



Revista cubana de
Genética
COMUNITARIA

**PCR para la detección de la mutación p.W402X y su identificación en familias
cubanas con síndrome de Hurler**

PCR for determination of p.W402X mutation and its identification in Cuban
families with Hurler syndrome

PCR para la detección de la mutación p.W402X y su identificación en familias cubanas con síndrome de Hurler

PCR for determination of p.W402X mutation and its identification in Cuban families with Hurler syndrome

Tatiana Acosta Sánchez^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8442-8391>
Mercedes Arceo Álvarez¹ <https://orcid.org/0000-0003-3029-0179>
Teresa Collazo Mesa¹ <https://orcid.org/0000-0002-3984-9189>
Liset Rodríguez Muñoz¹ <https://orcid.org/0000-0001-9911-3213>
Laritz Martínez Rey¹ <https://orcid.org/0000-0003-4461-498X>
Yadira Hernández Pérez¹ <https://orcid.org/0000-0003-0662-3412>
Lázara E. Larrinaga¹ <https://orcid.org/0000-0003-1426-5467>
Lilia Marín Padrón¹ <https://orcid.org/0000-0001-9819-4648>
Alejandro Esperón Álvarez¹ <https://orcid.org/0000-0002-6806-4874>

¹Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: tatianaacosta@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La mucopolisacridosis tipo I es una enfermedad genética de almacenamiento lisosomal con un modo de herencia autosómico recesivo. El síndrome de Hurler es la forma más severa de presentación. La causa molecular es la deficiencia en la actividad de la enzima α L-iduronidasa producto de mutaciones en el gen IDUA. La que con mayor frecuencia se ha identificado en Europa y América es la c.1205G>A; p.W402X. En Cuba, hasta este momento, no hay disponibles estudios moleculares.

Objetivos: Introducir una técnica de PCR con digestión enzimática para la detección de la mutación p.W402X y caracterizar molecularmente a familias con síndrome de Hurler identificadas entre el 2008 y el 2018.

Métodos: Se empleó ADN obtenido a partir de sangre seca impregnada en papel de filtro. Se estandarizó un PCR con digestión enzimática producto de modificaciones realizadas al método descrito por Scott y otros en 1992. Se estudiaron cinco familias con algún miembro afectado con fenotipo Hurler.

Resultados: En todas las familias estudiadas se identificó la mutación p.W402X; en tanto los pacientes mostraron una actividad enzimática de α L-iduronidasa leucocitaria muy disminuida.

Conclusiones: Dentro del espectro mutacional del gen IDUA responsable del síndrome de Hurler en Cuba en el periodo evaluado, la mutación p.W402X es la más frecuente. Por lo tanto, la técnica de biología molecular introducida debe ser muy efectiva para el diagnóstico molecular de esta entidad en el país.

Palabras clave: mucopolisacaridosis; síndrome de Hurler; IDUA; alfa L-iduronidasa; p.W402X; c.1205G>A.

ABSTRACT

Mucopolysaccharide type I is a genetic disease of lysosomal storage with an autosomal recessive mode of inheritance. Hurler syndrome (MPS IH) is the most severe form of presentation. The molecular cause is the deficiency in the activity of the enzyme alpha L-iduronidase because of mutations in the IDUA gene. The main international databases on monogenic diseases describe more than 160 mutations and about 30 polymorphisms. The one that has been most frequently identified in Europe and America is c.1205G>A; p.W402X. In Cuba, no molecular studies have been carried out.

Objectives: To introduce a PCR technique with enzymatic digestion for the detection of the p.W402X mutation and molecularly characterize patients diagnosed with Hurler's syndrome between 2008 and 2018.

Methods: DNA obtained from dried blood spot was used. PCR was standardized with enzymatic digestion as a result of modifications made to the method described by Scott and colleagues in 1992. Five families with one member affected with MPS IH were studied.

Results: All patients with MPS IH were found to be homozygous for W402X and with very low iduronidasa activities in leukocytes.

Conclusions: The W402X mutation must be the most frequent within the mutational spectrum of the IDUA gene responsible for Hurler's syndrome in Cuba. Therefore, the molecular biology technique introduced should be very effective for the molecular diagnosis of this entity in the country.

