



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

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

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA:

DRA. MARIANA MAZA MORALES

TUTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA

CO-TUTOR:

DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ANGEL



CIUDAD DE MÉXICO.

2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



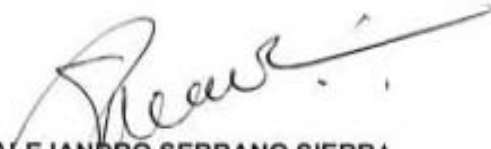
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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 PREDOMINANCIA DE
REARREGLOS COMPLEJOS DEL GEN IDS EN UNA MUESTRA DE
PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE HUNTER"**



DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA




DR. JOSE N. REYNES MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



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



TUTOR DE TESIS:
DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA



CO-TUTOR DE TESIS:
DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	4
II.	ANTECEDENTES.....	5
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
IV.	JUSTIFICACIÓN	12
V.	OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	13
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
VII.	RESULTADOS.....	17
VIII.	DISCUSIÓN.....	19
IX.	CONCLUSIÓN.....	24
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	25
XI.	ANEXOS.....	28

I. RESUMEN

El síndrome de Hunter o mucopolisacaridosis tipo II (MPSII) es causada por variantes patogénicas del gen *IDS*. Este es el primer estudio que examina el espectro mutaciones en 25 familias Mexicanas no relacionadas.

El genotipo responsable se identificó en el 96% de las familias (24/25) con diez nuevas variantes patogénicas reportadas: c.133G>C, c.1003C>T, c.1025A>C, c.463_464delinsCCGTATAGCTGG, c.754_767del, c.1132_1133del, c.1463del, c.508-1G>C, c.1006+1G>T and c. (-217_103del).

Deleciones extensas del gen *IDS* fueron identificadas en cuatro de los pacientes; por medio de análisis de microarreglos de alta densidad, dos de ellos mostraron perdida completa del gen *AFF2*. El desarrollo de epilepsia, sin embargo, fue notado en sólo uno de ellos.

Se demostró una gran heterogeneidad alélica, con rearrreglos génicos complejos (ej. Inversiones del gen *IDS/IDSP1*, deleciones parciales extensas del gen *IDS*, y un alelo quimérico *IDS-IDSP1*) que ocurrieron en más alta frecuencia que lo previamente reportado en otras series (36% vs. 18.9-29%).

La frecuencia de madres portadoras (80%) fue consistente con las descripciones previas (>70%). El estado de portadora permitió realizar diagnóstico molecular prenatal. Notablemente, una familia resultó con mosaicismo somático y germinal. Dos pacientes presentaron púrpura trombocitopenica idiopática después del tratamiento con terapia de reemplazo enzimático con idursulfasa, situación que al menos ha sido descrita en literatura en un paciente de origen caucásico.

Los hallazgos sugieren que existe una amplia heterogeneidad alélica en los pacientes Mexicanos con MPSII y que el estudio por microarreglos contribuye a la delineación del fenotipo resultante para deleciones de *IDS* y deleciones extensas que involucran el gen *IDS* y *loci* aledaños.

II. ANTECEDENTES:

Definición y fisiopatología.

Las mucopolisacaridosis (MPS) son errores innatos del metabolismo secundarios a defectos enzimáticos que producen un acúmulo lisosomal de diversos tipos de glucosaminoglucanos (GAG), que son macromoléculas que proporcionan soporte a la matriz extracelular y son parte importante de los procesos de regulación y comunicación celular. Este acúmulo provoca consecuentemente síntomas progresivos en todos los órganos y sistemas, por lo que se tratan de enfermedades multisistémicas que requieren un tratamiento multidisciplinario (1,2).

El Síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis tipo II (MPSII, OMIM #309900), fue identificado por primera vez por John Thomson en Edinburgo en 1908; sin embargo, los primeros casos publicados de MPS fueron en 1917 por Charles Hunter quien describió la enfermedad en dos hermanos; pero fue solo hasta 1952 que Brante aisló las primeras muestras de MPS en dos pacientes con síndrome de Hunter, y para 1970 se aislaron el dermatán y heparán sulfato (1).

La MPS II, se hereda de forma recesiva ligada al cromosoma X por mutaciones que alteran la función del gen *IDS*, las cuales, conllevan a una deficiencia de la actividad de la Iduronato 2-sulfatasa (I2S); enzima involucrada en el primer paso metabólico del catabolismo de los glicosaminoglucanos (GAGs) dermatán sulfato y heparán sulfato (3).

Esta falla de la I2S en la hidrolización de los ésteres de dermatán sulfato y heparán sulfato resulta en una acumulación progresiva de estos sustratos no degradados en los lisosomas, lo que ocasiona disfunción multiorgánica (3,4) con la aparición de síntomas y complicaciones severas a edades tempranas.

Epidemiología.

La MPSII, tiene una incidencia global estimada de 1.3 por 100,000 recién nacidos masculinos (5). En general los individuos afectados son hombres y las mujeres pueden ser portadoras asintomáticas de la enfermedad, que aunque presentan niveles enzimáticos bajos éstos, son suficientes para no presentar síntomas clínicos. Sin embargo, a la fecha hay la descripción de menos de 15 pacientes femeninos con una presentación clínica de MPSII atribuible a inactivación sesgada del cromosoma X o aberraciones cromosómicas que involucran al locus Xq28. Por ejemplo, en el estudio realizado por *Piña-Aguilar et al.* se describe a una paciente Mexicana con el diagnóstico de MPSII, en quien se documentó un genotipo heterocigoto para una variante patogénica en el gen *IDS* acompañada de un patrón de inactivación sesgado (6).

Clasificación.

En la actualidad se considera la existencia de un espectro entre fenotipos graves y atenuados que dependen del involucro del sistema nervioso central; (7) aunque pacientes catalogados con fenotipos MPSII atenuados presentan, de cualquier forma, síntomas y complicaciones que incrementan la discapacidad y la mortalidad en comparación de los individuos sanos (5,7).

Manifestaciones clínicas.

Las características clínicas de la MPS II no son evidentes al nacimiento, pero éstas ocurren aproximadamente a la edad de 2 a 4 años. En individuos con formas atenuadas de la enfermedad, el diagnóstico se realiza aproximadamente entre los 4 y 8 años de edad. La supervivencia de éstos pacientes a edad adulta es de aproximadamente 20 a 30 años de vida. En los pacientes con presentación más severa, las características clínicas pueden no ser tan evidentes de manera inicial; algunos de ellos presentan hernia inguinal o umbilical, manchas mongólicas de mayor extensión, además de presentar con mayor frecuencia infecciones de vía aérea de repetición. La edad al diagnóstico de estos pacientes es en promedio de 18 a 36 meses (1, 2,7).

