracterizado, inició con la identificación de la inversión *IDS/IDSP1* mediante un ensayo de PCR-RFLP-*HinfI* previamente descrito (4); incluyendo como controles: un paciente con inversión *IDS/IDSP1*, un femenino heterocigoto para la inversión *IDS/IDSP1*, un masculino sano y un blanco. Los pacientes que mostraron un patrón normal de restricción con *HinfI* en por lo menos dos ensayos independientes (lo que sugiere la presencia de una delección grande) fueron sometidos a amplificación por PCR y a secuenciación directa bidireccional automatizada de los 9 exones y bordes intrón-exón del gen *IDS* (11).

En la familia del paciente IDS55, en quien el algoritmo diagnóstico previo no evidenció una mutación a nivel genómico, se obtuvo cDNA a partir de mRNA de leucocitos de sangre periférica y se realizó RT-PCR seguido de secuenciación automatizada de cuatro fragmentos sobrelapados que abarcan la secuencia codificante completa de la isoforma "a" del gen *IDS* (NM\_000202.6).

Todas las variantes identificadas de sentido erróneo nuevas fueron buscadas en las diferentes bases de datos disponibles: dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), the NHLBI Exome Sequencing Project en the Exome Variant Server (EVS, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), LOVD ([http://grenada.lumc.nl/LOVD2/MR/home.php?select\\_db=IDS](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/MR/home.php?select_db=IDS)) y en la literatura.

Además éstas fueron analizadas en 133 alelos *IDS* de 92 controles sanos. Adicionalmente estas variantes fueron analizadas *in silico* usando los programas PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) y Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT; [http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)). Todas las variantes patogénicas pequeñas y nuevas se agregaron a la base de datos LOVD.

Con el fin de excluir la posibilidad de un fracaso de amplificación debido a problemas técnicos en los pacientes en los que se sospechaba una delección grande (*IDS7*, -28, -58 y -76) y para delimitar los tamaños de las delecciones *IDS / IDSP1*, se amplificaron tanto la secuencia con repetidos trinucleótidos GCC situada en 5' UTR del gen *AFF2* (Xq28, ~ 335 pb; UniSTS ID: 156199, Sonda GDB: 215.331) así como la secuencia que contiene repetidos en el 5' UTR del gen *FMR1* (Xq27.3, ~ 150 pb; UniSTS ID: 158090, Sonda GDB: 596304). Las muestras de DNA genómico de estos pacientes se analizaron posteriormente con un microarreglo CytoScan™ de alta densidad (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.) (8). Los microarreglos se realizaron de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante. El DNA (250 ng) se digirió con *NspI*, se amplificó por PCR, fragmentó, y etiquetó. Los microarreglos se hibridaron, se lavaron y se escanearon utilizando un escáner GeneChip 7G 3000 y el software de la Consola de Comandos Affymetrix. Se generaron archivos de intensidad de la célula (CEL), y se transportaron al software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS) ver. 2.0.1 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). Para el cálculo de los ratios de  $\log_2$ , se empleó un conjunto de 380 muestras de referencia del ChAS, que incluyó 284 muestras de HapMap y 96 muestras de hombres y mujeres sanos. El suavizado y los métodos de unión, que se emplearon para determinar segmentos de variantes en número de copias, se llevaron a cabo utilizando la configuración predeterminada.

## 7. RESULTADOS

Se identificaron variantes patogénicas en 24/25 (96%) pacientes. (Tabla 1). Se caracterizaron un total de 15 mutaciones puntuales y mutaciones pequeñas de corrimiento de marco de lectura (60%), cada una en una familia diferente, 9 de ellas (c.133G>C, c.1003C>T, c.1025A>C, c.463\_464delinsCCAGCTATACGG, c.754\_767del, c.1132\_1133del, c.1463del, c.508-1G>C and c.1006+1G>T), incluyendo una deleción del exón 1 [c.(-217\_103del)] fueron “*de novo*”. Las tres mutaciones de sentido erróneo nuevas c.133G>C (p.Asp45His), c.1003C>T (p.His335Tyr) y c.1025A>C (p.His342Pro) alteran la cadena de 42KDa (a.a. 34-455) del transcrito maduro 12S y afectan residuos altamente conservados en el dominio de la superfamilia de homólogos de fosfatasa alcalina (a.a 38-416); el análisis *in silico* de estas mutaciones las predicen como dañinas con altos intervalos de confianza y no se observaron en controles sanos (Tabla 1). Las transiciones C>T y G>A se encontraron en 6 de 10 mutaciones puntuales, donde c.253G>A (p.Ala85Thr), c.262C>T (p.Arg88Cys), c.1265G>A (p.Cys422Tyr) y c.1403G>A (p.Arg468Gln) se encontraban en dinucleótidos CpG.

Las únicas variantes patogénicas recurrentes fueron la inversión *IDS-IDSP1* (n=3 pacientes, 12%) y las deleciones extensas delineadas mediante el estudio de microarreglos de CNV/SNP (n=4 pacientes, 16% Tabla 1). El tamaño de las deleciones grandes fue extremadamente variable desde 157kb (paciente IDS28) a 1.8Mb (IDS7). La región deletada en el paciente IDS28, que incluía a *IDS* y a *IDSP1*, también se encontraba deletada en otros 3 pacientes (Figura 1). Los pacientes IDS7 y IDS76 presentaban las deleciones más grandes en el análisis de microarreglos (1.8Mb y 1.3Mb respectivamente) e incluía a el gen *AFF2* (tabla 1 y Figura 1) , lo

que va acorde con los resultados obtenidos en la PCR donde existía ausencia de amplicon para la sonda GDB 215331. Por otro lado, todos los pacientes conservaron el gen *FMR1*, lo que esta a acorde con la presencia de amplicon para la sonda GDB 596304.

Se observó un patrón heterocigoto para la inversión *IDS/IDSP1* en el ensayo de restricción con *Hinfl*, mostrando una delección parcial de los exones 4 al 7 del gen *IDS* en el paciente IDS11 y su madre, identificada como portadora obligada. Estos hallazgos sugerían la presencia de un rearreglo complejo involucrando una inserción *IDSP1* (alelo *IDS-IDSP1* quimérico) (2), para confirmarlo se generó el fragmento quimérico de 3682pb mediante PCR utilizando los primers 2F (exón 2 *Forward*) y 8R (exón 8 *Reverse*), el cual posteriormente fue secuenciado, de acuerdo a lo descrito previamente (13).