Keywords: mucopolysaccharidoses, Hurler Syndrome, L-iduronidase, IDUA, p.W402X, c.1205G>A

Recibido: 28/06/2019

Aceptado: 03/09/2019

Introducción

La mucopolisacridosis tipo I (MPS I) es una enfermedad genética de almacenamiento lisosomal con un modo de herencia autosómico recesivo. La base molecular de este desorden es la deficiencia en la actividad del biocatalizador α L-iduronidasa (EC 3.2.1.76) por afectación estructural del gen IDUA. Esta enzima forma parte de la ruta catabólica de los glicosaminoglicanos (GAGs) dermatán sulfato (DS) y heparán sulfato (HS). Esta situación metabólica provoca la acumulación progresiva intralisosomal de estos GAGs en diferentes tejidos y órganos, a lo que se atribuye en gran medida el fenotipo clínico.

Su incidencia global aproximada es de 1:100 000 nacidos vivos. Se han descrito casos en todas las áreas geográficas y en todos los grupos étnicos. Las características clínicas comunes incluyen: tosquedad facial, rinitis crónica, otitis media recurrente, hepatosplenomegalia, opacidad corneal, hernias inguinales o umbilical, hipertrofia y valvulopatías cardíacas, insuficiencia respiratoria, rigidez articular, disostosis múltiple, talla baja, retraso del desarrollo y deterioro cognitivo progresivo.

En la MPS I hay una variedad de fenotipos con un rango continuo de gravedad. Los pacientes son usualmente clasificados en tres subtipos clínicos, según el grado de discapacidad intelectual, la severidad del daño visceral, la edad de aparición de los primeros síntomas y la expectativa de vida. Aquellos que tienen una forma de presentación más grave se clasifican como fenotipo o síndrome de Hurler (MPS IH; OMIM # 607014); en ellos generalmente se evidencia desde edades tempranas una discapacidad intelectual severa, deformidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia y contracturas articulares, y fallecen en la primera década de la vida. La fascie tosca es una característica distintiva de estos pacientes, tanto que habitualmente se emplea el término de *fascie hurleriana* para describir esta dismorfia.^(1,2,3,4)

Los primeros casos fueron reportados en 1919 por *Gertrud Hurler*,⁽⁵⁾ pero no fue hasta 1972 que se demostraron las bases biológicas de la MPS I.⁽⁶⁾ En 1992 *Scott* y otros,⁽⁷⁾ luego de clonar y purificar el gen IDUA (*locus* 4p16.3), demostraron que contiene 14 exones y una extensión de 19 kb. Por otra parte, su cADN posee 2,3 kb cDNA, en tanto la proteína que codifica está integrada por 653 aminoácidos.

Las principales bases de datos de mutaciones como ClinVar, HGMD, LOVD, dbSNP ([Clinical Variant](#), [Human Gene Mutation Database](#), [Leiden Open Source Variation Database](#), [The Single Nucleotide Polymorphism Database](#)) describen más de 160 mutaciones y alrededor de 30 polimorfismos. Algunas mutaciones muestran gran prevalencia en ciertas regiones geográficas. La que con mayor frecuencia se ha identificado en varios países de Europa y América es la mutación que se denomina c.1205G>A; p.Trp402Ter; p.W402X.^(8,9,10,11)

La confirmación del síndrome de Hurler, al igual que muchos errores innatos del metabolismo implica el cumplimiento de un algoritmo diagnóstico. Tras la sospecha clínica, es necesaria la realización de pruebas bioquímicas complementarias para apoyar la sospecha diagnóstica. La

primera línea para el cribado incluye el análisis cualitativo y cuantitativo de GAGs en orina, cuya utilidad radica en que son pruebas muy rápidas y de fácil acceso.⁽²⁾ El segundo nivel lo ocupa la evaluación del fenotipo enzimático. El patrón de oro para el diagnóstico es la medición de la actividad α L-iduronidasa a pH ácido en los leucocitos o fibroblastos de los pacientes. La actividad enzimática puede determinarse mediante métodos fluorimétricos, empleando sustratos radioactivos, por inmunocaptura y espectrometría de masas.^(3,4) Finalmente, el estudio genético permite localizar las mutaciones de cada uno de los alelos del gen IDUA. Esto permite confirmar molecularmente el diagnóstico, realizar estudios de portadores y un asesoramiento genético más efectivo a las familias.^(2,3,4)

Actualmente, el estudio bioquímico se realiza en el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM). En el periodo comprendido entre 2008 y 2018 se han diagnosticado clínica y bioquímicamente con síndrome de Hurler, ocho pacientes (dos de ellos, hermanos) procedentes de siete familias. Previo a esta investigación, aún no se disponía en el país de estudios moleculares para la mucopolisacaridosis I y tampoco se ha caracterizado el espectro mutacional de IDUA en nuestros pacientes.