Durante el periodo de lactancia y la infancia se pueden presentar las siguientes manifestaciones clínicas:

Las características fenotípicas son muy similares a las de otras Mucopolisacaridosis: facies tosca, macrocefalia con frente prominente, nariz ancha, orejas de implantación baja, labios gruesos y macroglosia. Estos rasgos comienzan a ser evidentes entre los 18 y 24 meses de edad en formas graves de la enfermedad (5,6).

Sistema músculo-esquelético: Varían desde afección directa al hueso hasta artropatía severa, lo que ocasiona una restricción importante en el movimiento y función (5). Los pacientes presentan 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. El ejercicio y rehabilitación temprana y preventiva son claves importantes en la preservación de la función articular. (8)

Las alteraciones radiológicas esqueléticas son típicas de una disostosis múltiple y, aunque su gravedad varía con los tipos, suelen ser lo bastante específicas como

para realizar el diagnóstico preciso. No obstante, estas manifestaciones radiológicas cambian considerablemente durante la infancia. En un estudio realizado por *Lai LM et. al.*, se encontró que dentro de las anomalías radiológicas más frecuentes en estos pacientes se encuentran: aumento en el tamaño de los cuerpos vertebrales (80%), punteado talo calcáneo (86%), adelgazamiento del periostio (74%), cuerpos vertebrales redondeados (50%). Otro hallazgo reportado fue la esclerosis de cuerpos vertebrales (13%) (9).

Sistema cardiovascular: Engrosamiento de las válvulas cardíacas, lo que ocasiona regurgitación o estenosis de las válvula mitral y aórtica más frecuentemente. La cardiomiopatía es mucho menos común pero se asocia a un alto riesgo de arritmias. En un estudio realizado durante un período de 12 años por *Lin SM et al*, se encontró que las cardiopatías más frecuentes son: Hipertrofia del septum interventricular 55%, hipertrofia asimétrica septal 42% y prolapso mitral 33%. Todas estas manifestaciones se acompañaron de una disfunción diastólica progresiva (10).

Sistema respiratorio: Rinitis crónica recurrente sin presencia de infección, hipertrofia amigdalina y adenoidea, traqueomalacia, macroglosia y tejido redundante en la vía aérea superior, ocasionan síntomas obstructivos de la vía aérea; como la apnea obstructiva del sueño, que es una complicación frecuente en etapas tardías de la enfermedad (5). Los episodios de hipoxia suelen manejarse con oxígeno a presión positiva. La adenoamigdalectomía se realiza frecuentemente para corregir la disfunción de la tuba faringotimpánica y para mejorar la función respiratoria. La colocación temprana de tubos de ventilación se recomienda en individuos severamente afectados (7, 8).

Sistema gastrointestinal: Los pacientes presentan abdomen protuberante y hernias secundarias al crecimiento progresivo del hígado y bazo. A pesar de este almacenamiento masivo de glucosaminoglicanos en hígado y bazo no ocurre alteración en cuanto a función. Estos pacientes de igual manera presentan episodios de diarrea y posteriormente estreñimiento secundario una pérdida de la fuerza de la musculatura e inactividad física (7).

Sistema nervioso periférico: Compresión nerviosa, síndrome del túnel carpiano.

Oftalmológicos: Opacidad corneal, glaucoma, degeneración retiniana, con la consecuente disminución de la agudeza visual y poca adaptación a la obscuridad. Adicionalmente presentan alteraciones en la electroretinografía. El papiledema crónico sin evidencia de aumento de la presión intracraneal puede ser resultado del depósito de glucosaminoglicanos en la esclera (8).

Audiológicos: En un estudio realizado por *Vargas- Gammara et al*, se estudió a 23 pacientes con el diagnóstico de mucopolisacaridosis y encontraron que el 71.2% de los pacientes presentaron cuadros de repetición de otitis media secretora y el 54% de los pacientes presentan algún grado de pérdida auditiva. Dentro de otras

causas que conllevan a una pérdida auditiva se encuentran: Disfunción de la tuba faringotimpánica, disostosis de los huesecillos del oído medio, cicatrización de la membrana timpánica y daño nervioso (11).

Sistema nervioso central: Retraso psicomotor secundario a la acumulación de glucosaminoglicanos en el sistema nervioso central (5). Las convulsiones son comunes, 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 e hiperplasia del ligamento transverso, es común. La resonancia magnética de unión cráneo-cervical muestra depósito de glucosaminoglucanos alrededor del proceso odontoides. Sin tratamiento, la mielopatía puede ser irreversible, debe tratarse de forma temprana con cirugía descompresiva (8).

Piel: Es gruesa y poco elástica, suelen encontrarse pápulas hipocrómicas entre 2 y 10 mm, primariamente en escápulas y posteriormente se diseminan a tronco y miembros torácicos, las cuales se consideran muy características de la entidad (8).

En los casos graves de la enfermedad la muerte ocurre en la primera o segunda década de la vida, habitualmente a causa de enfermedad respiratoria obstructiva o fallo cardíaco asociada a falla valvular. En las formas más atenuadas los signos y síntomas clínicos aparecen más tardíamente siendo la disfunción neurológica mínima. Estos pacientes tienen una inteligencia normal y pueden sobrevivir hasta etapas tempranas de la edad adulta (6).

Diagnóstico.

Ante la sospecha clínica, el primer estudio que se debe de solicitar es una determinación de glucosaminoglicanos en orina. Usualmente se utiliza como tamizaje en pacientes con la sospecha diagnóstica, se puede realizar de manera cuantitativa y cualitativa (electroforesis); un resultado anormal sugiere la presencia de mucopolisacaridosis. Si se encuentran niveles normales se puede descartar el diagnóstico aunque en ocasiones es preciso realizar una determinación de glucosaminoglicanos en orina de 24 horas. La sensibilidad de la prueba no es del 100%. La presencia de dermatán y heparán sulfato elevados no hace el diagnóstico definitivo.

Posterior a dicho estudio, se debe de realizar la determinación de la actividad enzimática de la I2S. Esta determinación se suele realizar en gotas de sangre seca total depositada en papel filtro, leucocitos aislados o fibroblastos. La deficiencia de la actividad es diagnóstica en varones, sin embargo no define la severidad de la enfermedad. La actividad enzimática no permite identificar mujeres portadoras con certeza absoluta.