La secuenciación del fragmento de PCR específico 2F/8R del paciente IDS11, su madre identificada como portadora, y un hermano gemelo afectado confirmó la presencia del alelo quimérico *IDS-IDSP1* (2,5,13).

El estado de portadora se identificó en 20/24 (80%) madres, mediante historia familiar (la madre del caso familiar IDS78 no se encontró disponible para el estudio molecular) y mediante análisis molecular en las familias con historia familiar desconocida (1/25), positiva (6/25) o negativa (12/25).

A pesar de no identificar de manera precisa la alteración en el genotipo del probando IDS5, se confirmó el estado de portadora de un defecto de “splicing” (corte y empalme) en la madre (portadora obligada), al observar en ella, por medio de RT-PCR en mRNA obtenido de sangre periférica, el transcrito aberrante ( 461 pb, con ausencia de las 175 pb de l exón 8) y el transcrito normal (635 pb, c.880-c.1523).

Dos madres portadoras obligadas (pacientes IDS1 e IDS11) solicitaron tres diagnósticos prenatales, en los cuales se identificó cuatro fetos masculinos afectados basado en los resultados de la amplificación del gen *SRY* y la identificación del alelo quimérico *IDS-IDSP1* (IDS11) en ambos gemelos, así como la presencia de la mutación hemicigota c.1003C>T (IDS1) en el gen *IDS* en dos fetos (Tabla 1). Posterior al asesoramiento genético, se realizó terminación médica de gestación por solicitud de las familias y sólo se contó con muestras de cordón umbilical en el embarazo gemelar, en las cuales se corroboró el resultado molecular anormal.

## 8. DISCUSIÓN

El espectro mutacional de la MPS II en población Latino-Americana ha sido recientemente reportado (7); sin embargo, no se incluyeron pacientes mexicanos. En nuestro estudio describimos por primera vez el espectro mutacional del gen *IDS* en una muestra de pacientes mexicanos con MPS II en 25 familias no relacionadas. Es de llamar la atención, que a pesar del tamaño de la muestra (n=25), se observó una gran heterogeneidad alélica, pues se identificaron la mayoría de mutaciones descritas en otras grandes series (5-7), nueve mutaciones puntuales nuevas, una delección en el exón 1 nueva, una mutación no conocida de “splicing”, un alelo quimérico *IDS-IDSP1* (2,5) y cuatro delecciones completas *IDS/IDSP1* delineadas mediante microarreglos de CNV/SNP (Tabla 1).

Las cuatro mutaciones puntuales identificadas en este estudio que ocurren en dinucleótidos CpG (4/10;40%) , son transiciones altamente recurrentes C>T o G>A, por lo que podrían considerarse como “hot spots” y están referidas en LOVD, HGMD

y en la literatura (6-7, 13-14); Éstas representan el 40% (4/10 mutaciones puntuales), lo cual está acorde a lo referido en la literatura (47%) (14). Respecto a las cinco mutaciones de corrimiento de marco de lectura identificadas, sólo c.596\_599delAACA es recurrente, por un mecanismo de apareamiento erróneo durante la replicación del DNA (13) favorecido por dos secuencias repetidas directas que la flanquean (14), lo cual se ha descrito en diferentes poblaciones (13,15-16).

Para definir precisamente el defecto "splicing" en IDS5, se requiere un análisis detallado los intrones 7 y 8, sin embargo predice una delección en marco de 58 residuos (p.Trp337\_Gly394del), causada por un salto aberrante del exón 8. Esto imposibilita la generación de cantidades identificables de transcrito de *IDS* normal en la muestra de mRNA obtenida de sangre periférica en el masculino afectado, por lo menos por la técnica utilizada de RT-PCR, electroforesis en gel y secuenciación automatizada. Este defecto puede alterar el dominio de la superfamilia de las Arisulfatasas A y enzimas relacionadas (AsIA, a.a. 33-544). Este transcrito alterado es muy diferente al precursor I2S isoforma "b" normal, el cual contiene un dominio C-terminal diferente por la utilización de un exón 3' terminal alternativo y no presenta toda la secuencia derivada del exón 9. Estos hallazgos correlacionan con la actividad muy baja I2S encontrada (1.2 nmol/hr/mL, rango normal: 12-23 nmol/hr/mL), con la presencia de visceromegalias, disostosis múltiple, involucro cardíaco, retraso psicomotor severo así como con las muertes a temprana edad de dos tíos por rama materna (18 y 7 años) de los cuales se refiere un fenotipo altamente sugestivo de enfermedad lisosomal.

El algoritmo molecular empleado permitió determinar el genotipo responsable de MPS II en el 96% de nuestros pacientes, una proporción comparable a estrategias similares utilizadas en otras grandes series de pacientes: Caucásicos (100% de 155

pacientes) (5), Latino-Americanos (100% de 103 pacientes) (7) y Coreanos (98.5%, 69 de 70 pacientes) (16). El espectro mutacional identificado sugiere que las alteraciones génicas grandes consistentes en inversiones *IDS-IDSP1* (n=3), deleciones grandes del gen *IDS* (n=4) y parciales (n=1), así como el alelo quimérico *IDS-IDSP1* (n=1) son más frecuentes en nuestra población (9/25, 36%) que lo descrito en Caucásicos (27/155, 17.4%) (5), Latino-Americanos (20/103, 19.4%) (7), Chinos (11/38, 29%) (15) y Coreanos (14/74, 18.9%) (16). El alelo quimérico *IDS-IDSP1*, poco común en MPS II (1/155 (5) a 1/18 (13)), es caracterizado por el reemplazo de los exones 4 al 7 del gen *IDS* con parte de la secuencia del pseudogen *IDSP1* (2). Sin embargo es importante recalcar que la frecuencia real de este alelo complejo puede estar subestimada, ya que el análisis de amplificación de los 9 exones del gen *IDS* mediante PCR, sólo mostraría la deleción de los exones 4 al 7, lo cual sin el ensayo de PCR-RFLP con *HinfI*, no identificaría el rearreglo del alelo quimérico. Debido a esto, sugerimos que cuando se identifican estos exones deletados por PCR (16), Southern blot (18) o mediante amplificación del cDNA por RT-PCR (13), debe realizarse el ensayo de restricción con la finalidad de identificar adecuadamente estas mutaciones. Un ejemplo de lo anterior, es ilustrado por los pacientes Coreanos KH-14, KH-15 y KH-16 quienes inicialmente fueron clasificados como deleciones parciales del gen *IDS* (exones 4 o 6 al 8) mediante estudio por Southern blot (18), sin embargo tuvieron que ser reclasificados con un genotipo de recombinación (16) al realizarse el ensayo de PCR-RFLP (4).