Múltiples han sido los procedimientos de biología molecular que se han empleado para identificar esta mutación en el gen IDUA; el más empleado combina la reacción en cadena de la polimerasa y la digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés).^(8,9,10,11)

Los reportes de alta frecuencia de p.Trp402Ter en poblaciones étnicas similares a la de Cuba y los datos de las familias cubanas caracterizadas, nos permiten presumir que dicha mutación pudiera ser la más frecuente en nuestro país.

Teniendo en cuenta todos estos elementos, nos propusimos introducir una técnica de PCR con digestión enzimática para la detección de la mutación p.W402X y caracterizar molecularmente a familias con síndrome de Hurler identificadas entre el 2008 y el 2018.

Métodos

Formaron parte de esta investigación cinco de las siete familias cubanas con algún miembro diagnosticado con síndrome de Hurler entre el 2008 y el 2018. Se estudiaron desde el punto de vista bioquímico y molecular; posteriormente se relacionó el genotipo con los resultados del ensayo enzimático. Las dos familias restantes aunque se les realizó estudio bioquímico, no se pudo contar con muestras para estudiar el genotipo. Esta situación constituye una limitante de este estudio; no obstante a esta situación, consideramos que los resultados obtenidos en esta investigación son de gran valor científico.

La determinación de la actividad enzimática de la α L-iduronidasa de todos los pacientes y sus padres se realizó según protocolo estandarizado en el laboratorio de genética bioquímica del

CNGM,⁽¹⁶⁾ se empleó para ello una técnica fluorimétrica y como muestra biológica homogenato de leucocitos séricos.

El genotipo de una familia fue identificado en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de España (CEDEM). Para ello se utilizó secuenciación masiva empleando panel de exoma clínico y secuenciación por método de Sanger.

Las cuatro familias restantes fueron estudiadas con un procedimiento de PCR-RFLP estandarizado en el laboratorio de biología molecular del CNGM.

Como muestra biológica para este estudio molecular se utilizó ADN nuclear obtenido a partir de sangre seca impregnada en papel de filtro. Se empleó el extractor automático QIASymphony SP y el estuche Investigator®, comercializado por QUIAGEN.

El procedimiento de PCR-RFLP estandarizado fue el resultado de algunas modificaciones de los métodos descritos por *Scott* y otros⁽¹²⁾ en 1992 y *Clarke* y otros en 1994.⁽¹³⁾ Las principales transformaciones estuvieron en función de la ADN polimerasa empleada, las características de la mezcla de reacción, los ciclos del PCR y las condiciones de la digestión enzimática.

En el PCR se emplearon los oligonucleótidos cebadores descritos por *Scott* y otros⁽¹²⁾ Estos fueron sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y presentaron las secuencias:

- F:5'-TGGCGGGGCTGGGGACTCCTTCACCTA-3'
- R:5'-GCGGGTGTCTCGCTCGCGTAGAT-3'

Se realizó la optimización de todos los parámetros del PCR-RFLP.

Los reactivos utilizados para reacción en cadena de la polimerasa fueron procedentes de QUIAGEN, excepto los desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) que fueron producidos por Invitrogen. Paralelamente, se utilizaron reactivos comercializados por BIOLAB para obtener los fragmentos de restricción.

Para la estandarización de la digestión enzimática se utilizó como controles negativos ADN procedentes de personas aparentemente sanas sin antecedentes de MPS; como control positivo ADN del paciente cubano con genotipo homocigótico p.W402X, y el de sus padres para el genotipo heterocigótico.