Una actividad enzimática <10% es muy sugestiva de Mucopolisacaridosis y una actividad <1% - 2% es diagnóstica de la misma. Una vez que se confirma la actividad enzimática, es conveniente realizar el diagnóstico genético-molecular con la finalidad de corroborar diagnóstico, predecir el fenotipo resultante, identificar de manera certera a familiares femeninos portadores emparentados al caso índice (madre, hermanas, tías, sobrinas, etc.) y, eventualmente, para ofrecer diagnóstico prenatal molecular en ellas. Se considera que el porcentaje de mutaciones *de novo* es de aproximadamente 10-33% (5,15).

Si bien, el diagnóstico prenatal se puede realizar mediante la determinación de la actividad enzimática en el cultivo de células del líquido amniótico o en las muestras de biopsias de vellosidades coriales (BVC), es un método más laborioso y que requiere de mayor tiempo (2-3 semanas) para lograr un resultado (12).

Gen IDS

El gen *IDS* se localiza en el brazo largo del cromosoma X, y se organiza en 9 exones codificantes distribuidos en 24 kb de la región Xq28. El gen codifica la principal isoforma de "a" la pre-proteína de la I2S "a" de 550' aminoácidos (73–78kDa).

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.

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".

Telomérico al gen *IDS*, (20 kb), se encuentra un pseudogen homólogo (*IDSP1*, 1.4kb) que contiene secuencias homólogas del gen *IDS* de los exones 2 y 3, del intrón 2 además de un fragmento quimérico derivado del intron 3-7 que se encuentra en orientación invertida. Este último es considerado un 'hot spot' para

recombinaciones homólogas no alélicas entre el loci, que conlleva a deleciones del gen *IDS* y rearrreglos e inversiones del *IDS/IDSP1*.

Aproximadamente 10-20% de los pacientes con MPSII, presentan rearrreglos complejos del gen *IDS*, que incluyen inversiones *IDS/IDSP1* y deleciones totales del gen *IDS* (6-8%) (2), mientras que el 80-90% de los pacientes presentan mutaciones de tipo puntual o microinserciones, microdeleciones/duplicaciones o microindels.

De acuerdo a la base de datos del *Human Gene Mutation*, a la fecha se han descrito 479 mutaciones diferentes del gen *IDS*, la mayoría de ellas corresponden a mutaciones puntuales (52%) o microdeleciones (17%) (4).

En un estudio realizado en pacientes Latinoamericanos por *AC. Brusuis-Facchin et al. 2014*, se encontró un mayor número de pequeñas duplicaciones /inserciones en comparación con microdeleciones (7 % vs 3.5%) pero otros estudios han revelado una proporción inversa (1.5 % vs 10%) (3,4).

En pacientes con fenotipo severo de MPSII se han descrito deleciones completas de los genes *IDS*, *FRAXA* y *FRAXE*; estos dos últimos corresponden a genes contiguos, los cuales son los genes que se ven involucrados en pacientes con Síndrome de X frágil y una forma no sindrómica de discapacidad intelectual respectivamente. Por lo anterior se cree que la afección de estos genes contiguos podría relacionarse con un mayor grado de discapacidad intelectual en los pacientes con MPSII portadores de estos genotipos severos (13), los cuales pueden ser delimitados de forma precisa mediante el estudio cromosómico por microarreglos de alta densidad (CMA) (12).

El diagnóstico molecular confirma la sospecha diagnóstica de MPSII, particularmente en pacientes con fenotipos atípicos o menos severos y es el estándar de referencia para la detección del estado de portadora y el diagnóstico prenatal. La identificación de mutaciones en >80% de los casos se realiza mediante secuenciación automatizada de los 9 exones del gen *IDS*, seguida de estudios como el Southern blot o ensayos basados en PCR para determinar la inversión génica entre *IDS* e *IDSP1* o el análisis del transcrito por RT-PCR y secuenciación.

La amplia heterogeneidad alélica del gen *IDS*, ha dificultado el encontrar más de un paciente con la misma mutación; lo anterior, aunado al hecho de que no existen lineamientos claros para definir a las formas severas de las atenuadas y a que existen pocos pacientes reportados con seguimiento clínico y genotipo documentado, se ha obstaculizado la correlación fenotipo-genotipo.

Tratamiento.

El tratamiento de la mucopolisacaridosis debe de ser global en cuanto a las diversas manifestaciones clínicas de los individuos afectados. El ejercicio físico y las distintas medidas fisioterapéuticas van dirigidos a mejorar las deformaciones óseas y articulares, mejorar la estabilidad vertebral y en general la movilidad del paciente. Los pacientes deben de llevar un seguimiento estrecho por distintos especialistas para evaluar e identificar problemas neurológicos, oftalmológicos, cardiológicos y respiratorios.

En cuanto al trasplante de progenitores hematopoyéticos, sólo se han comprobado resultados satisfactorios en los pacientes afectados con Mucopolisacaridosis tipo I, y en el caso de síndrome de Hunter, cuando se realiza antes del año de edad y sin afección neurológica del paciente. Estos tienen resultados satisfactorios aunque como ya se mencionó, la mayoría de los pacientes en edades tempranas las manifestaciones clínicas pueden pasar desapercibidas.

En cuanto al tratamiento, la forma recombinante de Iduronato 2- sulfatasa humana (Idursulfasa, Elaprasa®, SHIRE) está aprobada en más de 50 países como tratamiento de reemplazo enzimático en pacientes con MPSII (14). La dosis recomendada es de 0.5mg/kg/semana administrada vía intravenosa.

La instauración temprana (antes de los 5 años de edad) de la terapia de reemplazo enzimático, antes de que el paciente presente daños cardiovasculares, músculo- esqueléticos, articulares, entre otros, permite una mejoría en la movilidad articular, función pulmonar, tolerabilidad para actividad física, así como reducción del tamaño del hígado y bazo; pero no tiene impacto en el sistema nervioso central, dado que la enzima no atraviesa la barrera hemato-encefálica; por lo que actualmente se encuentran en desarrollo protocolos de administración de la idursulfasa por vía intratecal/intraventricular.

En un estudio multicéntrico (*Giugliani et al, 2014*) se reportaron como efectos adversos más frecuentes, fiebre, rash, y vómito, pero por otro lado se demostró su eficiencia en cuanto a la reducción clínica del 20% del valor basal del volumen del bazo, la disminución en la excreción urinaria de GAGs, y del volumen hepático (5).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuáles son los tipos y la frecuencia de mutaciones patogénicas en el gen *IDS* en una muestra de pacientes mexicanos referidos al Instituto Nacional de Pediatría con sospecha diagnóstica de MPSII o síndrome de Hunter?