Grandes series han estimado que las deleciones completas del gen *IDS* son responsables del 3-4.5% de los pacientes con MPS II, usualmente confiriendo un fenotipo severo (5,7,19). Estos pacientes en los que además se demuestra la pérdida de los genes contiguos *FMR1* y *AFF2*, muestran un retraso psicomotor

grave y/o déficit intelectual (8,20), hidrocefalia (8,21), hipotonía (22) y crisis convulsivas (8,9). La delección de genes contiguos *IDS-IDSP1-AFF2* identificada en los pacientes IDS7 e IDS76 (Tabla 1, Figura 1) es similar a aquellos descritos previamente. Las manifestaciones clínicas predominantes en ellos consisten en hipotonía, crisis convulsivas y déficit intelectual grave en congruencia con un fenotipo severo de MPS II (9,22). Con excepción de la hipotonía, el paciente IDS7 presenta un fenotipo severo, lo cual llevó a un diagnóstico definitivo de MPS II al año de edad, se inició TRE con idursulfatasa al año 11 meses de edad pero a los 4 años y 5 meses presentó un cuadro de deterioro cerebral con hemiparesia derecha, la resonancia magnética (IRM) y la tomografía axial computarizada (TAC) mostraron hidrocefalia comunicante que requirió derivación ventrículo-peritoneal. Desafortunadamente, a pesar del procedimiento presentó pérdida bilateral de la visión, audición, locomoción y comunicación verbal, así como crisis convulsivas de difícil control (aproximadamente 15 episodios al día).

El segundo paciente con la delección *IDS-IDSP1-AFF2* (IDS76, Tabla 1, Figura 1), fue referido para este estudio a los 10 años de edad con discapacidad intelectual grave, sin presencia de crisis convulsivas ni hidrocefalia. La ausencia de las crisis convulsivas en este paciente podría sugerir que la delección contigua de los genes *AFF2* y/o *FMR1*, no implica en todos los casos la presencia de crisis convulsivas (20,23). Honda y cols., 2007 reportaron un paciente con el mismo genotipo (22) quien a la edad de 23 meses no presentaba crisis convulsivas ni hidrocefalia, sin embargo, así como en nuestro paciente IDS7, debe ofrecerse un seguimiento estrecho con imagen cerebral.

El porcentaje de identificación de portadoras observado (20%) es similar a lo descrito en la literatura en otras series (15.6-24%) (5-7). Además, la identificación de

mosaicismo somático y germinal (1/20 de las portadoras) sugiere que esta condición debe considerarse dentro del asesoramiento genético de estas familias. Existen reportadas únicamente otras dos familias con MPS II (2/155, 1.29%) en quienes se ha descrito un mosaicismo somático y germinal; sin embargo, aún no se han reportado casos con mosaico germinal "puro" (5).

La variante patogénica c.463\_464delinsCCAGCTATACGG fue identificada únicamente en DNA genómico a partir de una muestra de sedimento urinario de la madre del paciente IDS31 (Figura 2), sin embargo la presencia de un mosaico somático bajo en leucocitos de sangre periférica, mucosa oral, o raíz del pelo no se puede descartar debido a que el ensayo de secuenciación automatizada utilizado no es cuantitativo. De hecho, la prevalencia real del mosaicismo somático y/o germinal en MPS II sin historia familiar podría estar subestimado, ya que generalmente se consideran casos *de novo*, ya que el alelo mutado es raramente cuantificado en DNA genómico de diferentes tejidos maternos, así como tampoco se realizan estudios moleculares en otros miembros de la familia. Por lo anterior, sugerimos extender el estudio molecular a otros familiares en riesgo a pesar de documentar un genotipo *IDS* normal en la madre.

Los tres procedimientos prenatales que se realizaron en este estudio ejemplifican una estrategia preventiva real que se puede ofrecer a las familias Mexicanas con MPS II. Esto es relevante dado que la experiencia en diagnóstico prenatal en Latinoamérica es limitada; sólo se ha identificado un caso de MPS II prenatal en Latinoamérica mediante estudio molecular y análisis enzimático I2S (24). Además, la caracterización del genotipo responsable de MPSII en parejas en riesgo abre la posibilidad de ofrecer diagnóstico preimplantacional; sin embargo, este método aun no esta disponible en nuestro país.

Por otra parte, es de llamar la atención que aunque no se ha reportado una correlación entre efectos adversos por Terapia de remplazo enzimático TRE y y el genotipo *IDS*, los hermanos gemelos de IDS33 afectados (con genotipo inversión *IDS/IDSP*), desarrollaron purpura trombocitopenica idiopática PTI y pancitopenia posterior a la suspensión de la TRE (0.5mg/kg/semana). El tratamiento con Idursulfasa se inició a los 7 años de edad, después de 6 sesiones, uno de los gemelos desarrolló rash, urticaria y edema de glotis por lo que se suspendió la TRE. Dieciséis meses después presentó hemorragia gingival y plaquetopenia ( $2 \times 10^9/L$ ). Basado en estudios de biometría hemática y biopsia de médula ósea, se diagnosticó PTI, se inició manejo con metilprednisolona oral e inmunoglobulina intravenosa con poca respuesta por lo que se realizó esplenectomía a los 8 años y medio de edad, lo cual mejoró el conteo plaquetario ( $37 \times 10^9/L$ ). Un año después el paciente desarrolló una infección de vías respiratorias bajas y sangrado de tubo digestivo alto, falleciendo a los 9 años 6 meses de edad. El segundo gemelo afectado recibió 25 sesiones de TRE, sus padres decidieron la suspensión de la misma a los 9 años y medio debido a una mala progresión clínica y aumento de infecciones respiratorias. Cuatro meses después, fue hospitalizado por bronconeumonía severa, edema generalizado y petequias diseminadas; se identificó leucopenia ( $0.5 \times 10^9/L$ ) y trombocitopenia ( $25 \times 10^9/L$ ) requiriendo transfusión plaquetaria y manejo farmacológico con metilprednisolona, a las 24 horas la respuesta en el conteo plaquetario fue discreta ( $42 \times 10^9/L$ ). Se diagnosticó PTI por hallazgos observados en biopsia de médula ósea (hipocelularidad, disminución de megacariocitos y línea eritroide) así como por el antecedente de misma patología en su hermano gemelo. Como consecuencia de choque séptico, bronconeumonía y pancitopenia el paciente falleció un día después de su ingreso. El paciente IDS33 (hermano menor de los