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación asociado a un programa nacional del Minsap luego de ser avalado por el Comité de Ética y Consejo Científico del CNGM. Los participantes manifestaron su voluntariedad mediante la firma del consentimiento informado y durante el transcurso de la investigación se respetaron los principios éticos de la *Declaración de Helsinki*.⁽¹⁴⁾

Resultados

La mezcla de reacción para el PCR resultó conformada de la siguiente manera:

- 1,0 µL de ADN (100 ng)
- 0,9 µL de cada cebador (9 pmoles/µL)
- 0,6 µL de cada dNTPs (2 mmol/L)
- 0,3 µL de la enzima ADN polimerasa Hot Start (5 UI)
- 2,5 µL de Buffer Hot Start (10X)
- 0,5 µL de MgCl₂ (2 mol/L)
- 7,5 µL de solución Q (5X)

El volumen final de reacción fue llevado a 25 µL con agua destilada.

Las condiciones del PCR que quedaron establecidas comienzan con una etapa a 95 °C para la activación de la TAQ polimerasa empleada. Seguidamente, se realizaron 35 ciclos de: desnaturación inicial a 95 °C por 30 s, alineación a 68 °C por 30 s y elongación a 72 °C durante 60 s. Una vez terminado este paso, se hizo una extensión final a 72 °C por 300 s en un termociclador QuantaBiotech Q-CICLER II. Al terminar los ciclos se mantuvieron los productos de PCR a 4 °C.

El rendimiento y especificidad de este procedimiento fue evaluado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (250 V, por 15 minutos) teñido con bromuro de etidio. Concluida la corrida electroforética, el gel fue colocado sobre un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiado para su análisis. El producto de la PCR obtenido bajo estas condiciones es un fragmento de 274 pb del gen del IDUA.

La digestión se realizó con la enzima de restricción BfaI durante 4 horas a 45 °C. Para ello se mezclaron 3 µL de la enzima y 3,5 µL de buffer con 10 µL de producto de PCR. Los productos de la digestión se analizaron mediante corrida electroforética en un gel de agarosa al 1,8 %. (250V, por 20 minutos). Se empleó similar método de tinción y visualización. Se colocó siempre muestras controles negativas (genotipo sin la mutación) y controles positivas (genotipos homocigóticos y heterocigóticos), además del marcador de peso molecular de Promega.

Los posibles fragmentos de ADN que se obtienen son: para el alelo sin la mutación p.W402X (26 pb +248pb) y para el alelo mutado (26pb+ 110pb+138 pb).

En la figura 1 se muestra la imagen de un corrida electroforética de productos del PCR-RFLP para la detección de la mutación p.W402X. Se observan los patrones de bandas obtenidos para muestras con diferentes genotipos.

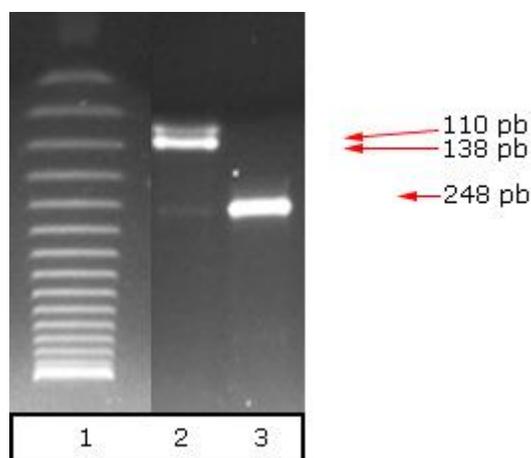


Fig. 1 - Electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % para análisis de digestión del producto de PCR con enzima Bfa1. Carril 1: patrón de peso molecular. Carril 2: genotipo homocigótico (bandas 110pb + 138pb). Carril 3: genotipo sin la mutación (banda 248pb).

De las 11 muestras de ADN procesadas, 3 pertenecían a pacientes (incluido control positivo) y seis a sus respectivos padres. Las otras dos muestras de ADN corresponden a los padres de los dos hermanos diagnosticados en este periodo, pero que fallecieron antes de ser estar disponible el estudio molecular.

En la tabla 1 se describen los datos de los miembros de las familias estudiadas, así como los resultados del estudio enzimático y molecular.