IV. JUSTIFICACIÓN.

A pesar de que la clonación del gen *IDS* y la descripción de las primeras mutaciones patogénicas fueron en 1990 (16), a la fecha no se ha reportado el espectro mutacional del gen *IDS* en pacientes mexicanos con MPSII. Adicionalmente, en nuestro Instituto no se cuenta con la estandarización del ensayo enzimático de I2S para la confirmación del diagnóstico de MPSII y por ello, las muestras de los pacientes con sospecha diagnóstica de MPSII 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 MPSII 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 MPSII la terapia de reemplazo enzimático (ERT) con Idursulfasa, enzima recombinante humana de la I2S aprobada por la FDA o en su defecto, 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.

Lo anterior aunado a que el estudio molecular de acuerdo a la literatura, podría identificar de manera certera más del 90% de estos pacientes, pone de manifiesto la importancia de implementar el estudio molecular del gen *IDS* en pacientes con sospecha de MPSII. Adicionalmente, el estudio molecular en esta enfermedad se considera el estándar de referencia para el diagnóstico de mujeres portadoras de MPSII y para el diagnóstico prenatal en mujeres portadoras obligadas.

Finalmente, la implementación del diagnóstico certero por biología molecular de MPSII para conformar a nuestro grupo como un centro de referencia diagnóstica a nivel Nacional y posiblemente a nivel Latinoamericano.

V. OBJETIVOS.

a) *General:*

Caracterizar las mutaciones del gen *IDS* condicionantes de síndrome de Hunter o MPSII en una muestra de pacientes de origen Mexicano y Latinoamericano

b) *Específicos:*

1. Clasificar a los pacientes con diagnóstico confirmado de MPSII 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).
2. Caracterización de las mutaciones y polimorfismos en el gen *IDS*, así como su frecuencia en pacientes con diagnóstico confirmado de MPSII.
3. 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.

c) *Objetivos secundarios*

1. Correlacionar el cuadro clínico de MPSII (severo o atenuado) de acuerdo con el genotipo identificado en los pacientes.
2. Determinar si las mutaciones patogénicas encontradas en pacientes con MPSII son en su mayoría heredadas u originadas como eventos *de novo*.

VI. MATERIAL Y MÉTODO.

Población objetivo.

Pacientes masculinos con sospecha diagnóstica de MPSII basado en la presencia de fenotipo clínico compatible con mucopolisacaridosis y aumento en los niveles de glucosaminglucanos urinarios (GAG's). También se incluyeron a pacientes con todo lo anterior y niveles bajos de actividad enzimática de I2S documentada en gota de sangre seca, fibroblastos o leucocitos.

Población elegible.

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

Criterios de inclusión.

- Pacientes con diagnóstico clínico compatible con mucopolisacaridosis, 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) y con muestra disponible de DNA y RNA obtenidos a partir de leucocitos totales de sangre periférica.
- Pacientes con evaluación enzimática de I2S en leucocitos o fibroblastos sugestiva de I2S.
- 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 MPSII.
- 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.

Criterios de exclusión

- Padres o hermanos no biológicos de los casos índices.

- Temporalmente, pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses.

Ubicación del estudio.

El estudio molecular del paciente y sus familiares se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del INP. El presente protocolo se registró y aprobó por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de pediatría, bajo el número de registro 22/2010.

Metodología.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron evaluados por el servicio de Genética del Instituto Nacional de Pediatría (INP). El estudio molecular de las familias se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana del INP. A cada uno de los pacientes y sus familiares se les realizó historia clínica con árbol genealógico, determinación de GAG's urinarios.

La clasificación de los pacientes en los fenotipos de MPSII se realizó de acuerdo si presentan involucro del SNC como retraso mental (IQ <70 puntos), hidrocefalia comunicante o crisis convulsivas para los casos severos, y para las formas atenuadas, pacientes con un IQ >80 puntos y ausencia del resto de las manifestaciones neurológicas.

Se realizó la detección de la inversión génica por ensayo de PCR de DNA genómico y ensayo de restricción. En los pacientes positivos se dio por concluido el estudio molecular, y se realizó la búsqueda de la mutación en sus madres, hermanas y otros familiares femeninos con riesgo de ser portadoras del rearreglo.

En los pacientes negativos para el estudio anterior se realizó secuenciación automatizada directa de los 9 exones del gen *IDS* y sus bordes exón-intrón a partir de DNA genómico, para identificar deleciones de uno o más exones y deleciones completas.

Posteriormente se realizó análisis por RT-PCR y secuenciación automatizada del transcrito del gen *IDS* en cuatro fragmentos sobrelapados y los cuales incluyen la totalidad de la secuencia codificante.

El genotipo caracterizado en los alelos *IDS* de cada paciente, será comparado con el fenotipo observado. Se verificará la hipótesis de que los pacientes con el fenotipo más severo con compromiso neurológico importante presentan una mutación grave; En pacientes con fenotipos atenuados de MPSII, se verificará 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

correlacionarán con el efecto en la síntesis de proteína y a través de los programas BLAST con genes parálogos y ortólogos *IDS*.

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 (17), pero existen mutaciones amorfas descritas como condicionantes siempre de fenotipos graves (ej. la inversión génica, las deleciones completas del gen o las mutaciones puntuales como la p.R468Q, p.R468L o p.R468G) (18) y algunas que permiten la síntesis de una proteína con función residual (mutaciones hipomorfas) en ocasiones asociadas a un fenotipo “atenuado” de MPSII (ej. p.P231L) (19).

Al caracterizar una mutación no descrita en este tipo de pacientes y cuya evaluación *in silico* se clasifica como patogénica y se encuentra ausente en 100 controles masculinos sanos, se reportó como amorfa o grave. Se verificó en nuestra población si datos clínico atípicos descritos en formas severas de MPS II como crisis convulsivas y ptosis, se encuentran en pacientes con la deleción completa del gen.

Por otro lado, en pacientes con fenotipos atenuados de MPSII, se verificó si cursan con una mutación descrita como “leve”. Todas las mutaciones caracterizadas en los pacientes se correlacionaron con el efecto en la síntesis de proteína o en los dominios afectados 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.

Se brindó asesoramiento genético de certeza a las familias captadas de acuerdo a los genotipos observados o con riesgos empíricos. 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*. A las mujeres que resultaron portadoras de padecimiento, que tengan la mutación caracterizada y se encuentren en etapa reproductiva, se les brindó la opción de diagnóstico prenatal molecular a través de biopsia de vellosidades coriales (BVC) o amniocentesis.