gemelos) ha tenido un tratamiento con TRE ininterrumpido por 7 años y nunca ha presentado signos clínicos ni de laboratorio sugestivos de PTI o algún otro efecto adverso relacionado con idursulfasa.

Existe en la literatura al menos otro reporte de un paciente con MPS II quien desarrolló PTI después de 8 meses de tratamiento con idursulfasa, dicho paciente, Caucásico de 20 años de edad respondió adecuadamente al tratamiento intravenoso con inmunoglobulina. En este reporte la TRE fue considerada la principal etiología de la PTI (25). Sin embargo, no se describe PTI ni otros efectos adversos hematológicos serios en el reciente estudio multicéntrico publicado de idursulfasa en niños con MPS II, aunque, uno de los 28 pacientes tratados desarrolló eosinofilia (26). Ciertamente existen explicaciones alternativas para las anomalías hematológicas observadas en nuestros pacientes, por ejemplo, infecciones virales o bacterianas, pero es de llamar la atención que la trombocitopenia ha sido descrita en pacientes con tratamiento con galsulfasa en MPS VI (27), por lo que es posible que las alteraciones hematológicas en los pacientes gemelos descritos en este trabajo puedan ser originadas por una reacción adversa tardía idiosincrática a la TRE.

## **9. CONCLUSIÓN**

Los resultados apoyan la existencia de una amplia heterogeneidad alélica en pacientes mexicanos con MPSII, en el que los rearrreglos complejos se encuentran con mayor frecuencia que lo reportado previamente en otras poblaciones (36% vs 19.9-29%). El análisis por microarreglos permite delinear el fenotipo resultante para delecciones extensas de *IDS* y loci vecinos pues apoya que la pérdida de *IDS* y *AFF2*

no resulta en un genotipo con penetrancia completa para el desarrollo de crisis convulsivas. Adicionalmente, la identificación de mosaicismo somático y germinal en esta muestra relativamente pequeña (1/25 familias, 4%) enfatiza la necesidad de considerar este fenómeno al brindar asesoramiento genético. Por otro lado, se necesita tomar atención al desarrollo de PTI y pancitopenia en 2 hermanos afectados con MPSII tras tratamiento con idursulfatasa.

## 10. REFERENCIAS

1. Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H et al. Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (4): 615-621.
2. Birot AM, Bouton O, Froissart R, Maire I, Bozon D. IDS gene-pseudogene exchange responsible for an intragenic deletion in a Hunter patient. *Hum Mutat* 1996; 8 (1): 44-50.
3. Bunge S, Rathmann M, Steglich C, Bondeson ML, Tytki-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; 6 (5): 492-500.
4. 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): 491-497.
5. Froissart R, Da Silva IM, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatr Suppl* 2007; 96 (455): 71-77.
6. Pollard LM, Jones JR, Wood TC. Molecular characterization of 355 mucopolysaccharidosis patients reveals 104 novel mutations. *J Inher Metab Dis* 2013; 36 (2): 179-187.
7. Brusius-Facchin AC, Schwartz IV, Zimmer C, et al. Mucopolysaccharidosis type II: identification of 30 novel mutations among Latin American patients. *Mol Genet Metab* 2014; 111 (2): 133-138.

8. Brusius-Facchin AC, De Souza CF, Schwartz IV, et al. Severe phenotype in MPS II patients associated with a large deletion including contiguous genes. *Am J Med Genet A* 2012; 158A (5): 1055-1059.
9. Timms KM, Bondeson ML, Ansari-Lari MA, et al. Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6 (3): 479-486.
10. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr* 2008; 167 (3): 267-277.
11. Chang JH, Lin SP, Lin SC, et al. Expression studies of mutations underlying Taiwanese Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II). *Hum Genet* 2005; 116 (3): 160-166.
12. Bermúdez-López C, García-de Teresa B, González-del Angel A, Alcántara-Ortigoza MA. Germinal mosaicism in a sample of families with Duchenne/Becker muscular dystrophy with partial deletions in the DMD gene. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014; 18 (2): 93-97.
13. 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 (1): 21-27.
14. Rathmann M, Bunge S, Beck M, Kresse H, Tylki-Szymanska A, Gal A. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): mutation "hot spots" in the iduronate-2-sulfatase gene. *Am J Hum Genet* 1996; 59 (6): 1202-1209.
15. Zhang H, Li J, Zhang X, et al. Analysis of the IDS gene in 38 patients with Hunter syndrome: the c.879G>A (p.Gln293Gln) synonymous variation in a female create exonic splicing. *PLoS One* 2011; 6 (8): e22951.