Tabla - Resultados del fenotipo enzimático y genotipo de los sujetos de la investigación

Sujetos estudiados	Actividad enzimática específica y relativa a control sano de α L-iduronidasa	Resultado estudio molecular para la mutación p.W402X
ADN 1. Control positivo homocigótico. Paciente 1: Diagnóstico de MPS IH a los 7 meses. Procedente de de Guantánamo. Miembro de la Familia 1.	0,043 (< 1 %)	Homocigótico en CEDEM y CNGM
ADN 2. Control positivo heterocigótico 1: Madre del paciente 1. Procedente de Guantánamo. Miembro de la Familia 1.	5,04 (65 %)	Heterocigótico en CEDEM y CNGM
ADN 3. Control positivo heterocigótico 2: Padre del paciente 1. Procedente de Guantánamo. Miembro de la Familia 1.	4,26 (56 %)	Heterocigótico en CEDEM y CNGM
ADN 4. Paciente 2. Diagnóstico clínico y bioquímico de MPS IH al año. Procedente de Matanzas. Miembro de la Familia 2	0,05 (< 1 %)	Homocigótico en CNGM
ADN 5. Madre del paciente 2. Procedente de Matanzas. Miembro de la Familia 2.	4,35 (57 %)	Heterocigótico en CNGM
ADN 6. Padre del paciente 2. Procedente de Santiago de Cuba. Miembro de la Familia 2.	4,7 (58 %)	Heterocigótico en CNGM
ADN 7. Paciente 3. Diagnóstico clínico y bioquímico de MPS IH al año. Procedente de Ciego de Ávila. Miembro de la Familia 3.	0,12 (1,7 %)	Homocigótico en CNGM
ADN 8. Madre de paciente 3. Procedente de Ciego de Ávila. Miembro de la Familia 3.	3,36 (45 %)	Heterocigótico en CNGM
ADN 9. Padre de paciente 3. Procedente de Ciego de Ávila.	2,98 (38 %)	Heterocigótico en CNGM

Miembro de la Familia 3. ADN 10. Madre de dos pacientes fallecidos (pacientes 4 y 5) diagnosticados con MPS IH. Procendente de Guantánamo. Miembro de la Familia 4.	3,29 (52 %)	Heterocigótico en CNGM
ADN 11. Padre de dos pacientes fallecidos (pacientes 4 y 5) diagnosticados con MPS IH. Procendente de Guantánamo. Miembro de la Familia 4.	3,7 (59 %)	Heterocigótico en CNGM
Paciente 4. Diagnóstico de MPS IH a los 13 meses. Fallecido a los 16 meses Procendente de Guantánamo. Miembro de la Familia 4.	0,14 (1 %)	Posible homocigótico a partir de resultados de los padres
Paciente 5. Diagnóstico de MPS IH a los tres meses. Fallecido a los 5 meses. Procendente de Guantánamo. Miembro de la Familia 4.	0,18 (1,5 %)	Posible homocigótico a partir de resultados de los padres
ADN 12. Madre de paciente con diagnóstico de MPS IH a los meses. Fallecido a los *** meses. Procendente de Ciego de Ávila. Miembro de la Familia 5.		Heterocigótico en CNGM
ADN 13. Padre de paciente con diagnóstico de MPS IH a los 6 meses. Fallecido a los 14 meses. Procendente de Ciego de Ávila. Miembro de la Familia 5.		Heterocigótico en CNGM
Paciente con diagnóstico de MPS IH a los 6 meses. Fallecido a los 14 meses. Procendente de Ciego de Ávila. Miembro de la Familia 5.		Posible homocigótico a partir de resultados de los padres

Discusión

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica relativamente simple para producir *in vitro* grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN. Este procedimiento fue originalmente desarrollado por Saiki y otros en 1985.⁽¹⁵⁾ Desde entonces, numerosos han sido los PCR diseñados con múltiples propósitos, entre los que resalta su empleo en el diagnóstico de enfermedades genéticas.⁽¹⁶⁾

Una mezcla de reacción estándar contiene, además del ADN a amplificar, una ADN polimerasa termoestable, dos moléculas cebadoras de oligonucleóticos, dNTPs, *buffer* de reacción e iones Mg^{2+} . La optimización de cualquier procedimiento debe considerar cada una de estos factores.⁽¹⁷⁾

