



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DR. RUBÉN LISKER**

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA E IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES PATOGENICAS**  
**EN 19 CASOS CON SINDROME DE WOLFRAM**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA:**  
**ESTEFANIA ISAY MARTÍNEZ ACOSTA**

**TUTOR:**  
**DR. OSVALDO MAXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ**

**COTUTOR:**  
**QFB. MARIA AURELIA LÓPEZ HERNÁNDEZ**

**CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2020**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

¿No es una molécula de ADN garantía de inmortalidad? Ella es -le decía a Descartes poco antes de morir- la célula monárquica por excelencia. Cada una de las dos mitades está exactamente unida a la otra mitad, de la misma manera que Gala estaba unida a mí.

**Salvador Dalí**



# Agradecimientos

A la vida, por sus increíbles coincidencias, y por el reordenamiento de cuerdas que me permitió llegar a esta ciudad; y poder introducirme a este mundo abstracto y maravilloso, como cuadro de Kandinsky, que es la genética.

A la familia, que a pesar de estar a 220 kilómetros de distancia (dato corroborado), el apoyo y las buenas vibras nunca se sintieron lejos; a Arturo, que me enseñó que la formalidad no está peleada con la creatividad y que los libros son el mejor refugio para las malas jugadas; a Trinidad que me enseñó a ser fuerte y práctica y me heredó la sonrisa franca; a la Gaby, la hermana mayor, que con esa energía que desborda, me contagió las ganas de hacer y saber muchas muchas cosas. Por permitirme recorrer con ustedes un poquito (o un bastante) del mundo, entre eso, probar agua sucia en Bombay en manos de un desconocido, o maravillarnos los ojos y el olfato ante la encantada Constantinopla.

A los amigos, esos con los que echo mezcales, con los que río, bailo, y vocifero; los cómplices con los que nos desbordamos en palabrerías (muchas de ellas groserías), para que las noches terminen en conversaciones filosóficas, ciclos lunares y obras de Asimov. A Aaron por ayudarme a que la tesis tenga buena facha. A las chicas de danza, por enseñarme a coordinar el corazón con el tambor, a que la cabeza también se baila, y que la vida es corta y grata.

A los camaradas residentes, resilentes y resistentes; que están y que estuvieron, a los que nos une esta incertidumbre grata de querer saber más allá de lo cotidiano; les agradezco las reuniones secretas en el cuartito, las miradas de complicidad en los seminarios, las chelas del tallercito. Gracias por las lecciones de historia, las pláticas del Valle de Guadalupe, las recomendaciones de música y por compartir un poquito de sus vidas conmigo. A la Yun, por acompañarme con un pulque de tuna bajo la lluviosa Teotihuacan.

A los que están del otro lado del pasillo, entre pipetas y cromosomas deshidratados. Con especial cariño a Beatriz, Luis, María y Yevyenia, por recibirme con una sonrisa, enseñarme a usar programas modeladores de proteínas, compartir su conocimiento y platicarme la historia de Ucrania.

A Leonora por explicarme las pruebas no paramétricas, aun cuando ya las debía de conocer, a Adolfo por guíarme en la búsqueda de bases de datos. A Miriam y Vero, por ser las mamás que te preguntan cómo sigues después de un resfriado; por tejerme a Mercedes. Al doctor Morales, por convidarnos de los regalos de sus pacientes, por ser el que dice lo que nadie mas se anima a decir.

Y finalmente al jefe de este H. departamento, el Dr. Mutchinick, por enseñarme, de una manera no intencionada, que aun probando naranjas en Valencia o un Pinot Noir en Francia, uno siempre añorara los alfajores a la vuelta de la casa.





## ABREVIATURAS

Aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

AO: atrofia óptica

ARN: ácido ribonucleico

BIP: proteínas de unión a inmunoglobulinas

D: delección/deletion

DIDMOAD: diabetes insípida, diabetes mellitus, atrofia óptica e hipoacusia

DI: diabetes insípida

DM: diabetes mellitus

ddNTPs: dideoxinucleótidos

dNTPs: 2-deoxinucleótidos

END: endocrinológicas

ERAD: degradación asociado al retículo endoplásmico

ERG: electrorretinografía

F: corrimiento marco de lectura/frameshift

HFA: hipoacusia de alta frecuencia

HN: hipoacusia neurosensorial

IP3R: receptor inositol 1,4,5-trifosfato

IS: intento suicida

M: sentido erróneo/missence

MAM: membranas asociadas a mitocondria

NEU: neurológicas

PC2: enzima convertidora de prohormonas

PCR: reacción de cadena de polimerasa

PDI: proteínas isómeras disulfido

PM: personalidad múltiple

PS: psiquiátricas

RDNP: retinopatía diabética no proliferativa

RE: retículo endoplásmico

**RMI:** resonancia magnética

**S:** corte y empalme/Splicing

**SERCA:** ATP-asa sarco/endoplásmica del retículo

**SII:** índice de inteligibilidad de lenguaje

**SW:** síndrome de Wolfram

**SX:** síndrome

**TAG:** trastorno de ansiedad generalizada

**TDM:** trastorno depresivo mayor

**TRAF2:** (factor 2 asociado a receptores TNF)

**VD:** densidad de los vasos

**VNEU:** vejiga neurogénica

**WL:** síndrome de Wolfram-like

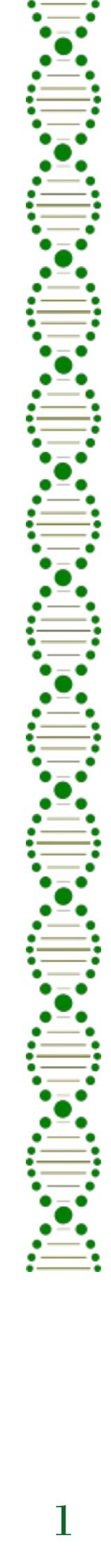


# INDICE

1	<b>Marco teórico</b> .....	1
1.1	Definición .....	1
1.2	Antecedentes Históricos .....	2
1.3	Prevalencia .....	4
1.4	Biología molecular.....	5
1.4.1	Gen <i>WFS1</i> .....	5
1.4.2	Proteína Wolframina .....	7
1.4.3	Vías moleculares de la Wolframina .....	9
1.4.4	Respuesta a proteínas mal plegadas .....	10
1.4.5	Respuesta a proteínas mal plegadas terminal.....	12
1.4.6	<i>WFS1</i> en la vía de respuesta a proteínas mal plegadas .....	13
1.4.7	<i>WFS1</i> y la homeostasis del calcio .....	14
1.4.8	<i>WFS1</i> e interacciones mitocondriales .....	15
1.4.9	Estudios experimentales con <i>WFS1</i> .....	16
1.5	Manifestaciones clínicas .....	18
1.5.1	Diabetes Mellitus.....	18
1.5.2	Atrofia Óptica.....	20
1.5.3	Hipoacusia neurosensorial .....	23
1.5.4	Diabetes Insípida.....	25
1.5.5	Manifestaciones psiquiátricas.....	26
1.5.6	Manifestaciones neurológicas .....	27
1.5.7	Manifestaciones urológicas.....	32
1.5.8	Manifestaciones endocrinológicas.....	32
1.5.9	Manifestaciones gastrointestinales .....	33
1.5.10	Otras manifestaciones.....	33
1.6	Mortalidad .....	33
1.7	Síndrome de Wolfram en México .....	34
1.8	Síndrome de Wolfram-like .....	36
1.9	Diagnósticos diferenciales .....	37
1.10	Correlación fenotipo-genotipo .....	39
1.11	<i>WFS1</i> asociado a otros diagnósticos .....	42

2	<b>Planteamiento del problema y justificación</b> .....	43
3	<b>Objetivos</b> .....	44
4	<b>Material y métodos</b> .....	45
	4.1 Diseño del estudio .....	45
	4.2 Población de estudio .....	45
	4.3 Tamaño de la muestra .....	45
	4.4 Criterios de selección .....	46
	4.5 Variables .....	47
	4.6 Análisis estadístico .....	48
	4.7 Procedimiento de laboratorio y técnicas moleculares .....	48
	4.7.1 Toma de muestra sanguínea.....	48
	4.7.2 Extracción de ADN de leucocitos de sangre periférica .....	48
	4.7.3 Amplificación de los fragmentos del gen <i>WFS1</i> .....	49
	4.7.4 Evaluación y purificación de los fragmentos amplificados ..	50
	4.7.5 Secuenciación directa del gen <i>WFS1</i> .....	51
	4.7.6 Purificación de los productos de la reacción de secuencia ..	52
	4.7.7 Análisis de los productos mediante electroforesis .....	52
	4.7.8 Identificación de mutaciones y análisis .....	52
5	<b>Resultados</b> .....	53
	5.1 Resultados análisis clínico .....	53
	5.2 Resultado de biología molecular .....	68
6	<b>Discusión</b> .....	79
7	<b>Conclusiones</b> .....	86
8	<b>Bibliografía</b> .....	87
9	<b>Anexos</b> .....	95





## 1. Marco teórico

### 1.1. Definición

El síndrome de Wolfram (WFS; OMIM 222300) es una entidad genética con un modo de herencia autosómico recesivo, caracterizada por la asociación de diabetes mellitus de aparición temprana y atrofia de nervio óptico. Posterior a su primera descripción por Wolfram y Wegener (1938), se expandió el espectro fenotípico, acuñándose el acrónimo DIDMOAD (diabetes insípida, diabetes mellitus, atrofia óptica e hipoacusia). Se considera una enfermedad neurodegenerativa, que afecta los componentes del sistema nervioso, tanto central, periférico y neuroendocrino.



## 1.2 Antecedentes Históricos

El síndrome de Wolfram fue descrito por primera vez en 1938 por Wolfram y Wagener, quienes reportaron una familia con una hermandad de cuatro sujetos afectados por diabetes mellitus de inicio temprano y atrofia de nervio óptico. Algunos de estos pacientes desarrollaron hipoacusia y síntomas neurológicos, como ataxia y nistagmus. A partir de esta primera descripción, diversos autores comenzaron la publicación de reportes de casos. Dada la similitud de síntomas y el componente multisistémico, se llegó a considerar que su etiología era por mutaciones en el genoma mitocondrial.