16. Sohn YB, Ki CS, Kim CH, et al. Identification of 11 novel mutations in 49 Korean patients with mucopolysaccharidosis type II. *Clin Genet* 2012; 81 (2): 185-190.
17. Ricci V, Regis S, Di Duca M, Filocamo M. An Alu-mediated rearrangement as cause of exon skipping in Hunter disease. *Hum Genet* 2003; 112 (4): 419-425.
18. Kim CH, Hwang HZ, Song SM, et al. Mutational spectrum of the iduronate 2 sulfatase gene in 25 unrelated Korean Hunter syndrome patients: identification of 13 novel mutations. *Hum Mutat* 2003; 21 (4): 449-450.
19. Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, et al. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat* 1993; 2 (6): 435-442.
20. Burruss DM, Wood TC, Espinoza L, Dwivedi A, Holden KR. Severe Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis II) phenotype secondary to large deletion in the X chromosome encompassing IDS, FMR1, and AFF2 (FMR2). *J Child Neurol* 2012; 27 (6): 786-90.
21. Zanetti A, Tomanin R, Rampazzo A, et al. A Hunter Patient with a Severe Phenotype Reveals Two Large Deletions and Two Duplications Extending 1.2 Mb Distally to IDS Locus. *JIMD Rep* 2014; 17: 13-21.
22. Honda S, Hayashi S, Kato M, et al. Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with non-mutational aberrations of the FMR2 gene. *Am J Med Genet A* 2007; 143A (7): 687-693.
23. Coffee B, Ikeda M, Budimirovic DB, Hjelm LN, Kaufmann WE, Warren ST. Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular

misdiagnosis: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2008; 146A (10): 1358-1367.

24. Baldo G, Matte U, Artigalas O, et al. Placenta analysis of prenatally diagnosed patients reveals early GAG storage in mucopolysaccharidoses II and VI. *Mol Genet Metab* 2011; 103 (2): 197-198.

25. Uz B, Demiroglu H, Ozcebe OI. Hunter syndrome and new onset idiopathic thrombocytopenic purpura in a young patient. *Ann Hematol* 2012; 91 (2): 303-304.

26. Giugliani R, Hwu WL, Tylki-Szymanska A, Whiteman DA, Pano A. A multicenter, open-label study evaluating safety and clinical outcomes in children (1.4-7.5 years) with Hunter syndrome receiving idursulfase enzyme replacement therapy. *Genet Med* 2014; 16 (6): 435-441.

27. Doğan M, Cesur Y, Peker E, Oner AF, Dogan SZ. Thrombocytopenia associated with galsulfase treatment. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30 (7): 768-771.

TABLA 1. Datos clínicos, familiares y genotipo *IDS* en 25 pacientes Mexicanos no relacionados con MPS II.

	Paciente/ edad a la referencia	Ensayo I2S	HGMD o Ref.	Compromiso neurológico	Historia familiar	Estado de portadora en la madre	Comentarios
<b>Mutaciones de sentido erróneo y sin sentido. (n=8, 32%)</b>							
<b>c.133G&gt;C (p.Asp45His) Exón 2</b>	IDS9 / 12 años de edad	ND	Este estudio.	Discapacidad intelectual y crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (secuenciación del exón 2 y restricción con enzima <i>MwoI</i> ).	Variante ausente en 133 alelos <i>IDS</i> normales (restricción con enzima <i>MwoI</i> ). Polyphen/SIFT predicción <i>in silico</i> : Probablemente patogénica (HumDiv score 1.0)
c.223C>T (p.Gln75*) Exón 2	IDS47 / 2 años de edad	POS	CM056339	Retraso psicomotor leve. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (secuenciación del exón 2)	Una hermana no portadora.
c.253G>A (p.Ala85Thr) Exón 3	IDS39 / ND	ND	CM960855	Desconocido.	Desco- nocado	Portadora obligada (ensayo de restricción con <i>HhaI</i> , exon 3)	Dos tías femeninas analizadas (portadora y no portadora respectivamente)
c.262C>T (p.Arg88Cys) <sup>a</sup> Exón 3	IDS62 / 9 años de edad	POS	CM960857	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	No portadora. (secuenciación del exón 3)	
<b>c.1003C&gt;T (p.His335Tyr) Exón 7</b>	IDS1 / 12 años de edad	POS	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (secuenciación del exón 7)	Variante ausente en 133 alelos <i>IDS</i> normales (restricción con enzima <i>MwoI</i> ). Diagnóstico prenatal: 2 fetos masculinos afectados. Polyphen/SIFT predicción <i>in silico</i> : Probablemente patogénica (HumDiv score 0.999)
<b>c.1025A&gt;C (p.His342Pro) Exón 8</b>	IDS22 / 8 años de edad	ND	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Presente	Portadora obligada (confirmatorio). (secuenciación del exón 8)	Variante ausente en 133 alelos <i>IDS</i> normales (secuenciación automatizada). Polyphen/SIFT predicción <i>in silico</i> : Probablemente patogénica (score 1.0)
c.1265G>A (p.Cys422Tyr) Exón 9	IDS45 / 8 años de edad	POS	CM983874	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas.	Presente	Portadora obligada (confirmatorio). (secuenciación del exón 9)	Genotipo mutado identificado en 1 tío varón afectado, una madre portadora obligada, abuela y 2 tías mujeres. Genotipo mutado excluido en una tía y su hija.
c.1403G>A (p.Arg468Gln) <sup>b</sup> Exón 9	IDS71 / 6 años de edad	POS	CM930422	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas.	Ausente	Portadora obligada (secuenciación del exón 9)	

**Mutaciones pequeñas de  
corrimiento de marco de lectura**

**(n=5, 20%)**

<b>c.463_464delinsCCA GCTATACGG (p.Phe155Profs*12)<sup>b</sup> Exón 4</b>	IDS31 / 7 años de edad	POS	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada debido a mosaicismo germinal (secuenciación del exón 4 y restricción con <i>Avall</i> ).	Mutación ausente en DNA de sangre periférica y mucosa oral de la madre del caso índice, se identificó estado de heterocigotas en dos hermanas. (Figura 2). Maternidad confirmada por perfil de DNA (datos no mostrados).
c.596_599del (p.Lys199Argfs*13) Exón 5	IDS24 / 16 años de edad	POS	CD941708	Discapacidad intelectual con crisis convulsivas.	Ausente	No portadora. (secuenciación del exón 5)	
<b>c.754_767del (p.Asp252*) Exón 6</b>	IDS37 / 10 años de edad	ND	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	No portadora. (restricción con <i>Mbol</i> , exón 6)	
<b>c.1132_1133del (p.Phe378Profs*7) Exón 8</b>	IDS43 / 8 años de edad	ND	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Presente	Portadora obligada (confirmatorio). (restricción con <i>XmnI</i> , exón 8)	
<b>c.1463del (p.Met488Argfs*8) Exón 9</b>	IDS64 / 8 años de edad	POS	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (secuenciación del exón 9)	Una hermana portadora.