En el PCR desarrollado se emplearon las condiciones descritas por Scott y otros,⁽⁷⁾ solo se realizaron algunas modificaciones como: incorporación de solución Q y el empleo de la ADN polimerasa Hotstar. La incorporación de la solución Q a la mezcla de reacción se hizo necesaria, pues la región a amplificar es rica en residuos G-C, lo que dificulta la desnaturalización de la molécula. Este aditivo facilita la ruptura de los tres puentes de hidrógenos que se establecen entre esas bases complementarias que estabilizan la doble cadena de ADN en esas regiones. Por otra parte, el empleo de la polimerasa Hot Start posibilita que la reacción comience solo cuando la temperatura de la mezcla es suficientemente alta, ya que la enzima está inactiva a temperaturas de menos de 95 °C. Esta situación garantiza que no se produzcan hibridaciones y amplificaciones inespecíficas, lo que reduce el riesgo de contaminación cuando la preparación de la mezcla de reacción se realiza a temperatura ambiente.⁽¹⁸⁾

La presencia de esta mutación en el exon 9 del gen IDUA genera un nuevo sitio de restricción para la enzima Bfa1; De esta manera todos los productos de PCR que presentan una talla

molecular de 274 pb, poseen un sitio que genera la banda 26 pb y los que posean la mutación generarán además los fragmentos 110 pb y 148 pb. Por las condiciones de la electroforesis la banda de 26 pb no se visualiza; pero esto no es importante para la interpretación de los resultados con vista al diagnóstico molecular, pues 26 pb debe aparecer en todas las posibles combinaciones genotípicas.

La mutación motivo de estudio es el producto de la sustitución del nucleótido G por A en la posición 1205 del gen IDUA. Esto provoca la aparición de un codón de terminación temprano en el ARNm. La proteína α -L-iduronidasa que se sintetiza solo posee 402 residuos de aminoácidos, lo que provoca una gran alteración estructural y funcional. La condición de homocigosis para esta mutación está asociada a manifestaciones clínicas extremadamente severas y actividades enzimáticas residuales muy bajas. Paralelamente, los pacientes con genotipos heterocigóticos compuestos que poseen un alelo del tipo p.Trp402Ter han mostrado gran variedad de fenotipos clínicos y de niveles de actividad enzimática. La condición de portador de esta mutación implica actividades relativas en el rango entre 40 y 65 %.^(19, 20)

Todos los pacientes fueron diagnosticados clínicamente como síndrome de Hurler, para lo que se tuvo en cuenta la presencia de hallazgos clínicos característicos de esta enfermedad, la edad temprana de aparición de los síntomas y la severidad del cuadro clínico.^(2,4) Posteriormente, el estudio enzimático de cada paciente arrojó una actividad enzimática relativa muy disminuida (menor del 2 %). En el análisis enzimático de los padres los resultados fueron en el rango de 38-60 % de actividad relativa. Estos resultados son indicativos de la presencia de variantes alélicas que afectan considerablemente la estructura y función de la α L-iduronidasa, como es el caso de la mutación motivo de estudio.^(19,20)

Analizando los resultados obtenidos del estudio molecular, podemos afirmar que los pacientes estudiados por este método resultaron ser homocigóticos para c.1205G>A, lo que corresponde con los bajos niveles de actividad enzimática. La caracterización de los exones 9 de sus padres permitió evidenciar la segregación mendeliana de ambos alelos, tal como se espera de una enfermedad con patrón de herencia autosómico recesivo.⁽⁴⁾

Los resultados obtenidos del procesamiento de las muestras de ADN 10-14 (portadores de p.W402X) nos permiten suponer una condición de homocigosis para esta mutación en sus hijos fallecidos. Si bien es cierto que la imposibilidad de estudiar directamente el genotipo en estos tres pacientes constituye una limitante de este estudio; consideramos que durante el desarrollo de esta investigación se obtuvieron datos que permiten considerar la condición descrita. Además de la similitud en los resultados de actividad enzimática, en los hallazgos clínicos y en la historia natural de estos pacientes con relación a otros estudiados directamente, el modo de herencia autosómico recesivo de esta entidad, y la baja tasa de mutaciones *de novo* reportada para el gen IDUA, aportan elementos suficientes como para avalar nuestra interpretación.