VII. RESULTADOS

Se incluyeron un total de 25 pacientes masculinos mexicanos no relacionados (2-16 años de edad) con deficiencia de la actividad de I2S (n=14), con deficiencia de la actividad I2SB confirmada por genotipo (n=4), con sospecha clínica de MPSII (n=7), y a las madres de los pacientes (n=24) y otros parientes afectados masculinos y femeninos (n=16).

Se documentó en 7 de 24 pacientes antecedentes familiares de MPSII. Se clasificaron fenotípicamente como severos (n=20/25, 80%), moderados (n=3/25, 12%) y desconocido (n= 2/25, 8%) según el involucro neurológico.

Se realizaron tres diagnósticos de manera prenatal en dos madres no relacionadas portadoras (madres de los pacientes IDS1 e IDS11).

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante métodos estándares para procesar leucocitos de sangre periférica y fibroblastos. El diagnóstico prenatal se hizo entre las semanas 16-20 de edad gestacional, se obtuvo DNA de cultivado (n=1) y no cultivado (n=3, 2 de un embarazo gemelar) de células de líquido amniótico.

La asignación de género se realizó vía PCR, y amplificación del fragmento 270bp del gen *SRY* (17).

Se identificaron variaciones patogénicas del gen *IDS* en 24/25 pacientes (96%). Se detectaron 15 variantes patogénicas de tipo puntual y pequeñas variantes con desplazamiento de marco de lectura (60%), cada una fue identificada en una sola familia (Tabla 1).

Nueve de las variantes fueron nuevas, incluyendo: c.133G>C, c.1003C >T, c.1025A>C, c.463_464del, CCGTATAGCTGG, c.754_767del, c.1132_1133del, c.1463del, c.508-1G >C, c.1006+1G>T, además de la delección del exón 1 c. (-217_103del).

Tres nuevas variaciones de sentido erróneo c.133G>C ó p. (Asp45His), c.1003C>T ó p. (His335Tyr) y c.1025A >C ó p. (His342Pro) afectan la cadena de 42KdA de 12s. (a.a. 34-455) y afectan los residuos altamente conservados de la superfamilia de fosfatasa alcanina (alkPPC) (a. a. 38-416, NCBI Conserved Domains database: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP_000193.1).

El análisis *in silico* de estas variantes predicen que son dañinas y no se identificaron en los 133 alelos analizados de *IDS* de controles sanos.

Se identificaron transiciones de C>T y G>A en 6 de 10 parientes puntuales con c.253G>A o p.(Ala85Thr), c.262C>T o p.(Arg88Cys), c.1265G >A o p.(Cys422Tyr) y c.1403G>A o p.(Arg468Gln) localizadas entre los dinucleótidos CpG.

Se observaron dos tipos de variantes patogénicas comunes: deleciones extensas de *IDS/IDSP1*, que fueron delineadas con el estudio de microarreglos (n=4, 16%) y la inversión recurrente del gen *IDS* mediado por *IDP1* (n=3, 12%). El tamaño de las deleciones extensas fueron muy variables con un rango entre 157 kb (IDS28) a 1.8 Mb (IDS7). La región deletada en el paciente IDS28, que incluye a *IDS* e *IDSP1*, también estuvo presente en otros tres pacientes. Los pacientes IDS7 e IDS76 presentaron las deleciones más largas en el estudio de microarreglos (1.8 and 1.3Mb, respectivamente) e incluyeron al gen *AFF2* (Tabla 1).

Una restricción anormal de la inversión de *IDS/IDSP1* en el ensayo PCR-RFLP y la delación parcial de *IDS* de los exones 4 a 7 fueron detectados en el paciente IDS11, en su madre portadora y su hermano gemelo afectado. Estos hallazgos sugieren la presencia de un complejo rearreglo que involucra una inserción de *IDSP1*, que estaba previamente reportada como un alelo quimérico *IDS/IDSP1*.

El estado de portador fue asignado en 20/25 (80%) de las madres. Dos madres portadoras obligadas de MPSII (pacientes IDS1 e IDS11) solicitaron tres estudios prenatales y se diagnosticaron 4 fetos afectados. Este diagnóstico se basó en los resultados de la amplificación de *SRY* y la identificación del alelo quimérico *IDS-IDSP1* (en fetos gemelos) o del genotipo hemicígote *IDS* c.1003 C>T. La terminación médica del embarazo fue solicitada, y el genotipo mutado fue confirmado sólo en los productos del embarazo gemelar en muestras de cordón umbilical.

VIII. DISCUSIÓN:

El espectro de mutaciones de MPSII en la población Latino-Americana fue reportado recientemente (6), a pesar de esto no se incluía pacientes Mexicanos. En este estudio se describió el espectro de mutaciones de gen *IDS* en una muestra de pacientes mexicanos con MPSII y sus familiares.

En el locus *IDS* se ha evidenciado una gran heterogeneidad alélica responsable de MPSII, ya que a la fecha se han descrito más de 300 mutaciones patogénicas que en su mayoría son del tipo puntual, en regiones codificantes o en regiones intrónicas reguladoras del splicing (19).

Esta muestra aunque fue pequeña (n=25) mostró una gran heterogenicidad alélica, la cual incluía la mayor parte de las mutaciones ya descritas en otras series de MPSII, nueve cambios nuevos, una delección nueva del exón1 c. (-217_103del), un nuevo efecto de splicing, un alelo quimérico *IDS/IDSP1*, y cuatro delecciones completas *IDS/IDSP1* que fueron delineadas usando análisis de microarreglos.

Un estudio con 101 pacientes con MPS II reveló que prácticamente el 85% de las mutaciones puntuales en regiones codificantes ocurren en los exones III, V, VIII y IX (20). Por otro lado, hasta el 20-25% de los casos pueden presentar delecciones parciales o completas del gen *IDS* y loci aledaños, entre otros rearrreglos complejos como inversiones génicas generados por eventos de recombinación en cis- (intracromatídica), condicionados por un alto grado de homología entre el gen funcional *IDS* y el pseudogen aledaño *IDSP1* (20,21,22).

Las cuatro mutaciones puntuales que ocurrieron en los dinucleótidos CpG identificados en este estudio (4/10, 40%) son altamente recurrentes C>T o G>A en el MPSII, de acuerdo a los registros LOVD y HGMD, por lo que son considerados como "hot spots".

En MPSII 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 (20).

De las cinco pequeñas variantes con desplazamiento del marco de lectura, sólo c.596_599delAACA es recurrente, y ha sido reportada en otras poblaciones (23, 24,25), lo que puede reflejar la tendencia de deslizamiento de cadenas durante la replicación del DNA, ya que la microdelección se encuentra flanqueada por dos secuencias con repeticiones directas.