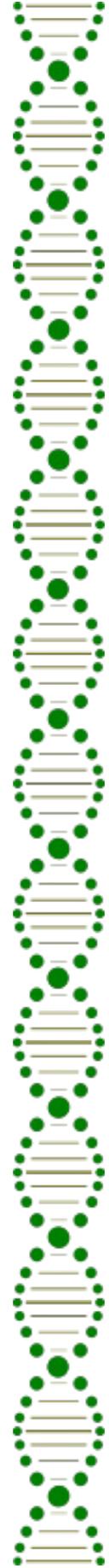
En 1995 Barret et al, realizaron la primera descripción clínica detallada, en una cohorte de 45 pacientes del Reino Unido; utilizaron como criterios de reclutamiento, la conjunción de diabetes mellitus de aparición temprana (<30 años) y atrofia óptica bilateral. Determinaron que los criterios diagnósticos mínimos para la entidad eran: diabetes mellitus tipo 1 y atrofia de nervio óptico; además realizaron una descripción detallada de la historia natural de la enfermedad. Reportaron que la diabetes y la atrofia óptica, son las primeras manifestaciones en presentarse (primera década de la vida), posteriormente se añade diabetes insípida e hipoacusia neurosensorial en la segunda década, alteraciones genitourinarias en la tercera y manifestaciones neurológicas en la cuarta. El 53% de su cohorte cumplía las cuatro características clásicas de la entidad (DIDMOAD); por otro lado, reportaron una mortalidad del 60% a los 30 años, secundario a coma hipoglucémico, insuficiencia respiratoria central, enfermedad renal y suicidio.

Polymeropoulos et al. (1994) mediante análisis de ligamiento en 11 familias con al menos dos individuos afectados con diabetes mellitus y atrofia óptica bilateral, demostraron el carácter recesivo de la entidad, así como la localización de la región candidata (WFS) en el brazo corto del cromosoma 4. Estos datos fueron confirmados posteriormente por Collier y colaboradores (1996), con un LOD score de 7.1 en el intervalo entre los marcadores de microsatélites D4S431 y D4S394.



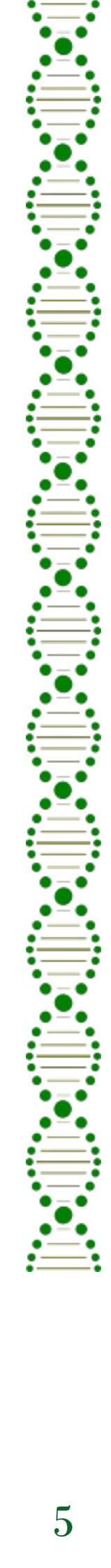
Inoue et al. (1998), mediante análisis de genes candidato en la región WFS, identifican por primera vez el gen causante de la entidad, al cual nombraron *WFS1*; Determinaron la estructura genómica de *WFS1*, la cual consiste en 8 exones y una expansión de 33.4 kb del DNA genómico. Asimismo, realizan la descripción de las primeras siete mutaciones, todas localizadas en el exón 8, en 6 familias con diagnóstico clínico de síndrome de Wolfram. También realizaron análisis de expresión en *WFS1*, los cuales revelaron altos niveles de actividad en islotes pancreáticos, este hallazgo, brindó la primera pauta para explicar la diabetes mellitus de inicio temprano como una manifestación clínica.

En el mismo año Strom y colaboradores (1998), realizaron análisis de ligamiento en la región WFS y la selección de genes candidato en 12 familias con diagnóstico clínico de síndrome de Wolfram, arribando a una descripción similar a la de Inoue et al. Reportaron un nuevo gen localizado en 4p16.3, el cual codifica para una proteína transmembranal, a la que denominaron “wolframina”. Se incluyeron a 12 familias, de los cuales, los casos, presentaron mutaciones que conllevan a la disrupción de la secuencia o estructura proteica, asociando de este forma, que mutaciones en *WFS1* eran las causantes del síndrome de Wolfram.



## 1.3 Prevalencia

La prevalencia estimada para el síndrome de Wolfram en Reino Unido fue de 1 en 770 000, con un intervalo de confianza del 95% (1/714000 - 1/830 000), y una frecuencia de portador de 1 en 354; esto basado en la identificación de todos los pacientes vivos con síndrome de Wolfram, en dos regiones de Reino Unido con una población total de 10,022,620 (Barret et al. 1995). En el estudio de Fraser y Gun (1977) se estimó una prevalencia de 1/100 000 en población de Norteamérica, tomando en cuenta la ocurrencia de 1/175 casos de atrofia óptica asociada a diabetes juvenil. Royahem y colaboradores (2011) estimaron una prevalencia en personas mayores de 21 años con diagnóstico de diabetes mellitus de 1 en 500 000; mientras que, en personas menores de esta edad, de 1 en 730 casos.



## 1.4 Biología molecular

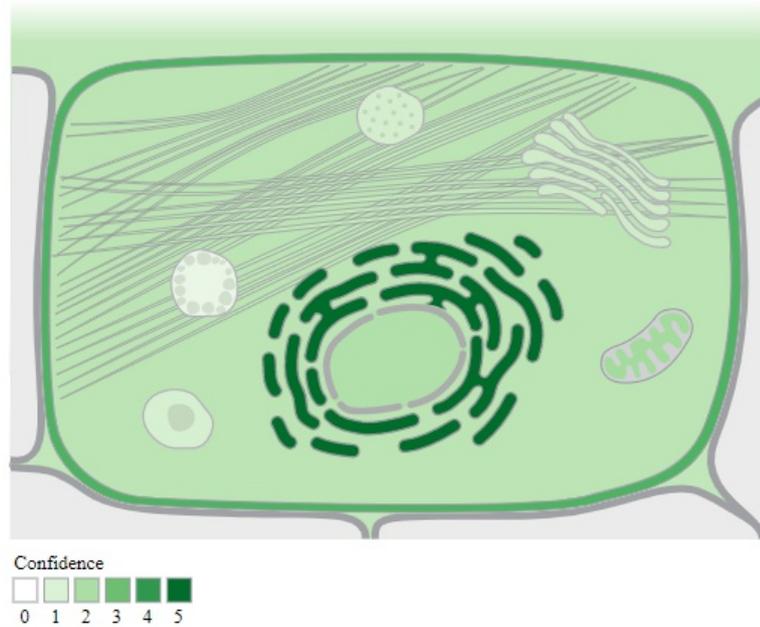
### 1.4.1 Gen *WFS1*

*WFS1* se encuentra localizado en 4p16.1 (chr4:6,269,849-6,303,265 GRCh38/hg38), se han descrito seis transcritos y 249 ortólogos. Dentro de los transcritos, tres de ellos culminan en un producto proteico. El primer transcrito, de 3640 pb, contiene 8 exones, codifica para una proteína de 890 aa, tiene 43 dominios y 12736 variantes alélicas reportadas; el segundo transcrito, de 3255 pb, contiene 8 exones, codifica para una proteína de 890 aa, posee 43 dominios, 12561 variantes alélicas; finalmente, el tercer transcrito de 755 pb, consta de 5 exones, codifica para una proteína de 252 aa, contiene 11 dominios y se han reportado 4843 variantes alélicas.

De ahora en adelante, al referirnos al gen *WFS1*, se tratará del primer transcrito descrito. *WFS1* codifica para una proteína transmembrana, localizada en el retículo endoplásmico preferentemente, aunque también se ha visto asociada a membranas de vesículas sinápticas y dendritas.

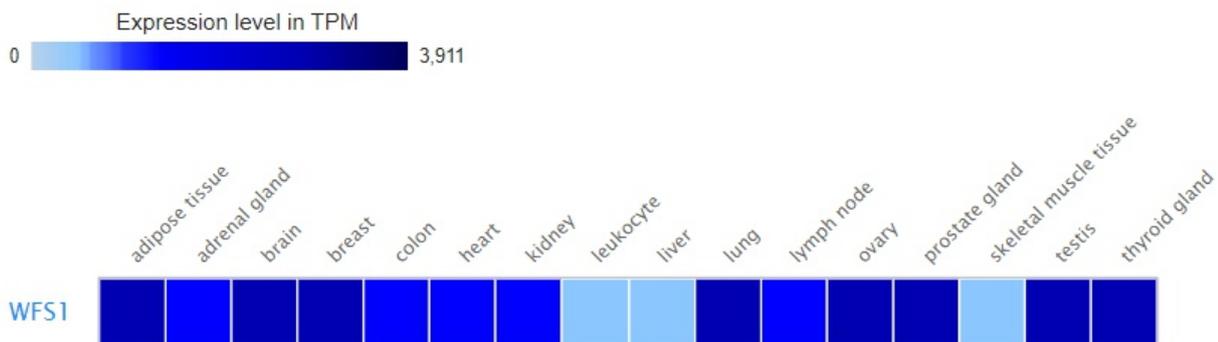
Tabla 1. Localizaciones de wolframina en distintos espacios celulares. GeneCards

Región	Fuente	Confianza
Membrana retículo endoplásmico	5/5	UniProtKB
Componentes integrales de membrana del RE	4/5	BHF-UCL
Dendrita	3/5	BHL-UCL
Componente integral de membrana de vesícula sináptica	3/5	Ensembl



**Fig. 1. Localización preferencial de la wolframina en los distintos compartimentos celulares (Gene Cards). Su expresión es ubicua, con altos niveles en cerebro, páncreas, corazón y células beta de los islotes de Langerhans (Takeda, 2001).**

Inoe y colaboradores, al realizar análisis de expresión, registraron que las células de los islotes de páncreas mostraban altos niveles, actualmente se sabe, que la actividad de *WFS1* es tejido dependiente, a continuación, se muestra los niveles en distintos tejidos.



**Fig. 2. Niveles de expresión de RNA de WFS1, en 16 tejidos humanos. Siendo el azul claro la expresión más baja y azul marino la más alta (Illumina Body Map)**



## 1.4.2 Proteína Wolframina

La wolframina (Strom, 1998), es una glicoproteína de membrana sensible a la endoglicosidasa H; comprende de 890 aminoácidos, con una masa molecular de 100292 Da. Predictores de estructura secundaria, identificaron tres dominios estructurales: un dominio central hidrofóbico que comprende de 9 segmentos transmembrana, flanqueados por un dominio hidrofílico en su porción N-terminal, el cual se localiza en el citoplasma, y otro dominio también hidrofílico en la región carboxi-terminal, localizado en el lumen del retículo endoplásmico.