**Mutaciones de splicing (n=2, 8%)**

<b>c.508-1G&gt;C</b> Sitio aceptor intrón 4	IDS13 / 9 años de edad	POS	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (secuenciación intrón 4-exón 5)	
<b>c.1006+1G&gt;T<sup>b</sup></b> Sitio donador intrón 7	IDS51 / 7 años de edad	POS	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (secuenciación intrón 7-exón 7)	

**Deleciones parciales o completas**

**(c.(?\_-199)\_(\*3979\_?)del)**

**(n=5,20%)**

c.(-217_103del) Delección Exón 1 <sup>c</sup>	IDS78 / 8 años de edad	POS	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Presente	No disponible.	
Delección completa <i>IDS/IDSP1</i> (157 kb). <sup>d</sup> arr Xq28(148,467,083- 148,624,248)x0 mat <i>AFF2</i> y <i>FMR1</i> presentes	IDS28 / 7 años de edad	ND	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas.	Ausente	Portadora obligada (dosis génica <i>IDS</i> ) <sup>e</sup>	Una hermana portadora y una hermana no portadora.
Delección completa <i>IDS/IDSP1</i> (562 kb). <sup>d</sup> arr Xq28(148,176,414- 148,738,845)x0 mat <i>AFF2</i> y <i>FMR1</i> presentes	IDS58, 2 años de edad	POS	Este estudio.	Retraso psicomotor. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (dosis génica <i>IDS</i> ) <sup>e</sup>	
Delección completa <i>IDS/IDSP1</i> (1.39 Mb). <sup>d</sup> arr Xq28(147,340,291- 148,731,894)x0 <i>AFF2</i> deletado. <i>FMR1</i> presente.	IDS76 / 10 años de edad	POS	Este estudio.	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (dosis génica <i>IDS</i> ) <sup>e</sup>	
Delección completa <i>IDS/IDSP1</i> (1.83 Mb). <sup>d</sup> arrXq28(147,392,284- 149,225,394)x0. <i>AFF2</i> deletado. <i>FMR1</i> presente.	IDS7 / 2 años de edad	POS	Este estudio.	Retraso psicomotor / Discapacidad intelectual (6 años), Hidrocefalia hipertensiva y crisis convulsivas (4 años 5 meses).	Ausente	Portadora obligada (dosis génica <i>IDS</i> ) <sup>e</sup>	Pérdida de funciones locomotoras, visuales y auditivas. Una Hermana no portadora.

**Inversion IDS-IDSP1**  
**(c.(?\_-199)\_1006+?inv)**  
**(n= 3, 12%)**

IDS3 / 9 años de edad	POS	5	Discapacidad intelectual con crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Ausente	Portadora obligada (ensayo de restricción PCR-RFLP <i>Hinfl</i> ).	Una Hermana no portadora.
IDS33 / 12 años de edad	ND	5	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Presente	Portadora obligada (confirmatorio). (ensayo de restricción PCR-RFLP <i>Hinfl</i> ).	Dos hermanos gemelos afectados, gemelos finados. Desarrollaron PTI y pancitopenia respectivamente posterior a la suspensión de la TRE.
IDS60 / 4 años de edad	POS	5	Retraso psicomotor. No crisis convulsivas.	Ausente	Portadora obligada (ensayo de restricción PCR-RFLP <i>Hinfl</i> ).	

**Otros rearrreglos complejos**

(n=1, 4%)

Alelo quimérico <i>IDS-IDSP1</i> c.(419-?)_(1006+?)delinsNC_00023.11	IDS11 / 6 años de edad	POS	2	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Presente	Portadora obligada (confirmatorio). (ensayo de restricción PCR-RFLP <i>HinfI</i> y dosis génica) <sup>e</sup>	Diagnóstico prenatal que identificó dos fetos masculinos afectados en un embarazo gemelar.
<b>Unknown (n=1, 4%)</b>							
r.1007_1180del (p.Trp337_Gly394del) Salto del Exón 8 (c.?)	IDS5 / 4 años de edad	POS	17 <sup>f</sup>	Discapacidad intelectual. No crisis convulsivas. No hidrocefalia.	Presente	Portadora obligada (confirmatorio). Análisis del mRNA de <i>IDS</i> (RT-PCR y secuenciación)	Mutación desconocida a nivel de DNA genómico. (patrón de restricción normal con <i>HinfI</i> y secuenciación de los 9 exones con sus bordes intrónicos).

Las variants nuevas se encuentran en negritas y la nomenclatura escrita acorde a *\_011900.3 RefSeqGene and NM\_000202.6*.

Estudio molecular previo realizado por el <sup>a</sup>Dr. Adreas Gahl, Institute for Human Genetics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany o a través de <sup>b</sup>CENTOGENE GmBh, Rostock, Germany. Todos ellos fueron confirmados mediante secuenciación automatizada.