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 (26), decidimos

emplear el diagnóstico molecular se emplea como estándar de referencia para la detección del estado de portadora y el diagnóstico prenatal de fetos masculinos afectados, cuando la mutación en la familia se ha identificado previamente.

La estrategia molecular utilizada, determino el genotipo responsable de MPSII en 96% de los pacientes. Esta proporción es comparable con las obtenidas usando estrategias similares en grandes poblaciones de pacientes Caucásicos 100% de 155 pacientes, Latinoamericanos 100% de 103 pacientes y Coreanos 69 de 70 pacientes (98.5%).

Las alteraciones génicas como la inversión del gen *IDS* mediado por *IDSP1* (n=3), deleciones completas (n=4), deleciones parciales (n=1), y los alelos quiméricos *IDS-IDSP1* (n=1) fueron más frecuentes en nuestra muestra (9/25, 36%) comparado con reportes previos en pacientes caucásicos (27/155, 17.4%), Latino Americanos (20/103, 19.4%), Chinos (11/38, 29%) y Coreanos (14/74, 18.9%).

El alelo quimérico *IDS-IDSP1* en donde los exones 4 a 7 de *IDS* son reemplazados por una secuencia del pseudogen *IDSP1*, fue reportada previamente como un rearrreglo poco común en 1 de 155 y 1 de 18 de los pacientes estudiados con MPSII. La inserción del pseudogen *IDSP1* en el gen deletado funcional *IDS* produce un rearrreglo que es idéntico al observado en la inversión recurrente de *IDS/IDSP1*.

Estudios en grandes series de pacientes, han estimado que deleciones completas de *IDS* son responsables del 3 - 4.5 % de los casos de MPSII, y se han asociado a fenotipos severos.

Se ha observado que los pacientes con el alelos *IDS* con deleciones completas que se extienden a secuencias aledañas (en una serie ~17% de los casos), además de cursar con una actividad enzimática nula de I2S, invariablemente tienen un involucro más severo del SNC (retraso psicomotor, deterioro cognitivo progresivo) y otros datos clínicos atípicos como crisis convulsivas de inicio temprano que hacen suponer un síndrome de genes contiguos. Las crisis convulsivas se han descrito en pacientes cuya deleción del gen *IDS* se extiende hacia regiones del extremo centromérico y las cuales deletan parcialmente la secuencia del locus *FMR-2* o *AFF2*, un gen involucrado en una forma no sindrómica de discapacidad intelectual ligada al cromosoma X por inestabilidad de tripletas.

Pacientes con MPSII con deleciones de *IDS* que abarcan a *FMR1* y *AFF2* presentan una alteración neurológica significativa y/o discapacidad intelectual, hidrocefalia, hipotonía severa y crisis convulsivas (13).

Las deleciones continuas de *AFF2-IDS-IDSP1* identificadas en los pacientes *IDS7* e *IDS76* son similares a la deleciones continuas previamente descritas.

Con la excepción de hipotonía, el fenotipo del paciente IDS7 es consistente con el reportado, lo que guía a un diagnóstico temprano de MPSII a la edad de 1 año. En este paciente la terapia de reemplazo enzimático con idursulfasa fue iniciado a los 23 meses de edad. A la edad de 4 años y 5 meses, presenta en evento vascular cerebral, con hemiparesia derecha; hasta ese momento, la resonancia magnética y tomografía computada revelaron hidrocefalia comunicante de alta presión que fue manejada con sistema de derivación ventricular. A pesar del procedimiento presentó de manera gradual pérdida bilateral de la visión, audición, movilidad y pérdida de la comunicación verbal, al igual que crisis convulsivas (15 episodios al día).

El paciente IDS76 que tenía la delación *AFF2-IDS.IDSP1*, fue referido para el diagnóstico molecular a los 10 años de edad, con un severo involucro neurológico, sin hidrocefalia o crisis convulsivas, lo que apoya que las deleciones contiguas de *AFF2* o *FMR1* no aseguran la presencia de crisis convulsivas en pacientes con MPSII (27-28).

Honda et. al 2007, también reportaron a un paciente con una deleción continua de *AFF2-IDS.IDSP1*, que no presentó crisis convulsivas a la edad de 23 meses. Sin embargo, como en nuestro paciente IDS7, se debe de dar un seguimiento clínico e imagenológico para la vigilancia de hidrocefalia y epilepsia en pacientes donde se identifican deleciones contiguas extensas (29).

En nuestro estudio se observó un 20% de mutaciones *de novo*, cifra similar a la previamente descrita en otras series. (15.6 – 24%) (4, 6, 10).

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 BVC o amniocentesis, cuando la mutación en la familia se ha identificado previamente. Sin embargo, el asesoramiento genético puede complicarse en familias donde exista mosaicismo germinal, mecanismo no tradicional de herencia reportado ocasionalmente en MPSII.

La identificación de moissaisismos somáticos y germinales en una 1 de 20 de las madres portadoras de MPSII, sugiere que esta condición debe de ser considerada durante el consejo genético.

Los moissaisismos somáticos y germinales se reportaron solo en otras dos familias con MPSII (1/155, 1,29%), sin embargo un moissaisismo germinal puro no se ha reportado hasta el momento.

Nosotros identificamos la variante patogénica *c.463_464delinsCCGTATAGCTGG* en el DNA genómico obtenido del sedimento urinario de la madre del paciente IDS31. A pesar de ello niveles muy bajos de moissaisismo somático en las muestras de DNA de leucocitos de sangre periférica, fibroblastos de cavidad oral y

de raíz de cabello, no pudieron ser descartados porque los ensayos de secuenciación automatizada no son ensayos cuantitativos.

De hecho, la prevalencia real de mosaicismos somático y/o germinales en casos de MPSII secundarios a mutaciones *de novo* podrían estar subestimados debido a que el alelo mutado es raramente cuantificado en el DNA genómico de diferentes muestras de tejido en las madres.

Por lo anterior, enfatizamos que el estudio molecular debe de ser extendido a todos los miembros de la familia que se encuentran en riesgo, y se debe de ofrecer un diagnóstico prenatal (5), a pesar de que se documente un genotipo *IDS* normal en la mamá de un caso único de MPSII.

Como regla, las mujeres heterocigotas para MPSII, se asume que son asintomáticas, aunque estas pueden mostrar un nivel significativamente bajo de actividad plasmática de I2S en comparación a mujeres no portadoras de la enfermedad.