Las modificaciones postraduccionales de esta proteína fueron descritas por Hofmann y colaboradores (2003), quienes describieron cinco sitios ligados a glicosilación asociada a asparagina en N28, N335, N500, N661 y N746. Estos sitios están conservados en humano y modelo murino. Para ser funcionales, estos sitios potenciales de glicosilación, tienen que ser expuestos a la región del lumen del retículo endoplásmico, y el tamaño de la horquilla hidrofílica tiene que tener al menos 33 residuos de aminoácidos. Se considera que este cambio postraduccional en la wolframina, le confiere estabilidad, e incrementa su vida media, la cual es de dos días aproximadamente.

En modelos murinos donde se disruptía el proceso de glicosilación, se observó que la vida media de la proteína disminuía considerablemente. Además de este proceso postraduccional, Hofmann et al. describieron que la wolframina crea complejos moleculares de aproximadamente 400 kDa, mediante oligomerización; esto de manera fisiológica. A continuación, se muestra modelo bidimensional de la posible estructura de la proteína.

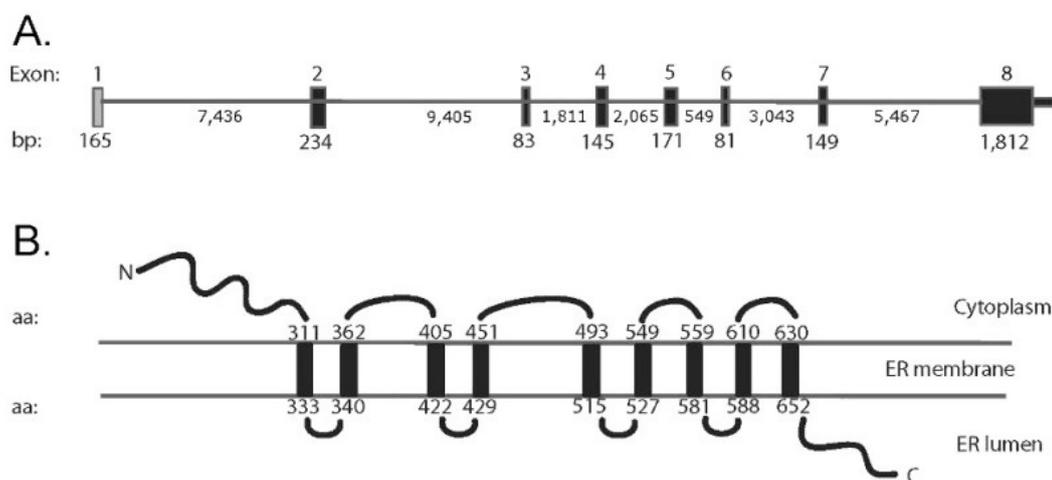
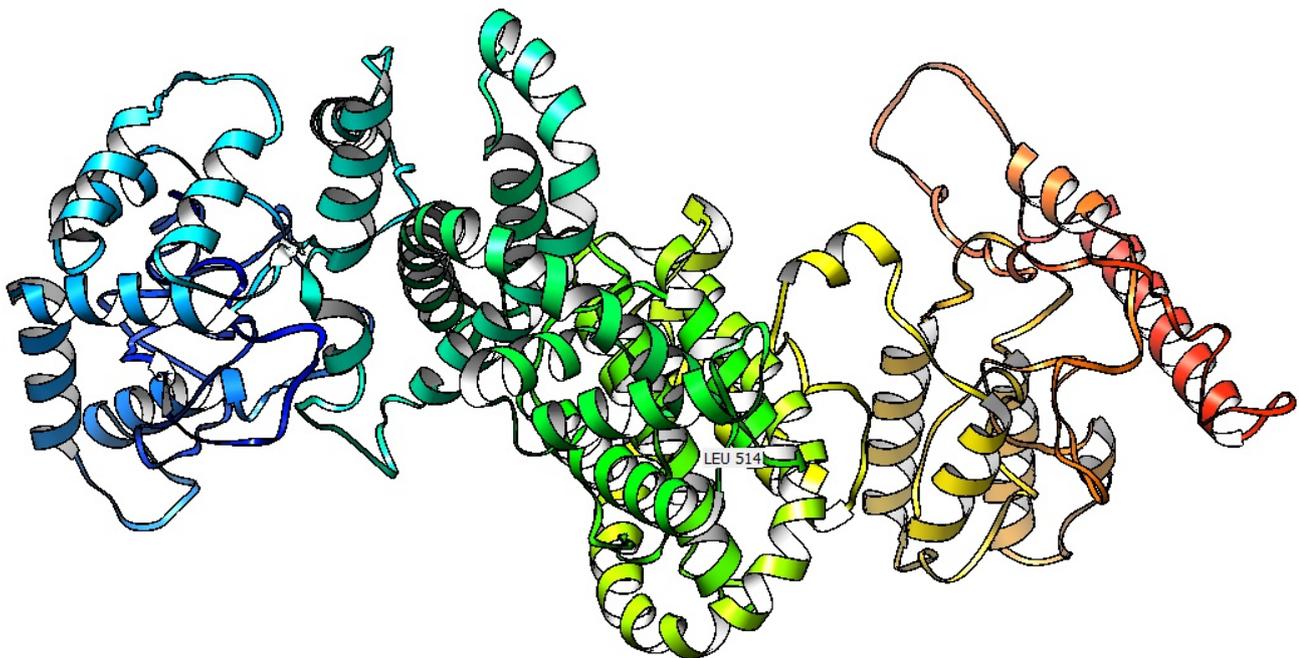


Fig. 3. Estructura del gen *WFS1*, el intrón 1 es no codificante. B. Estructura de dominios de la wolframina. Imagen tomada de *genereviews*.

En 2011, Xing Guo y colaboradores, mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta evidenciaron que tanto la región N como C terminal, interactuaban con Smurf1, una ubiquitina ligasa E3, de la familia HECT. La interacción en la región C-terminal, resulta llamativa, ya que implicaría que *WFS1* podría ser degradada por proteínas Smurf recién sintetizadas, las cuales se encuentran dispersas en el lumen del RE. Mediante distintos niveles de expresión de Smurf1, observaron que la cantidad de wolframina (no así de su ARN mensajero), era inversamente proporcional a los niveles de expresión de la ubiquitina ligasa, con estos datos, concluyeron, que Smurf1 actúa como una ligasa E3 para *WFS1*, promoviendo su ubiquitinación y degradación.

La estructura de esta proteína no se encuentra dilucidada mediante estudios de cristalografía, así que, mediante el predictor proteico STRUM, obtuvimos un modelo predictivo acorde a la secuencia de referencia, la cual se muestran a continuación.



**Fig. 4. Predicción estructura terciaria de la wolframina. STRUMM**



### 1.4.3 Vías moleculares de la wolframina

En cuanto a las funciones de la wolframina, no se encuentran del todo dilucidadas; pero se ha aludido su participación en distintas vías moleculares, como son:

1. Regulación del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)
2. Modificación postraduccional de proteínas
3. Regulación de homeostasis celular de calcio
4. Respuesta a proteínas no plegadas

Es importante recordar que el retículo endoplásmico (RE) es un organelo esencial en la supervivencia celular, ya que regula la síntesis, plegamiento y procesamiento de alrededor un tercio de las proteínas celulares; además de ser una fuente importante de almacenamiento de iones de calcio. Las proteínas cuyo destino es el RE, presentan una secuencia peptídica que las dirige hacia su membrana, esta secuencia es removida por una proteasa, generalmente previo a que la traducción del péptido termine. Una vez en el lumen del RE, las proteínas son plegadas en su forma tridimensional y son sometidas a modificaciones postraduccionales como glicosilación o formación de puentes disulfuro, este proceso es realizado por una maquinaria compuesta por chaperonas, enzimas de glicosilación y oxido-reductasas, además, comparado con el citosol, el RE mantiene una concentración elevada de calcio y mayor potencial de óxido reducción, convirtiéndolo en un medio óptimo para este proceso.

Este complejo sistema de procesamiento asegura que las proteínas que serán secretadas, tengan un correcto plegamiento, modificaciones y ensamblajes en complejos multiproteicos; antes de continuar su viaje hacia las vías secretoras. El plegamiento incorrecto o incompleto de proteínas no es tolerado por la célula, por lo que desarrollaron un estricto sistema de control llamado degradación asociado al retículo endoplásmico (ERAD), las células mal plegadas serán regresadas al citosol para su posterior ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S.

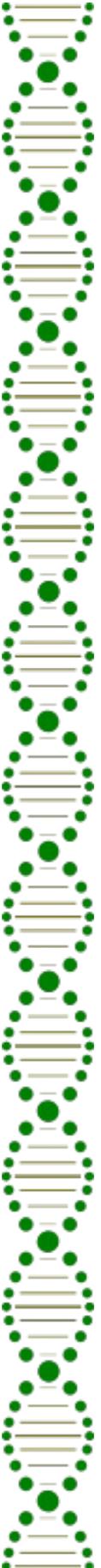
La capacidad de plegamiento del RE varía dependiendo del tipo celular, por ejemplo, células con una función secretora tienen un RE más grande y desarrollado, un claro ejemplo de esto, son las células beta del páncreas, quienes son capaces de sintetizar y secretar cerca de un millón de moléculas de insulina por minuto, y en estados de resistencia a la insulina, esta capacidad puede incrementar.

El ambiente del RE puede ser fácilmente alterado por procesos como privación de nutrientes, hipoxia, mutaciones puntuales en proteínas secretadas, y alteración en homeostasis del calcio; esto conlleva a que el RE exceda su capacidad de plegamiento, con la posterior acumulación de proteínas mal plegadas en su lumen; condición llamada estrés del retículo endoplásmico. Una vez que la cantidad de proteínas mal plegadas sobrepasan un determinado umbral, se activará una vía de señalización molecular llamada respuesta a proteínas desplegadas (UPR) (Hertz, 2017). Inicialmente esta respuesta mitiga el estrés del RE, y genera proteínas asociadas a la supervivencia celular, tomando en cuenta esta respuesta, la UPR resulta beneficiosa para la célula, sin embargo, bajo condiciones patológicas y una respuesta mantenida o constante, la UPR es incapaz de reducir el estrés, culminando en un daño irreversible celular; con la posterior activación de vías de apoptosis (Pallota et al, 2019).