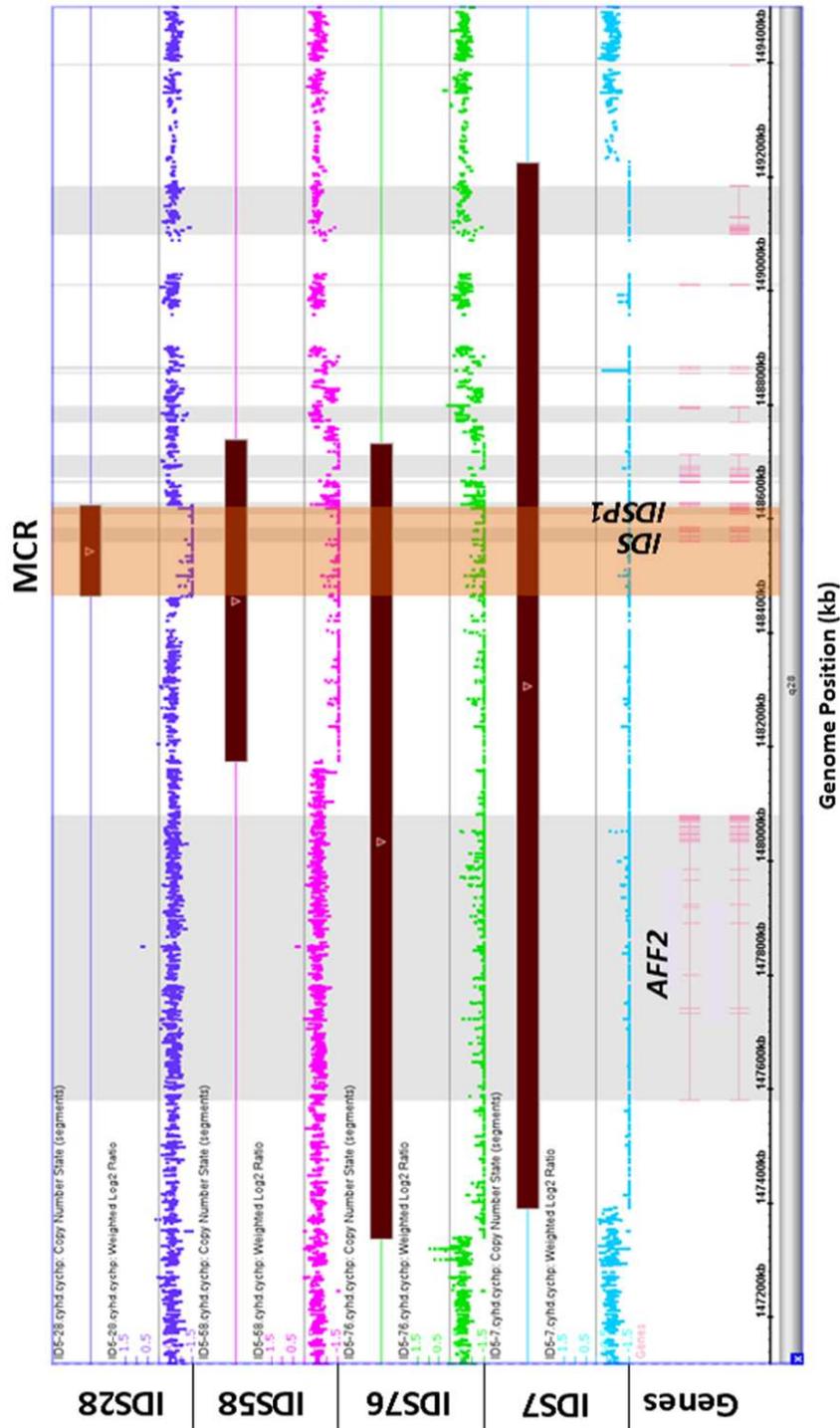
<sup>c</sup> Ausencia de producto identificado mediante PCR en al menos dos ensayos de PCR independientes. Los puntos de ruptura precisos no fueron secuenciados.

<sup>d</sup> Las deleciones grandes fueron definidas por ausencia en la amplificación del locus *IDSP1* en el ensayo PCR-RFLP *HinfI*, así como en los 9 exones del gen *IDS* y/o region 5'UTR GCC del gen *AFF2* y corroborada y delineada por microarreglos de CNV/SNP (CytoScanTM HD Array, Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA)

<sup>e</sup> A través de ensayo de PCR semicuantitativo para determinar la dosis génica de los exones 4 y 8; el exón 3 del gen *DMD* se utilizó como control interno no deletado (12).

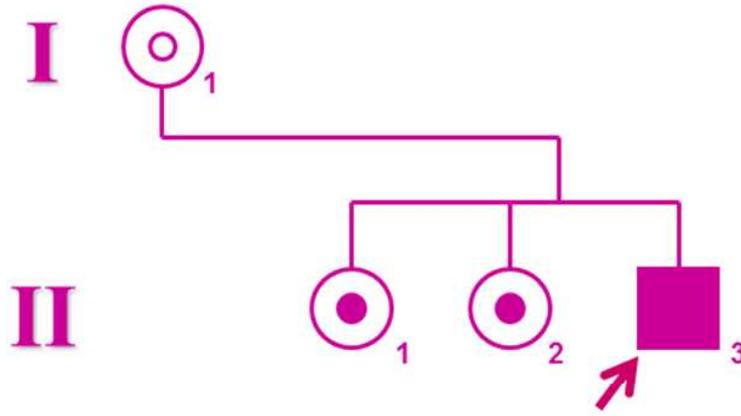
<sup>f</sup> El mismo salto del exon 8 del gen *IDS*, identificado mediante RT-PCR fue descrito en una paciente Italiano con MPS II con una deleción de 3kb en el intron 7 mediada por secuencias *Alu*. Sin embargo un análisis detallado del intron 7 en el paciente IDS5 aún no se ha realizado.

**Abreviaturas:** TRE: Terapia de reemplazo enzimático. PTI: Púrpura Trombocitopénica Idiopática. ND: No disponible. POS: evaluación de Iduronato-2-sulfatasa (I2S) para diagnóstico de Síndrome de Hunter. RT-PCR: transcripción-reversa del mRNA seguido de reacción en cadena de la polimerasa.



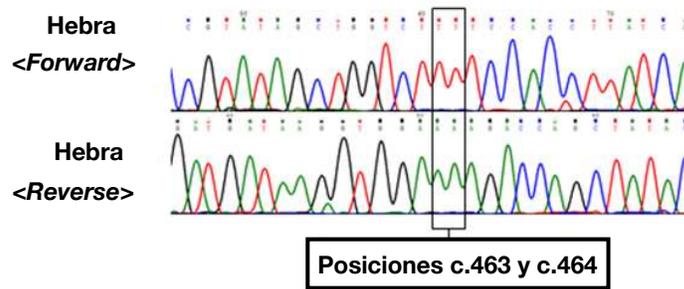
**Figura 1. Representación de las deleciones en Xq28 identificadas en los cuatro pacientes estudiados mediante análisis de microarreglos Affimetrix CytoScan™ de alta densidad.** Los puntos representan la intensidad ponderada de señales de los pacientes comparada con DNA control expresada en proporción  $\log_2$  en escala de -1.5 a 1.5 (eje - Y). Las barras indican las deleciones encontradas en la región Xq28 e igual a cero copias. Las líneas segmentadas horizontales muestran los genes presentes en la región Xq28. El eje - X muestra el ideograma del cromosoma X con las posiciones genómicas (hg19) expresadas en kilobases (kb). Los rectángulos sombreados verticales indican la región mínima común (MCR) entre los cuatro pacientes.