Un caso de MPSII en mujeres es raro; son aproximadamente 15 casos reportados hasta la fecha en donde está incluida un paciente con descendencia Mexicana. (6). El mecanismo frecuentemente implicado es la inactivación de X en mujeres heterocigotas y translocaciones o deleciones largas de cromosoma X. Ninguna de las 24 madres y 16 parientes femeninos en este estudio se refirieron con alguna sintomatología relacionada con MPSII.

Los tres diagnósticos prenatales que se realizaron en el estudio, mostraron que esta estrategia debe de ser considerada como preventiva en familias Mexicanas con MPSII. Esto es relevante porque la experiencia en diagnósticos prenatales en pacientes Latinoamericanos es limitada. Solo un feto afectado con MPSII de descendencia Latino Americana ha sido identificado mediante diagnóstico con DNA y actividad de I2S (14,31). Además la caracterización del genotipo responsable de MPSII en parejas de riesgo abre la posibilidad de ofrecer diagnóstico genético preimplantacional (PDG), aunque éste método no está ampliamente disponible en nuestro país.

La correlación entre la terapia de reemplazo enzimático y los efectos adversos con genotipos *IDS* no han sido reportados. Los hermanos gemelos afectados del paciente IDS33 (con inversión *IDS/IDSP1*) desarrollaron trombocitopenia y pancitopenia después de la discontinuación de la terapia de reemplazo enzimático 0.5mg/kg/semana).

La Idursulfasa fue iniciada a los 7 años de edad, sin embargo el primer gemelo desarrollo rash urticaria y edema glotis después de 6 sesiones que causo la suspensión del tratamiento. Dieciséis meses después de la suspensión, presentó hemorragia gingival severa con conteo plaquetario de 2×10^9 /L.

El aspirado de médula ósea, permitió establecer el diagnóstico de Púrpura trombocitopénica Idiopática (PTI). Se inició tratamiento con metilprednisolona intravenosa e inmunoglobulina, sin embargo la respuesta fue poco satisfactoria. Se le realizó esplenectomía a los 8 años con 6 meses de edad lo que mejoró la cifra plaquetaria ($37 \times 10^9/L$). Después de 1 año, el paciente desarrollo infección de vía respiratoria inferior y sangrado gastrointestinal, que le ocasiono la muerte a los 9 años con 6 meses de edad.

El segundo gemelo afectado recibió 25 sesiones de Idursulfasa pero sus padres decidieron suspender la terapia de reemplazo enzimático, a los 9.5 años de edad debido a progresión de la enfermedad y aumento de infecciones respiratorias. Cuatro meses después de la suspensión el paciente desarrollo neumonía, edema generalizado y petequias. Su hemograma reveló leucopenia ($0.5 \times 10^9/L$) y trombocitopenia ($25 \times 10^9/L$) requiriendo de transfusión plaquetaria y tratamiento con metilprednisolona, pero a pesar de ello la respuesta a las 24 horas de tratamiento fue discreta ($42 \times 10^9/L$). Se le realizó biopsia de médula ósea la cual resultó sugestiva de PTI. A la edad de 9 años 9 meses el paciente murió por choque séptico secundario a neumonía y pancitopenia. El paciente IDS33 (hermano pequeño de los gemelos) ha sido tratado por 7 años con terapia de reemplazo enzimático y hasta donde llega nuestro conocimiento nunca ha presentado por clínica ni por laboratorio datos sugestivos e PTI u otro efecto adverso relacionado a la administración de Idursulfasa.

En otro paciente con MPSII fue reportado que desarrollo PTI relacionada al tratamiento con idursulfasa después de 8 meses del tratamiento. Este paciente caucásico de 20 años de edad respondió de manera adecuada al tratamiento con inmunoglobulina, y la terapia de reemplazo enzimático fue considerada como el agente etiológico principal para el desarrollo de PTI (5). Sin embargo no se han reportado otros casos serios de PTI u otros efectos adversos hematológicos en un estudio reciente de tratamiento con Idursulfasa en pacientes con MPSII. Solo 1 de 28 pacientes tratados desarrollo eosinofilia (32).

Existen otras explicaciones de las alteraciones hematológicas presentadas en nuestros pacientes, tales como infecciones virales, bacterianas sin embargo la trombocitopenia ha sido descrita después del tratamiento con Gasulfasa para MPSVI.

Por ello, consideramos que la PTI podría considerarse un efecto adverso a largo plazo y de tipo idiosincrático secundario a la terapia de reemplazo enzimático.

IX. CONCLUSIÓN.

Nuestros hallazgos apoyan una amplia heterogeneidad alélica en pacientes Mexicanos con MPSII, en donde los rearrreglos de gran tamaño ocurrieron con más alta frecuencia respecto a las previamente reportadas en otras poblaciones (36% vs 18.9-29%).

El análisis de microarreglos permite una posterior delineación del fenotipo resultante para deleciones extensas de *IDS*, y este sugiere que la pérdida de *IDS* y *AFFS* no es un genotipo penetrante total para el desarrollo de crisis convulsivas. En adición, la identificación de mosaicismos somáticos y germinales en nuestra muestra de estudio (1/25 familias, 4%) enfatiza la necesidad de considerar este fenómeno de herencia no tradicional en el consejo genético de las familiar con MPSII.

El desarrollo de PTI y pancitopenia en dos pacientes hermanos con MPSII después del tratamiento con terapia de reemplazo enzimático requiere especial atención para determinar si se trata de un posible efecto adverso de consecuencias letales en la población de pacientes con MPSII tratados con idursulfasa.

X. BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- J.L. Suarez. et. al. Mucopolysaccharidosis: clinical features, diagnosis and management. *Rev Chil Pediatr.* 2016 Jul-Aug;87(4):295-304.
- 2.- A González-Meneses López, A Barcia Ramírez. et. al. Protocolo de actuación en las mucopolisacaridosis. *Protoc diagn ter pediatr.* 2010;1:24-36
- 3.- Brusius-Facchin AC, Schwartz IV, Zimmer C et al. Mucopolysaccharidosis typell:identification of 30 novel mutations among LatinAmerican patients. *Mol Genet Metab* 2014: 111 (2): 133–138.
- 4.- Day M. Burrus, Tim C. Wood,et. al. Severe Hunter Syndrome (Mucopolysaccharidosis II) Phenotype Secondary to Large Deletion in the X Chromosome Encompassing IDS, FMR1, and AFF2 (FMR2). *Journal of Child Neurology.* 6 Sep. 2011.
- 5.- Giugliani R, Hwu WL, Tytki-Szymanska A, Whiteman DA, Pano A. A multicenter, open-label study evaluating safety and clinical outcomes in children (1.4-7.5years) with Hunter syndrome receiving idursulfase enzyme replacement therapy. *Genet Med* 2014: 16 (6): 435–441.
- 6.- Piña-Aguilar RE, Zaragoza-Arévalo GR, Rau I et al. Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet* 2013: 56 (3): 159–162
- 7.- Wraith JE, Scarpa M, Beck M et al. Mucopolysaccharidosis type II (Huntersyndrome):aclinicalreviewandrecommendationsfortreatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr* 2008: 167 (3): 267–277.
- 8.- Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Muñoz V et al. Recognition and diagnosis of Mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Pediatrics.* 2008;121:e377-87
- 9.- Lai LM1, Lachman RS. Early characteristic radiographic changes in mucopolisacaridosis II . *Pediatr Radiol.* 2016 Nov;46(12):1713-1720.
- 10.- Lin SM, Lin HY, et. al.Cardiovascular abnormalities in Taiwanese patients with mucopolysaccharidosis. *Mol Genet Metab.* 2014 Apr;111(4):493-8.
- 11.- Vargas-Gamarra MF, de Paula-Vernetta C. et. al. Audiological findings in children with mucopolysaccharidoses type i-iv. *Acta Otorrinolaringologia.* 2017. Feb 18.