#### 1.4.4 Respuesta a proteínas mal plegadas

La UPR ha evolucionado hacia el establecimiento de una compleja red de señales interconectadas, las cuales inician con la activación de tres proteínas de señalización localizadas en el retículo endoplásmico: *IRE1 $\alpha$* , *PERK* y *ATF6*. La UPR activa dos eventos celulares temporalmente distintos: inicialmente una reacción para reducir la síntesis de proteínas e incrementar la degradación de aquellas que se encuentren mal plegadas y, en segundo lugar, regular la transcripción de genes asociados con el control de la homeostasis proteica.

Inicialmente, *PERK*, una cinasa transmembrana tipo I, fosforila a eIF2 $\alpha$ , esto inhibe de manera global la traducción proteica, con ello reduce la cantidad de proteínas que ingresan al RE; por otra parte, incrementa la traducción de los RNA mensajeros de *ATF4* y *AATF*, con esto, incrementa la capacidad de plegamiento. *ATF4* induce la transcripción de genes involucrados en metabolismo y transporte de aminoácidos, biosíntesis de glutatión, respuesta antioxidante, pero también de CHOP, quien puede inducir muerte celular al regular la expresión de BIM, miembro de la familia *BCL2*. Por su parte *AATF*, es un factor anti-apoptótico.



*IRE1α*, es una proteína transmembrana, con actividad cinasa serina/treonina y un dominio endoribonucleasa en su cara citosólica. *IRE1α* se autofosforila, con lo cual sufre un cambio conformacional, que activa su dominio RNAasa, esto cataliza una modificación de corte y empalme en el transcrito de *XBP1*, a este nuevo transcrito se le denomina *XBP1s*; el cual posee mayor estabilidad y actividad.

Este factor de transcripción transloca al núcleo, y activa genes implicados en la UPR, incluyendo componentes de asistencia en degradación del retículo endoplásmico (ERAD); así como BIP (proteínas de unión a inmunoglobulinas) y PDI (proteínas isómeras disulfido); con estas activaciones se pretende restaurar la homeostasis y promover la citoprotección.

Bajo condiciones patológicas, *IRE1α* presenta hipereactividad, activando vías apoptóticas, al reclutar a TRAF2 (factor 2 asociado a receptores TNF) y fosforilar a *ASK1* (cinasa reguladora de señalización de apoptosis). *ASK1*, a su vez, fosforila a JKK quien regula a BCL para la inducción de apoptosis.

*ATF6α*, el tercer iniciador de la UPR, es una proteína transmembrana, que contiene un factor de transcripción bZIP en su dominio citosólico. Esta proteína transloca al aparato de Golgi, donde las proteasas S1P y S2P liberan su dominio citosólico (*ATF6f*), que a su vez transloca al núcleo, donde activa diversos genes cuyos productos están involucrados en la homeostasis del RE. Sin embargo, su hiperactivación, puede conllevar a factores proapoptóticos.

En mamíferos, la chaperona BiP/Grp78 juega un papel fundamental en la activación de las tres vías descritas previamente, BiP se asocia con el dominio luminal de *PERK* e *IRE1α*, manteniéndolas en su estado inactivo monomérico; por otro lado, se unen a proteínas mal plegadas mediante sus dominios de unión substratos.

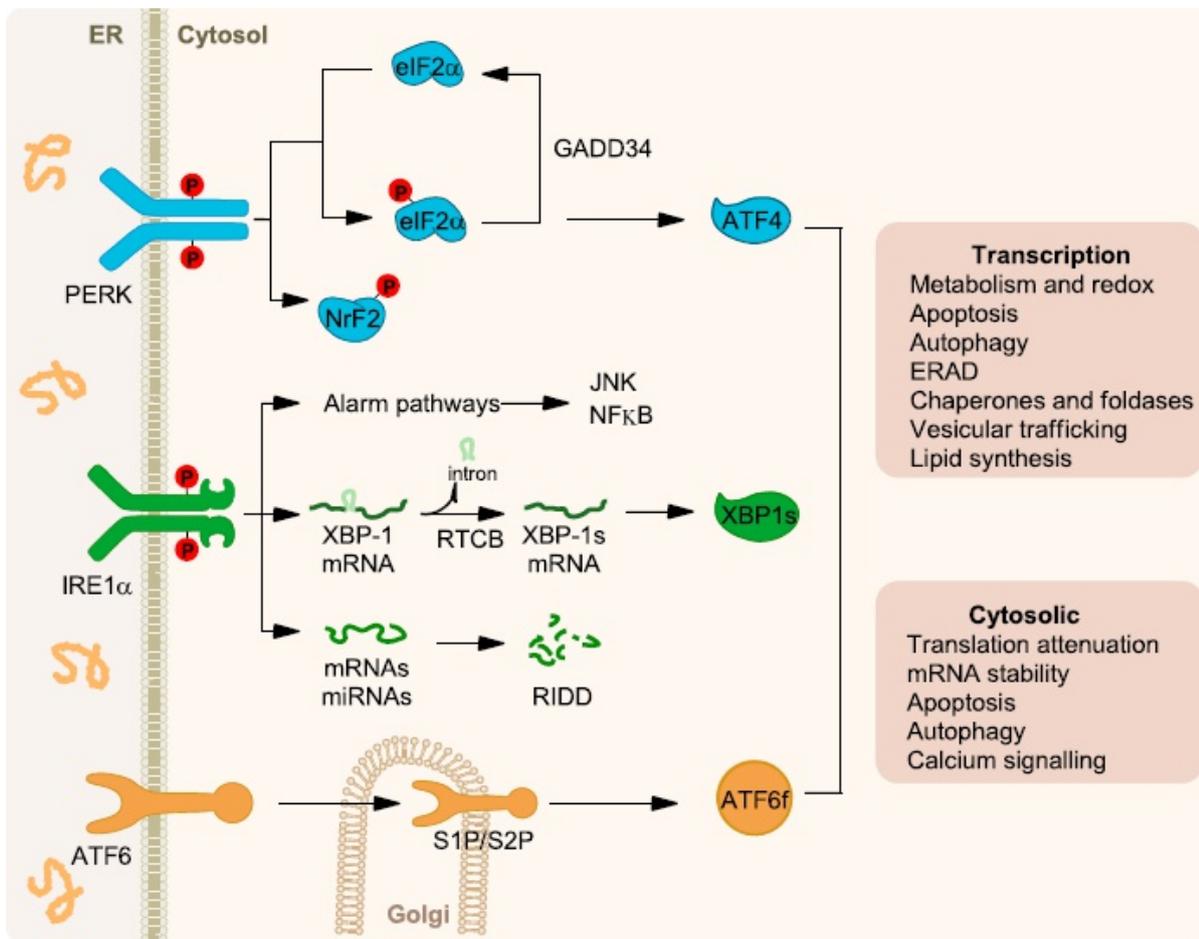


Fig. 5. Principales vías moleculares implicadas en la respuesta a proteínas mal plegadas. Hetz et al (2017)

### 1.4.5 Respuesta a proteínas mal plegadas terminal

Como se mencionó previamente, si existe una activación mantenida de la vía de respuesta al estrés, ésta tomará otro camino, llamada respuesta a proteínas mal plegadas terminal. En las que, a través de la activación de distintas moléculas, culminará con la activación de la vía intrínseca de apoptosis. Esta vía será activada cuando el daño celular conlleve a la expresión o activación postraducciona de una o más proteínas de la familia BCL-2. Al menos cuatro distintas de estas proteínas (BID, BIM, NOXA y PUMA) se activan durante la UPR terminal. Una vez activadas, antagonizan el rol de las proteínas anti-apoptóticas, y activan a BAX y BAK, con lo cual permeabilizan la membrana externa mitocondrial. Por otra parte, IRE1 $\alpha$  controla los niveles del mRNA de la caspasa tipo 2, con la posterior activación de BID.