Teniendo en cuenta que todas las muestras de ADN analizadas en esta investigación poseen la mutación p.W402X, nos permitimos asegurar que esta mutación es la responsable de la aparición de la MPS IH en las familias estudiadas.

Entre el 2008 y 2018 se diagnosticaron 8 pacientes con MPS IH, en seis de ellos se plantea una condición de homocigocis para p.Trp402Ter; lo que nos permite afirmar que esta mutación es la responsable de la enfermedad en el 75 % de los casos diagnosticados con MPS IH en Cuba durante ese periodo. Lo que no descarta la presencia de esta mutación en los otros casos diagnosticados.

Al comparar ese resultado con lo reportado internacionalmente (35-56 % de frecuencia) podemos plantear que, al igual que en países de América y Europa, esta mutación es la de mayor frecuencia en Cuba. Sin embargo, ninguno de los reportes realizados describen una frecuencia tan alta de este alelo y de pacientes homocigóticos diagnosticados en un periodo de tiempo determinado. [\(8,9,10,11,12,21\)](#)

Teniendo en cuenta la limitante de esta investigación de no poder caracterizar molecularmente a todos los pacientes cubanos con diagnóstico clínico y bioquímico de MPS IH; los autores de esta investigación consideramos que no tenemos suficientes evidencias como para determinar la frecuencia alélica de esta mutación en el país. De cualquier manera, consideramos por los resultados de esta investigación, que p.W402X es una mutación muy frecuente en el gen IDUA de pacientes cubanos con Síndrome de Hurler.

Concluyendo, esta investigación permitió estandarizar una técnica de PCR-RFLP para la detección de la mutación p.W402X del gen IDUA en el Centro Nacional de Genética. Además, permite sugerir que p.W402X es la mutación que con mayor frecuencia está presente en los pacientes cubanos con MPS IH. El procedimiento analítico introducido será muy útil para determinar datos de epidemiología genética relacionados con las MPS I en Cuba. Finalmente, más allá de ser el primer estudio de caracterización molecular de estos pacientes realizado en Cuba; pensamos que el mayor aporte de este investigación es el poner a disposición del Sistema Nacional de Salud una técnica efectiva para el diagnóstico molecular de MPS IH en el país, tanto en etapa prenatal como posnatal.

Agradecimientos

Quisiéramos agradecer a todos pacientes y familiares que participaron voluntariamente en este estudio, por su disposición a colaborar en todo momento, a pesar de cualquier contratiempo. A los trabajadores de la red nacional de genética médica, que contribuyeron a la localización y envío de las muestras biológicas. De manera muy especial, a las profesoras Belen Pérez Rodríguez y Celia Pérez-Cerdá Silvestre, del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de España, por la contribución personal y de su centro en este investigación. A los investigadores del consultorio de neurometabolismo “Dr. N. A. Chamoles” de Argentina.

A la doctoras Alina García García, Norma de León Ojeda y Maylin Gil Riquenes, que si bien no pudieron ser consideradas como autoras de este artículo, su contribución en la identificación y caracterización clínico-genética de los pacientes estudiados fue el motor impulsor de esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. En: Scriver C, Beaudet A, Sly W. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw Hill; 2007.p. 3421-52.
2. Baldellou A, Sanjurjo P, del Toro M. Enfermedades Lisosomales. En: Sanjurjo P y Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4.^a Edición. Madrid: Editorial Ergón; 2014. P. 861-95.
3. Dalmau J, Vitoria I, del Toro M. Mucopolisacaridosis tipo I. En Colectivo de autores. Guía para el manejo de las MPS. Madrid: Editorial Ergon; 2015. p 7-19.
4. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) [acceso 03/12/2018]. Disponible en: <http://omim.org/>
5. Hurler Gertrud. Übereinen Typmultipler Abartungen, vorwieg end am Skelettsystem. Z Kinderheilk. 1919;24:220-34.
6. Bach G, Friedman R, Weissmann B and Neufeld EF. The defect in Hurler and Scheie Syndromes: Deficiency of alpha-L-iduronidase. Proc Natl Acad Sci USA. 1972 [acceso 16/06/2017];69(8):2048-51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC426865/>
7. Scott HS, Guo XH, Hopwood JJ, and Morris CP. Structure and sequence of the human α -L-Iduronidase gene. Genomics. 1992 [acceso 16/06/2017];13(4):1311-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMID1505961/>
8. Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Zuther C, Morris CP, *et al.* Mucopolysaccharidosis type I: Identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common alpha-L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients. Hum. Mol. Genet. 1994[acceso 21/09/2017];3(6):861-6. Disponible en: <https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/3/6/861/594316>
9. Gort L, Chabas A, Coll MJ. Analyses of five mutations in 20 Mucopolysaccharidoses type I patients: high prevalence of the W402X mutation. Hum. Mutat. 1998[acceso