- 12.- M.R. Rivera Veba. H. García. et. al. Reporte de caso de paciente con mucopolisacaridosis tipo II. *Revista Médica del Hospital General de México*. 28 Agosto 2016.
- 13.- 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.
- 14.- Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Gen Med*. 2006;8(8):465-73.
- 15.- 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.
- 16.- Froissart R, Da Silva IM, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatr Suppl* 2007; 96 (455): 71–77.
- 17.- Brusius-Facchin AC, DeSouza CF, Schwartz I 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.
18. 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
19. 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.
20. 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: 1202–1209.
21. 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.
22. 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.

23. Li P, Bellows AB, Thompson JN. Molecular basis of iduronate-2sulphatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *J Med Genet* 1999; 36 (1): 21–27
24. 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 creates exonic splicing. *PLoS One* 2011; 6 (8): e22951.
25. 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.
26. 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.
27. 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): 786–790
28. 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.
29. 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.
- 30.- Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol.* 2005;32:270-2
- 31.- 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.

XI. ANEXOS

Tabla 1.

	Localización IDS	Paciente ID-MPSII fenotipo	Ensayo I2S	Historia Familiar	Estado portador materno
Variantes patogénicas de sentido erróneo y sin sentido (n=8, 32%)					
c.133G>C/p.(Asp45His)	Exón 2	IDS9 Severo	NA	Ausente	Portadora obligada
c.223C>T/p.(Gln75*)	Exón 2	IDS47 Moderado	POS	Ausente	Portadora obligada
c.253G>A/p.(Ala85Thr)	Exón 3	IDS39 Desconocido	NA	Desconocido	Portadora obligada
c.262C>T/p.(Arg88Cys)b	Exón 3	IDS62 Severo	POS	Ausente	No portadora
c.1003C>T/p.(His335Tyr)	Exón 7	IDS1 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada
c.1025A>C/p.(His342Pro)	Exón 8	IDS22 Severo	NA	Presente	Confirmado Portadora obligada
c.1265G>A/p.(Cys422Tyr)	Exón 9	IDS45 Moderado	POS	Presente	Confirmado Portadora obligada
c.1403G>A/p.(Arg468Gln)c	Exón 9	IDS71 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada
Variantes patogénicas con desplazamiento del marco de lectura (n=5, 20%)					
c.463_464delinsCCGTATAGCTGG/p.(Phe155Profs*12)c	Exón 4	IDS31 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada por mosaicismosomático y germinal
c.596_599del/p.(Lys199Argfs*13)	Exón 5	IDS24 Severo	POS	Ausente	No portadora
c.754_767del/p.(Asp252*)	Exón 6	IDS37 Severo	NA	Ausente	No portadora
c.1132_1133del/p.(Phe378Profs*7)	Exón 8	IDS43 Severo	NA	Presente	Confirmado Portadora obligada
c.1463del/p.(Met488Argfs*8)	Exón 9	IDS64 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada
Variantes patogénicas de splicing (n=2, 8%)					
c.508-1G>C	Sitio aceptor intrón 4	IDS13 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada
c.1006+1G>Tc	Sitio donador intrón 7	IDS51 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada
Deleciones parciales y completas del gen IDS N=5, 20%					
c.(-217_103del)	Delección Exón 1	IDS78 Desconocido	POS	Presente	No disponible
arrXq28(148,467,083-148,624,248)x0 mat	Delección completa IDS/IDSP1 (157kb).eAFF2 y FMR1 preservado	IDS28 Severo	NA	Ausente	Portadora Obligada
arr Xq28(148,176,414-148,738,845)x0 mat	Delección completa IDS/IDSP1 (562kb).eAFF2 y FMR1 preservado.	IDS58 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada
arr Xq28(147,340,291-148,731,894)x0	Delección completa IDS/IDSP1 (1.39Mb).e AFF2 y FMR1 preservado	IDS76 Severo	POS	Ausente	No portadora
arr Xq28(147,392,284-149,225,394)x0	Delección completa IDS/IDSP1 (1.83Mb).e AFF2 y FMR1 preservado	IDS7 Severo	POS	Ausente	No portadora

	Localización IDS	Paciente ID-MPSII fenotipo	Ensayo I2S	Historia Familiar	Estado portador materno
Inversiones <i>IDS - IDSP1</i> -mediadas (n=3, 12%)					
	Inversión <i>IDS/IDSP1</i>	IDS3 Severo	POS	Ausente	Portadora obligada
	Inversión <i>IDS/IDSP1</i>	IDS33 Severo	NA	Presente	Confirmado Portadora obligada
	Inversión <i>IDS/IDSP1</i>	IDS60 Moderado	POS	Ausente	Portadora obligada
Otros rearrreglos complejos (n=1, 4%)					
NG_011900.3:g.6129_22625delins AC244197.3:g.45710_48426	Alelo quimérico <i>IDS-IDSP1</i> (<i>IDS</i> deleción parcial del exón 4 a 7 aunado a inserción <i>IDSP1</i>)	IDS11 Severo	POS	Presente	Confirmado Portadora obligada
Desconocida (n=1, 4%)					
r.1007_1180del/p.(Trp337_Gly394del)	Exon 8	IDS5 Severo	POS	Presente	Confirmado Portadora obligada

** NA. No disponible. PCR. Reacción de polimerasa en cadena; POS, iduronate 2-sulfatase (I2S)-based evaluation diagnostic of MPSII.