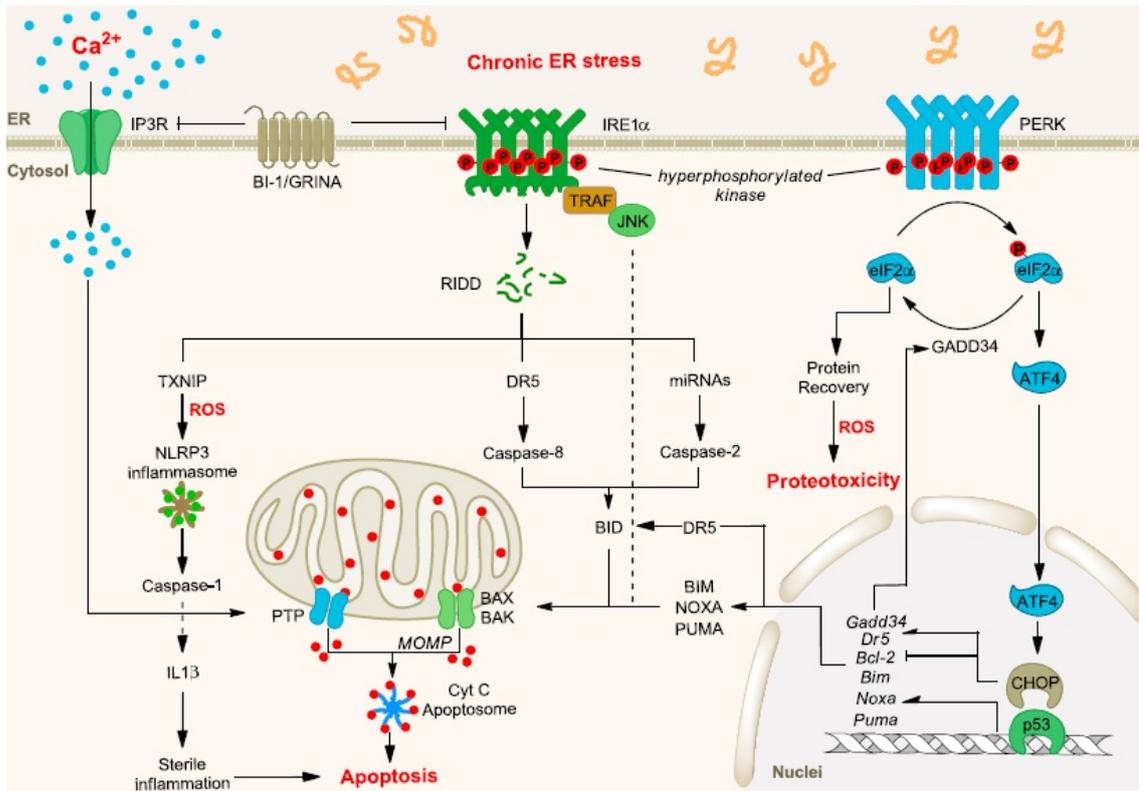
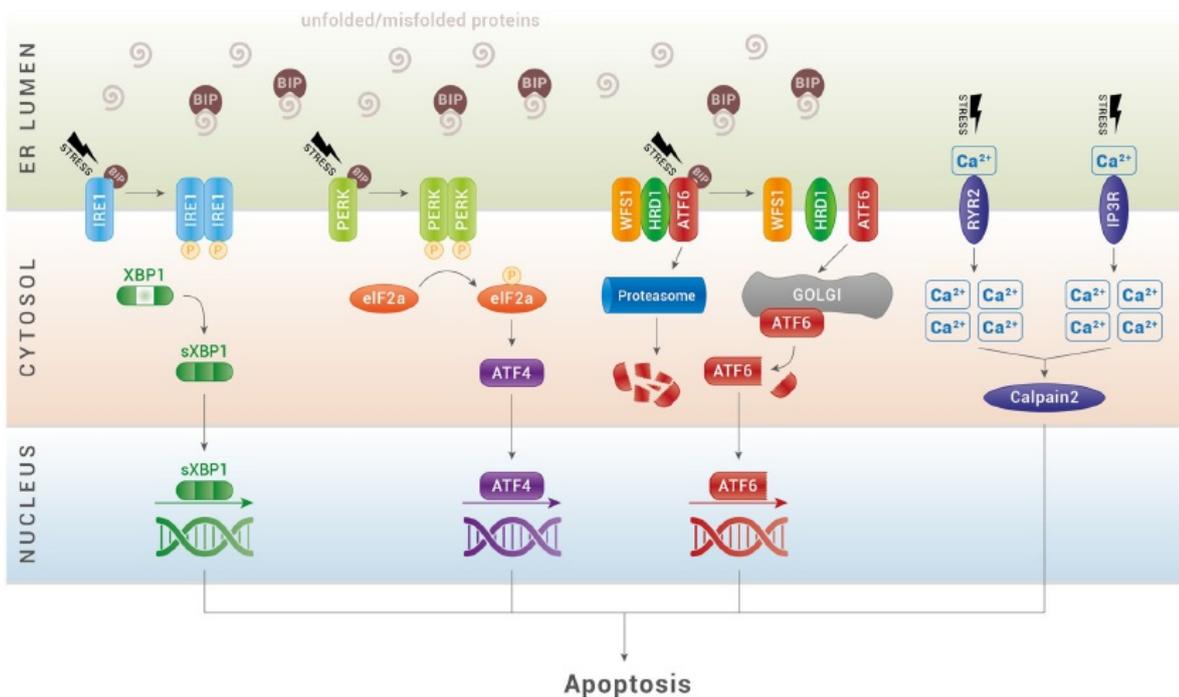


Fig. 6. Respuesta a proteínas mal plegadas terminal. Activación de vía de apoptosis intrínseca. Hetz et al (2017)

### 1.4.6 *WFS1* en la vía de respuesta a proteínas mal plegadas

¿Qué rol juega entonces *WFS1*? Al parecer, es un regulador negativo de la vía UPR. En células sanas, bajo estrés fisiológico, *WFS1* interactúa con la ubiquitina ligasa Hrd1, de la familia RING, este complejo tiene como blanco la degradación proteosómica de *ATF6*. Con este mecanismo, *WFS1* contribuye a prevenir una respuesta exagerada de la vía. En pacientes con síndrome de Wolfram, ante la ausencia o baja actividad de la wolframina, existe una retroalimentación positiva de la vía *ATF6*, lo que conlleva en una última instancia a la activación de vías apoptóticas. Por otra parte, mediante estudios de expresión, se ha reportado que *WFS1* incrementa su expresión durante fases en que se estimula la secreción de insulina, conllevando a la hipótesis que está involucrado en el procesamiento y plegamiento de la proinsulina en las células beta de los islotes de Langerhans.

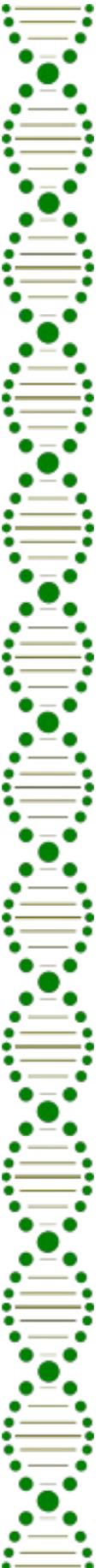
*WFS1* se ha visto asociado a la regulación de iones de calcio, esto influye de manera directa en las reservas de este ion en el RE. Modelos knock-out de células beta y neuronas han mostrado niveles reducidos de calcio en el RE, e incremento en región citosólica de este ion, lo cual puede conllevar a la activación de la familia de proteasas calpaínas y culminar en muerte celular (Takei et al, 2006). Por tanto, alteraciones en la función o estructura de la proteína conllevan a fallo en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico, alteración en progresión del ciclo celular y desregulación en homeostasis del calcio.



**Fig.7. Vía de respuesta al estrés del retículo endoplásmico. Principales moléculas implicados en respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Pallota et al. (2019).**

### 1.4.7 *WFS1* y la homeostasis del calcio

En cuanto al rol que se ha asociado a *WFS1* con la homeostasis del calcio, se ha sugerido, que activa un receptor inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R,) y con ello, se inhibe la ATP-asa sarco/endoplásmica del retículo (SERCA), ello conlleva a modificaciones de los niveles de calcio almacenados en el RE. Se ha sugerido que deficiencia en *WFS1* conlleva a una alteración en IP3R, y con ello, una pérdida de la homeostasis del calcio en la mitocondria.



### 1.4.8 *WFS1* e interacciones mitocondrial

El RE se comunica directamente con la mitocondria a través de MAMs (membranas asociadas a mitocondrias), las cuales son microdominios que permiten un transporte eficiente de calcio entre el RE y la mitocondria. Dicho transporte es facilitado por proteínas asociadas como *IP3R*, la cual interactúa con *VDAC1* en la membrana externa mitocondrial, mediante la chaperona reguladora de glucosa 75 (*GRP75*). El complejo *IP3R/GRP75/VDAC1* también involucra al transportador de calcio uniporte (*MCU*) en la membrana mitocondrial interna para permitir el transporte de calcio del RE a la matriz mitocondrial.

En la figura siguiente se muestra, como en una célula sana, *WFS1* se une a *NCS1* para formar un complejo con *IP3R1*, los cual activa el transporte de calcio del RE a la mitocondria. Cuando el complejo *WFS1/NCS1/IP3R1* y *VDZC1* son funcionales, el calcio puede transportarse eficientemente del RE a la mitocondria y activar el ciclo TCA y la cadena respiratoria. Derecha. En el síndrome de Wolfram, la pérdida de función de *WFS1*, conlleva a que *NCS1* se degrade, y disminuya el transporte de calcio del RE a la mitocondria. Lo cual conlleva a alteraciones en la cadena respiratoria.

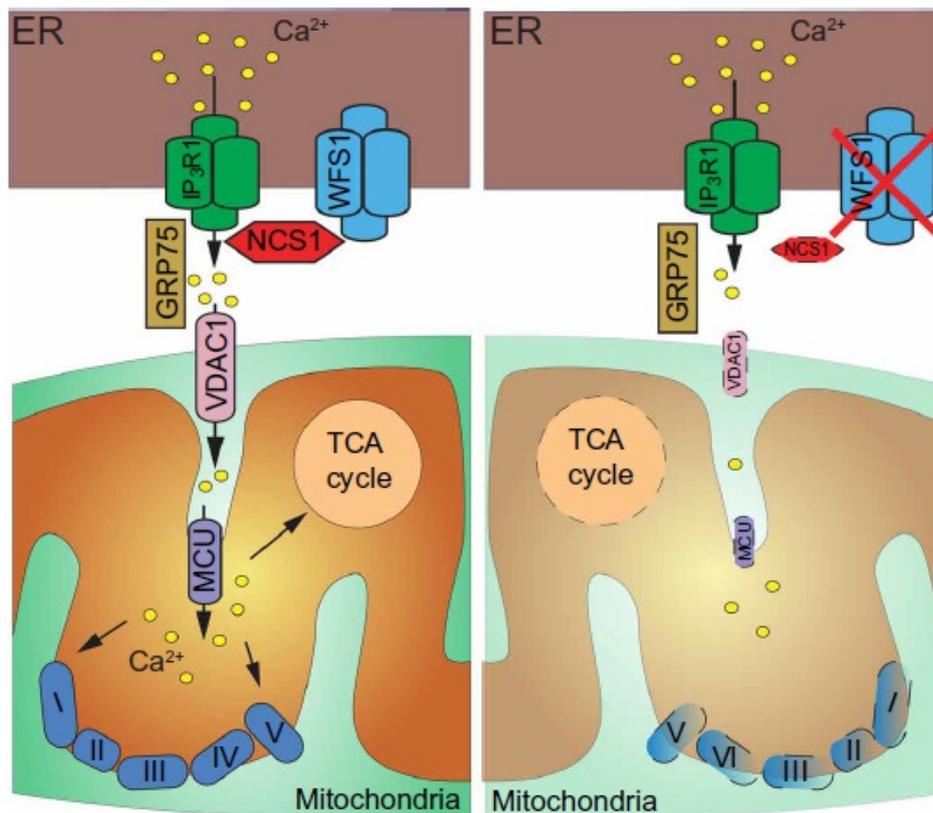


Fig. 8. Modelos de alteraciones mitocondriales inducidas por una función inadecuada de *WFS1*. Izquierda. Angebault et al. (2018).