- 27/09/2017];11(4):332-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215409>
10. Beesley CE, Meaney CA, Greenland G, Adams V, ellodi A, Young EP, *et al.* Mutational analyses of 85 mucopolysaccharidoses type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum. Genet.* 2001[acceso 18/10/2017];109(5):03-511. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004390100606>
 11. Pineda T, Marie S, Gonzalez J, García AL, Acosta A, Morales M, *et al.* Genotypic and bioinformatic evaluation of the alpha L iduronidase gene and protein in patients with mucopolysaccharidoses type I from Colombia, Ecuador y Perú. *Molecular Genetics and Metabolic Reports.* 2014[acceso 18/10/2017];1:468-473. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5121354/>
 12. Scott HS, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP. A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Hum Mutat.* 1992 [acceso 20/11/2017];1:103-108. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1301196>
 13. Clarke LA, Nelson PV, Warrington CL, Morris CP, Hopwood JJ and Scott HS. Mutation analysis of 19 North American mucopolysaccharidosis type I patients: Identification of two additional frequent mutations. *Hum Mutat.* 1994[acceso 22/02/2018];3:275-282. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/humu.1380030316>
 14. Declaración de Helsinki-AMM. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 64.^a Asamblea General. Asociación Médica Mundial. Octubre 2013. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/recursos/helsinki.pdf>
 15. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 [acceso 22 marzo 2017];230(4732):1350-4. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/230/4732/1350.long>
 16. Haig H. Kazazian Jr. Use of PCR in the Diagnosis of Monogenic Disease. In *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification.* Ed Henry A. Erlich Springer Nature. 2018; p.153-69
 17. Randall K. Saiki. The desing and optimization of the PCR IN PCR technology. *Principles and Applications for DNA Amplification.* Ed Henry A. Erlich Springer Nature. 2018; p153-169
 18. Taq PCR Handbook. 3^{er} Ed. 2010 [acceso 22/12/2018]. Disponible en <http://www.qiagen.com>

19. Terlatto NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidoses type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. Genet Med. 2003[acceso 06/042018];5(4):286-94. Disponible en: <https://insights.ovid.com/article/00125817-200307000-00004>
20. Kingma SD, Langereis EJ, de Klerk CM, Zoetekouw I, Wagemans T, Ijst I, *et al.* An algorithm to predict phenotypic severity in mucopolysaccharidoses type I in the first month of life. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2013 [acceso 06/04/2018];8:99-110. Disponible en: <http://www.ojrd.com/content/8/1/99>
21. Menéndez Sainz MA. Diagnóstico enzimático de las enfermedades de almacenamiento lisosomal. Experiencia de 20 años. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias]. La Habana: Universidad de Ciencias Médicas de La Habana; 2011.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Tatiana Acosta Sánchez: Jefa del proyecto de investigación, diseño de la investigación, análisis de datos y escritura del manuscrito. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Mercedes Arceo Álvarez: Diseño del procedimiento analítico, obtención de datos primarios, escritura del documento. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Teresa Collazo Mesa: Diseño del procedimiento analítico, análisis de datos primarios. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Liset Rodríguez Muñoz: Diseño de la investigación, búsqueda activa de pacientes, obtención y análisis de datos primarios. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Laritza Martínez Rey: Diseño de la investigación, búsqueda activa de pacientes. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Yadira Hernández Pérez: Diseño del procedimiento analítico, análisis de datos primarios. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Lazara Emma Larrinaga Vicente: Diseño del procedimiento analítico, análisis de datos primarios. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Lilia Marín Padrón: Diseño del procedimiento analítico, análisis de datos primarios. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.

Alejandro Esperón Álvarez: Diseño de procedimiento analítico y obtención d datos primarios. Revisó y aprobó la versión del manuscrito.