Descripción de coordenadas : Paciente: **IDS28**: deleción completa *IDS/IDSP1* ( 157 kb ) . *AFF2* y *FMR1* se conservan. arr Xq28 ( 148,467,083-148,624,248 )x0 mat. **Paciente IDS58**: deleción completa *IDS/IDSP1* ( 562 kb ) . *AFF2* y *FMR1* se conservan. arr Xq28 ( 148,176,414-148,738,845 ) x0 mat. **Paciente IDS76**: deleción completa *IDS/IDSP1* ( 1,39 Mb ) . Deleción de *AFF2* . *FMR1* se conserva. arr Xq28 ( 147,340,291- 148731894 ) x0 . **Paciente IDS7**: Deleción completa ( 1.83 Mb ) . Deleción de *AFF2* . *FMR1* se conserva. arr Xq28 ( 147,392,284-149,225,394 ) x0 .

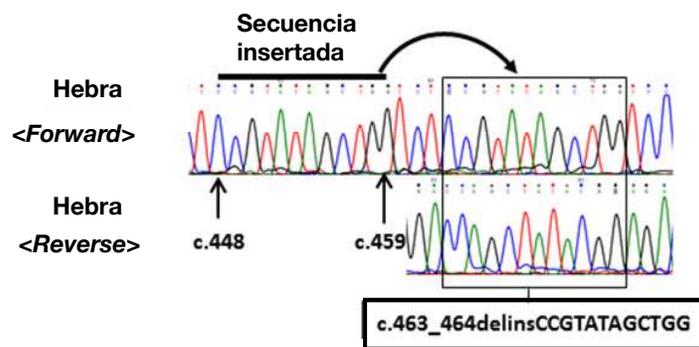



**Portadora obligada debido a mosaïcismo germinal/somático**

**CTL: genotipo *IDS* hemicigoto normal (exon 4)**

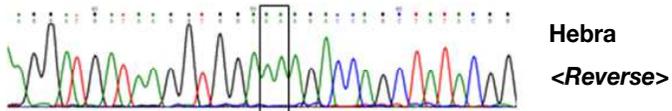


**Paciente II-3 (*IDS*31): genotipo *IDS* hemicigoto c.463\_464delinsCCGTATAGCTGG**



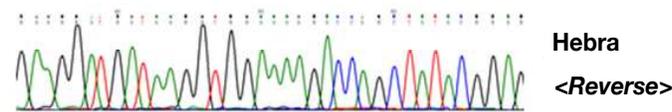
I-1  
Muestras  
de DNA  
Genómico

Leucocitos de sangre periférica:  
Genotipo *IDS* homocigoto normal

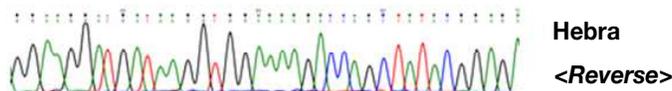


Posiciones c.463 y c.464

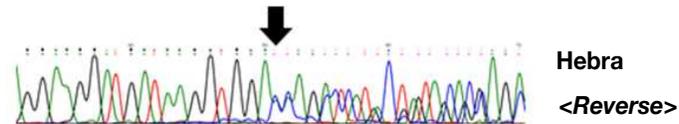
Células de mucosa oral: Genotipo *IDS* homocigoto normal



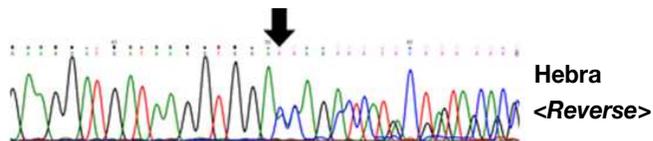
Raíces de pelo: Genotipo *IDS* homocigoto normal



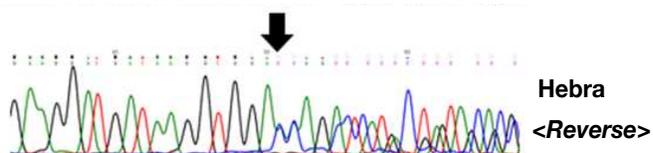
Sedimento Urinario: Portadora de MPSII con genotipo *IDS*  
c.[463\_464delinsCCGTATAGCTGG];[=]



II-1: Portadora de MPSII con genotipo *IDS*  
c.[463\_464delinsCCGTATAGCTGG];[=]



II-2: Portadora de MPSII con genotipo *IDS*  
c.[463\_464delinsCCGTATAGCTGG];[=]



**Figura 2. Electroferogramas parciales del exón 4 de *IDS* en familiares del paciente IDS31 (II- 3 ) y un control masculino sano (CTL) para la identificación de la variante novel c.463\_464delinsCCGTATAGCTGG o p. (Phe155Profs \* 12).** En II- 3 la secuencia insertada es idéntica a la de las posiciones c.448 - c.459. Se analizaron las hebras <Reverse> (inversas) para facilitar la lectura debido a la presencia de un tracto homopolimérico de timinas en el extremo 3 'del intrón 3. II- 1 y II- 2 fueron portadores heterocigóticos para c.463\_464delinsCCGTATAGCTGG ( las flechas indican el punto de inicio del indel). Inesperadamente, el alelo mutado era indetectable en tres ( leucocitos de sangre periférica , células bucales y las raíces del pelo ) de cuatro muestras de DNA genómico que fueron derivados de diferentes tejidos somáticos a partir de I-1. Además, se confirmó I- 1 como la madre de los tres hermanos por perfiles de DNA con los 13 marcadores STR CODIS (datos no mostrados). Por lo tanto, se asume que la variante indel patogénica está presente tanto en células somáticas ( del tracto urinario) como en células germinales de I- 1.