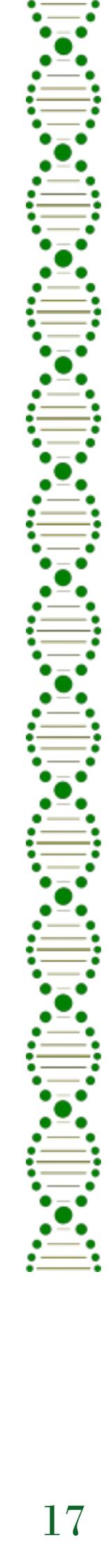
### 1.4.9 Estudios experimentales con *WFS1*

Una vez identificada la proteína, estructura, ubicación y posibles funciones, se procedió a analizar como alteraciones en la función y estructura de ésta, se relacionaban con la fisiopatología de las distintas manifestaciones clínicas del síndrome. Fue así como iniciaron los estudios de expresión de la wolframina en distintos tejidos, especialmente los implicados en órganos afectados clínicamente: la mayoría de los estudios se realizado mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos dirigidos a la región N-terminal de la proteína.

En 2001, Cryns y colaboradores analizaron la expresión de la wolframina en el oído interno en un modelo murino en distintas etapas del desarrollo para evaluar su posible rol en la biología de la audición. La expresión de la wolframina estuvo presente en todas las etapas, sin embargo, pudo evidenciarse un pico de expresión durante los primeros días posnatales, lo cual sugiere un papel importante durante desarrollo del oído interno, pero una expresión continúa también sugiere un papel en el mantenimiento de la función. Por otro lado, ciertas zonas del oído interno presentaban mayor expresión, como fueron células que bordean el ducto coclear, el ganglio espiral y células ciliadas vestibulares. Dado que la wolframina se expresa en células que bordean el compartimento endolinfático y que poseen retículo canalicular, se hipotetizo que *WFS1* podría estar involucrado en el mantenimiento de la composición iónica de la endolinfa; y por tanto su disrupción, podría resultar en un malfuncionamiento del retículo canalicular por una alteración en el reciclaje de iones potasio. Por otra parte, el calcio es un ion importante en el proceso de audición, ya que ocurre una movilización de este ion desde el RE en distintos tipos celulares del oído interno; entre ellos las neuronas del ganglio espiral y células vestibulares; por tanto, alteraciones en *WFS1* conllevan a una pérdida en la homeostasis de este ion, resultando en muerte celular secundario a sobrecarga de calcio.

Posteriormente, Hofmann et al (2003) mediante el análisis de la proteína en pacientes con síndrome de Wolfram, demostraron que las mutaciones que conllevaban a un codón de paro prematuro traen por consecuencia una ausencia total de la wolframina, en lugar de especies truncas. Estudios de RT-PCR evidenciaron que los transcritos producto de mutaciones sin sentido presentan inestabilidad, siendo reconocidos para su posterior degradación. Este mecanismo molecular explica la pérdida de función que presentan los pacientes con síndrome de Wolfram; por el contrario, en células portadoras de una mutación de sentido erróneo (R629W), se detectaron niveles bajos de expresión de wolframina 1, generados por una vida media menor. Por tanto, se especuló que el mecanismo molecular de esta mutación de sentido erróneo, involucra un defecto en la dosis más que uno funcional; el mecanismo por el cual la mutación le confiere inestabilidad a la proteína no se dilucidó.





En 2004, Ishihara et al. mediante el estudio en modelo murino donde se disruptió el gen *WFS1* en células beta, se demostró la base fisiopatológica de la diabetes mellitus en el síndrome de Wolfram; generado por una pérdida progresiva de la masa de células beta, con la posterior disminución en la secreción de insulina. La pérdida de células beta se aludió a un incremento en la susceptibilidad a la apoptosis inducida por altos niveles de glucosa y falla en la respuesta a estrés del retículo endoplásmico. Se observó de manera conjunta un incremento discreto en los otros tipos celulares del páncreas, como células alfa, delta, y F. La severidad del fenotipo varió desde diabetes mellitus franca a intolerancia a la glucosa, esto se relacionó con efectos epistáticos. Aunque en este trabajo se hipotetizó la apoptosis como mecanismo molecular involucrado en la pérdida de células beta; fue en 2006, cuando este mismo grupo de investigadores (Yamada et al.) estudiaron la vía UPR en células de islotes con deficiencia de *wfs1* en modelos murinos. Observaron incremento en la fosforilación de *PERK* y *eIF2 $\alpha$* , además de incremento de expresión en las moléculas implicadas en las otras dos vías (*IRE1* y *ATF6*). Demostraron además la activación de vías moleculares proapoptóticas, como el incremento de expresión de CHOP tanto en mRNA como a nivel proteico; así como la expresión de caspasa 3. Además del incremento en apoptosis, de evidencia disminución en la proliferación de células beta. Este experimento se realizó mediante la incorporación de 5-bromodesoxiuridina, la incorporación de este agente intercalante fue menor en las células deficientes de *wfs-1*.

Posteriormente, procedieron a la medición de moléculas implicadas en control del ciclo celular, describieron que la fosforilación de p53 se encontraba incrementada, no así su expresión; los niveles de 21 si estaban incrementados, tanto en mRNA como proteína. Concluyendo que alteraciones en *wfs1* en células beta, conllevan a una respuesta hiperactiva de la vía UPR, con el posterior detenimiento del ciclo celular mediado por p21 y la activación de vías proapoptóticas. Algo muy interesante de estos experimentos fue que además de analizar la respuesta en células beta, también lo realizaron en otros tejidos y observaron que la respuesta al estrés del RE no se encontraba alterada en células cardíacas, músculo esquelético y tejido adiposo.

En 2006, Yamamoto et al. hipotetizaron que la atrofia de nervio óptico característica del síndrome de Wolfram, podía resultar de la mutación del gen *WFS1* en las células ganglionares de la retina, lo que conllevaría a atrofia anterógrada de los axones retineales y contracción del nervio óptico. Con el fin de comprobar esta hipótesis, realizaron estudio de expresión de la wolframina en la retina y porción proximal de nervio óptico de monos cinomolgos. Mediante inmunohistoquímica, se corroboró alta expresión de wolframina en la retina y nervio óptico, sin embargo, en dicho estudio no hubo una comparación con células deficientes de *wfs1*.

Zatyka et al en 2008, corroboraron la interacción de la wolframina en su región C-terminal (aminoácidos 652-890), y la porción transmembranal (aminoácidos 322-652) interactúa con la subunidad  $\beta 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa; en fibroblastos y células pancreáticas de modelos knockdown de *wfs1*. Además, demostraron que los niveles de dicha subunidad disminuían de manera paralela a la disminución de la expresión de la wolframina. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, como otras proteínas de membrana, se translocan al RE durante la síntesis de proteínas para favorecer el correcto ensamblaje y plegamiento de estas, por tanto, la íntima interacción entre esta ATPasa y la wolframina, hace suponer que esta última, está involucrada en procesamiento y plegamiento de proteínas directamente.



## 1.5 Manifestaciones clínicas

Las principales manifestaciones clínicas como se mencionó previamente son diabetes mellitus de inicio temprano, atrofia bilateral de nervio óptico, hipoacusia neurosensorial, diabetes insípida, alteraciones neurológicas, alteraciones renales, enfermedades psiquiátricas, problemas gastrointestinales y atrofia gonadal.

### 1.5.1 Diabetes mellitus:

El tipo de diabetes mellitus presentada por estos pacientes, se clasifica en otros tipos de diabetes, asociada a entidades sindrómicas, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud. Generalmente es la primera manifestación de la entidad, con una edad media de diagnóstico a los 6 años (3-16 años), el 95% de los casos requerirá de insulina como tratamiento inicial (Barret,1995). En una primera instancia, se consideró que los pacientes con síndrome de Wolfram presentaban una clásica diabetes tipo 1, sin embargo, se demostró que el origen, historia natural y complicaciones difieren significativamente. Barret et al (1995) como parte de la descripción de la evolución clínica, realizaron haplotipificación en 30 de los 45 pacientes de su cohorte, ya que se sabe, el riesgo diabetes tipo 1 se ha asociado a determinados haplotipos de HLA, específicamente HLA-DR3 y HLA-DR4; se comparó con un grupo control de 100 personas sanas de origen caucásico, y no se obtuvo una diferencia significativa en los haplotipos HLA-DR entre ambos grupos ( $p>0.05$ ). En cuanto a la medición de péptido C, demostraron deficiencia de insulina, sin embargo, el rango fue desde deficiencia grave hasta una reserva significativa.

El estudio de casos y controles realizado por Rohayem (2011), comparó la evolución de la diabetes mellitus de 50 pacientes con síndrome de Wolfram contra la evolución en 24,164 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 menores de 21 años. Los pacientes con síndrome de Wolfram fueron diagnosticados a edades más tempranas ( $5.4\pm 3.8$  vs  $7.9 \pm 4.2$ ), presentaron menor prevalencia de cetoacidosis (7 vs 20.3%), la positividad en autoanticuerpos fue menor (10 vs 86%); por el contrario, las crisis hipoglucémicas se presentaron con mayor frecuencia en pacientes con síndrome de Wolfram (37 vs 7.9%). Todos estos hallazgos con  $p<0.05$ .



Se había hipotetizado que las complicaciones asociadas a diabetes mellitus eran menos frecuentes en los pacientes con síndrome de Wolfram, Cano y colaboradores (2007) realizaron un estudio con 26 pacientes con diagnóstico molecular de síndrome de Wolfram, de 23 familias, compararon las complicaciones propias de la diabetes mellitus de este grupo con el de 52 pacientes con diabetes mellitus tipo 1. El grupo de síndrome de Wolfram presentó significativamente valores reducidos de hemoglobina glicosilada ( $7.72 \pm 0.21$  vs  $8.99 \pm 0.25\%$   $p=0.002$ ), así como requerimiento menor de dosis de insulina ( $0.71 \pm 0.07$  vs  $0.88 \pm 0.04$  unidades/kg/día  $p=0.0325$ ); en cuanto a las complicaciones microvasculares, la retinopatía diabética se encontró en 2 de los 26 pacientes con síndrome de Wolfram, diagnosticada como retinopatía no proliferativa; por el contrario, el grupo de diabetes tipo 1, el 17% presentó retinopatía no proliferativa y de estos, 9% proliferativa. Dicho porcentaje es similar al reportado por Barret et al (1995) con un 7% de pacientes afectados por retinopatía diabética.

La prevalencia de nefropatía en el grupo de síndrome de Wolfram en la cohorte de Cano et al (2007) fue del 8%, observándose únicamente microalbuminuria; mientras que, en el otro grupo, 8% de los pacientes presentaron microalbuminuria y 19% macroalbuminuria. Destacó que los dos pacientes con síndrome de Wolfram que presentaron retinopatía, tenían diagnóstico de diabetes mellitus de más de 20 años de evolución, y ambos eran heterocigotos compuestos u homocigotos para variantes que generaban corrimiento del marco de lectura. En conclusión, se obtuvo que los pacientes con síndrome de Wolfram presentan mejor control glicémico, con menores dosis de insulina y esto a su vez conlleva a menor porcentaje de complicaciones microvasculares.

En cuanto a la fisiopatología de esta manifestación, en ensayos de expresión génica, se ha demostrado que WFS1 presenta una alta actividad en las células B del páncreas, mutaciones en WFS1 predisponen a la activación de la vía de apoptosis mediante la disrupción de la homeostasis del calcio intracelular en las células beta pancreáticas.

## 1.5.2 Atrofia óptica:

Generalmente es la segunda manifestación en presentarse, con una medida de inicio a los 11 años (6-19 años) (Barret 1995). Dado que es un hallazgo clínico temprano y presente en todos los pacientes, se considera junto con la diabetes mellitus, un criterio clínico necesario para realizar el diagnóstico de la entidad. Se caracteriza clínicamente por reducción progresiva de la visión. La agudeza visual de los pacientes con síndrome de Wolfram está reportada en ser  $<20/50$ , esta cifra puede variar, dependiendo de la edad de los pacientes estudiados, ya que, al ser una enfermedad progresiva, los pacientes con mayor tiempo de evolución tendrán una peor agudeza visual. Otros datos clínicos son la pérdida gradual del campo visual. Mediante tomografía de coherencia óptica se han demostrado adelgazamiento en la capa de fibras nerviosas de la retina.

Además de la atrofia óptica, se han descrito otras alteraciones oftalmológicas como son discromatopsia, reflejos pupilares anormales, catarata, nistagmus, estrabismo, retinopatía diabética y retinosis pigmentaria.

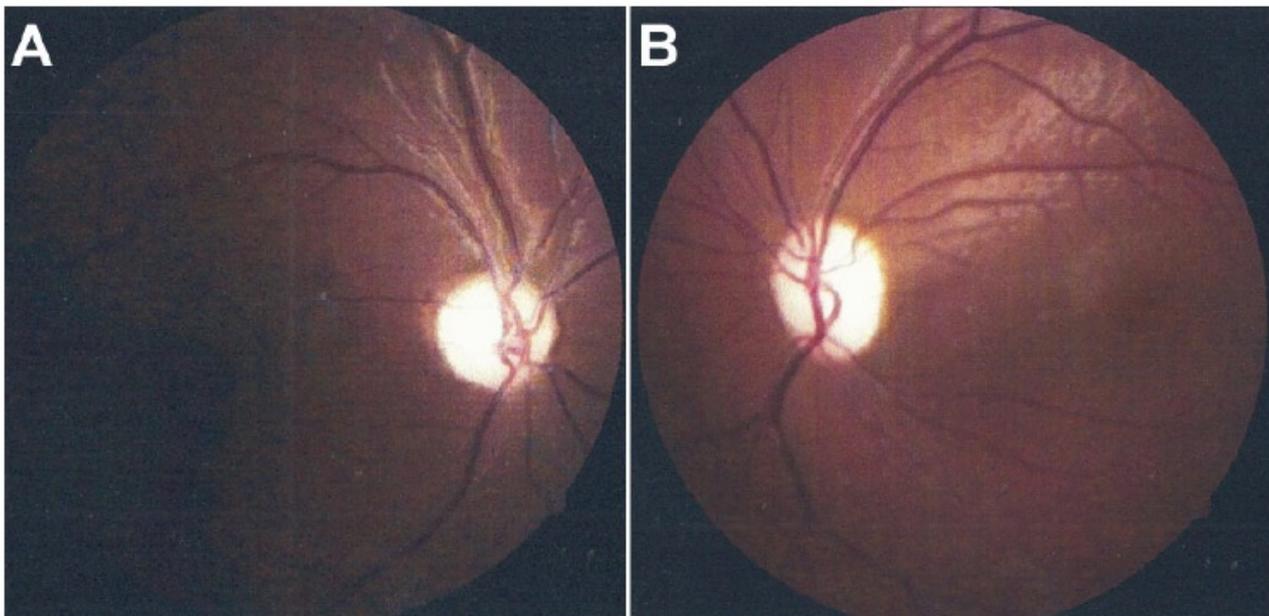


Fig. 9. Fotografía que muestra palidez grave del disco óptico. Zenteno et al. 2008



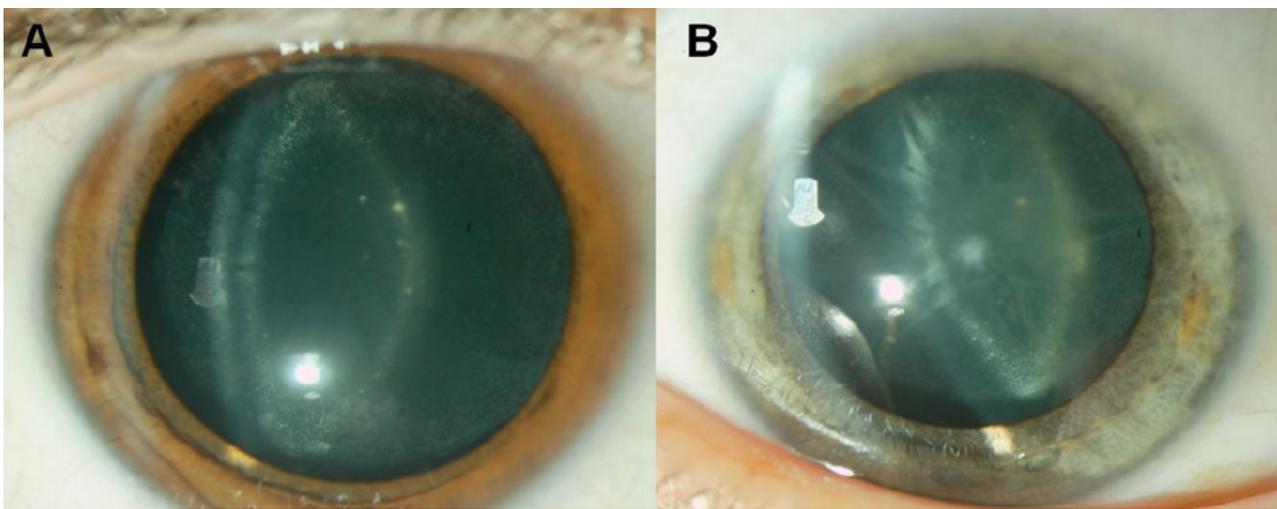
La atrofia óptica es el resultado de la muerte de células ganglionares de la retina, con cambios en la microvasculatura, lo cual conlleva a una disminución del flujo sanguíneo retineal y posterior adelgazamiento de las fibras nerviosas. La atrofia óptica está presente en más del 90% de los pacientes antes de los 20 años de edad. Al-Till et al (2002) reportaron una prevalencia de 93% en una cohorte de 15 pacientes de 4 familias; mientras que Ustaoglu et al (2019) reportaron una prevalencia del 100%, en una cohorte de 13 pacientes, con una media de edad del diagnóstico de 13 años (6-27 años).

A pesar de ser una manifestación temprana, puede llegar a pasar desapercibida por algún tiempo, ya que la baja visual es lentamente progresiva y los pacientes pueden demorar en percatarse y buscar una valoración. Ustaoglu et al (2019) evaluaron la agudeza visual mediante cartas de Snellen, 10 de las evaluaciones presentaron una agudeza visual  $<20/200$  y 16  $>20/200$ . Algo llamativo fue que todos los pacientes presentaron discromatopsia; la cual fue evaluada mediante cartas de Ishihara, dicho hallazgo conlleva a la hipótesis, de que esta manifestación puede ser la primera alteración oftalmológica, incluso antes que la disminución de la agudeza visual. En el estudio de Al-Till et al (2002) 93.3% de sus pacientes presentaron discromatopsia.

La tomografía de coherencia óptica permite valorar cambios en el grosor de las capas retineales, Ustaoglu y colaboradores (2019) demostraron que los pacientes con síndrome de Wolfram presentan disminución del grosor del 1% en la capa de fibras nerviosas y de células ganglionares, al compararla con controles sanos. Otra gran herramienta en la valoración del nervio óptico es la angiografía de coherencia óptica, ya que permite analizar alteraciones funcionales y estructurales en la microvasculatura. Ustaoglu et al, evidenciaron que la densidad de los vasos (VD) era significativamente menor en los pacientes con síndrome de Wolfram en comparación con controles sanos ( $p < 0.001$ ), tanto en imagen completa, dentro del disco y peripapilar (con medidas de 33.6, 45.6, 29% vs 49.7, 49.8, 52.3% de controles). Hasta la fecha la etiología de esta disminución de VD permanece poco clara.

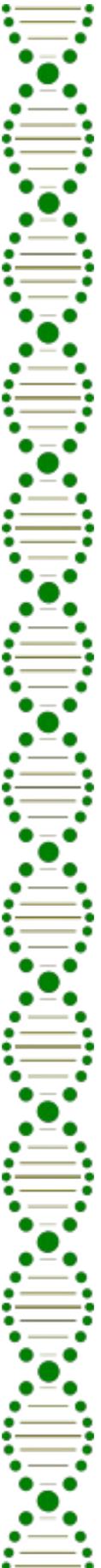
En cuanto a la pérdida del campo visual puede presentarse en distintos patrones, ya sea depresión generalizada, escotomas arqueados inferiores, superiores, escotomas en anillo o escotomas centrales; Barret et al reportaron escotomas centrales en 9 pacientes y restricción del campo periférico en tres. Mientras que Ustaoglu et al. reportaron un valor de desviación media (MD) de  $-17.3 \pm 7.9$  dB, y un índice de campo visual (VFI) de  $57.9\% \pm 26.3\%$ ; los escotomas en anillo, así como MD y VFI significativamente disminuidos se presentaron con mayor frecuencia en aquellos pacientes con disminución de agudeza visual grave ( $<20/200$ ) con una  $p = 0.001$ .

Como se mencionó anteriormente, otras manifestaciones descritas son catarata, retinosis pigmentaria, defectos pupilares y nistagmus; Al-Till y colaboradores reportaron la prevalencia de estas manifestaciones en un 66.6, 30, 28.6 y 8% respectivamente (2002), mientras que Ustaoglu (2019) reportó en su cohorte de 13 pacientes, la presencia de catarata en 4 ojos, estrabismo exotrópico en dos pacientes y nistagmus horizontal conjugado en tres pacientes. Se considera que tanto los defectos pupilares y el nistagmus podrían estar relacionados con la degeneración cerebelar que pueden llegar a presentar estos pacientes.



**Fig. 10. Catarata pulverulenta estelar en dos hermanas con Síndrome de Wolfram. Chacón-Camacho et al. (2013).**

En la retinosis pigmentaria, hay datos discordantes, Barret (1995) no encontraron cambios pigmentarios en retina, sin embargo, a seis pacientes se les realizó electroretinografía (ERG), y tres de ellos presentaron reducción en la amplitud sin un cambio significativo en la latencia. En la cohorte evaluada por Al-Till (2002) nueve pacientes presentaron cambios pigmentarios, sin embargo, la angiografía con fluoresceína retiniana fue normal, no se realizó ERG en estos pacientes. Los datos reportados por otros autores en la ERG son disminución en la curva de adaptación a la oscuridad, caracterizada por una reducción tanto en adaptación de conos como de bastones. Se propone que la fisiopatología subyacente a las alteraciones en ERG es la degeneración trans-sináptica por daño en la capa interna nuclear, esto puede ser paralelo al proceso neurodegenerativo descrito en los pacientes, por tanto, las alteraciones en la ERG podrían ser una manifestación oftalmológica relativamente tardía en el síndrome Wolfram.



Se ha propuesto que la atrofia óptica asociada a variantes en la wolframina, tiene una correlación directa con alteración mitocondrial, ya que alteraciones en esta proteína tiene un impacto en intercambio de calcio intracelular y el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial, conllevando a estrés en retículo endoplásmico y apoptosis (Scaramuzzi, 2018).

### 1.5.3 Hipoacusia neurosensorial:

Presente en el 62% de los casos, ocurre en una media de edad de 16 años (5-39 años), en la cohorte reportada por Barret et al (1995), estos pacientes presentaban una hipoacusia bilateral de alta frecuencia, diez pacientes requirieron de auxiliares auditivos.

Si bien, se considera que la hipoacusia es una manifestación que suele aparecer en la segunda o tercera década de la vida, actualmente se describe que la hipoacusia pudiera ser una manifestación infradiagnosticada dada que no es fácilmente referida por el paciente o sus padres, y requiere de medidas audiometricas estandarizadas. En una revisión bibliográfica de 392 pacientes de 49 referencias distintas, indican que 6.35% de los pacientes con síndrome de Wolfram debutaron con hipoacusia (Karzon, 2018).

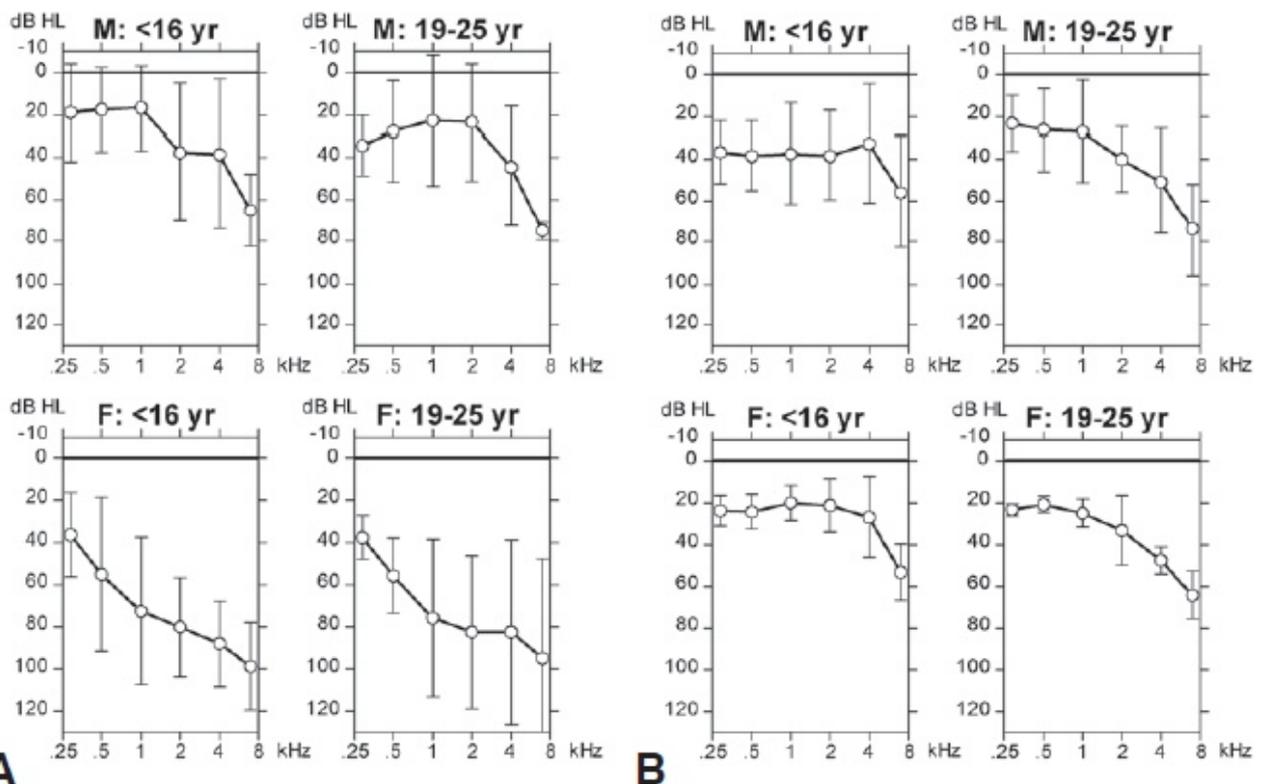


Fig. 11. Audiogramas de pacientes alemanes (A), y pacientes adicionales (B). Platinga et al. (2008).

Plantinga et al (2008) recabaron datos audiológicos de nueve pacientes de origen alemán que incluía medidas de conducción aérea, conducción ósea, reconocimiento de voz; describieron una hipoacusia neurosensorial de moderada a alta frecuencia con reconocimiento de voz preservado. Además, realizaron una descripción detallada de los hallazgos en la audiometría de 23 pacientes con diagnóstico molecular de síndrome de Wolfram, concluyeron que no existe una progresión sustancial de la hipoacusia a lo largo de la vida, no existe diferencia de gravedad dependiente del sexo. El audiograma de manera general en estos pacientes se describió con un umbral de aproximadamente 25 dB a 0.25 a 1 kHz, suavemente inclinado hacia abajo, aproximadamente 60 dB a 8 kHz.

Karzon et al (2018) describieron una cohorte de 40 pacientes con síndrome de Wolfram, 17 varones y 18 mujeres, entre 5.1 y 25.8 años. Cinco sujetos fueron excluidos de las pruebas ya que presentaban un implante coclear. Al resto se les realizó una valoración audiológica, mediante prueba de tonos puros, timpanometría, umbral de recepción verbal y discriminación del lenguaje. La prevalencia de hipoacusia neurosensorial fue de 75%, con una edad promedio de inicio de 8.3 años; con respecto a la prevalencia por sexo fue de 67% en hombres y 82% en mujeres. Tomando en cuenta los resultados de las pruebas de audición se clasificó a los pacientes en audición normal (10 pacientes), moderada-grave (24 pacientes), profunda (6 pacientes). El promedio de alta frecuencia (HFA) y el índice de inteligibilidad de lenguaje (SII) sin ayuda empeoraron con el tiempo, este efecto fue más evidente en los pacientes jóvenes. Los cambios cuantitativos anuales fueron pequeños, con un cambio a lo largo de un año estimado en rango subclínico (menos de 5 dB). Algo destacable de este estudio, es que los 10 participantes con audición normal, cuatro de ellos tenían umbrales reducidos en 8kHz, lo cual sugiere que podrían desarrollar hipoacusia (cumpliendo criterios operacionales) en un futuro. En esta cohorte, la hipoacusia fue la primera manifestación de la entidad en el 18% de los participantes y la segunda manifestación en 25%.

Actualmente se sabe, que mutaciones en *WFS1* en estado heterocigoto son causantes de la hipoacusia no sindrómica autosómica dominante (DFNA6/14/38) (OMIM #600965). A la fecha, se han descrito alrededor de 40 mutaciones causantes de la entidad. La audiometría de estos pacientes se caracteriza por una hipoacusia neurosensorial de baja frecuencia, con o sin progresión. La edad de inicio varía ampliamente, desde formas prelinguales a la tercera década de la vida; la asociación con afección vestibular es rara. Ohata et al (1998) reportaron a 19 pacientes con mutaciones en *WFS1* en estado heterocigoto, en una cohorte de 2549 pacientes japoneses con hipoacusia neurosensorial no sindrómica. Se describieron trece mutaciones, todas eran de sentido erróneo y localizadas en el exón 8.



Una vez identificados los casos, se expandió el estudio molecular a familiares de primer grado afectados por hipoacusia, obteniéndose un total de 30 pacientes. La edad de presentación varió desde los 0 a 30 años, con una gravedad de moderada a profunda, la progresión de la hipoacusia y tinnitus se reportó en 15 (55.5%) de 27 individuos, y en 12 (42.9%) de 28 individuos, respectivamente; mientras que el vértigo y mareo estuvo presente en 7(25.0%) de los 28 pacientes. Los audiogramas de tonos puros mostraron básicamente hipoacusia neurosensorial, simétrica, bilateral, la configuración audiométrica más frecuente fue de baja frecuencia en 14 individuos, sin embargo, algunos individuos presentaron audiogramas planos, de moderada (forma de U) o alta frecuencia. Por lo tanto, aunque la configuración típica de este tipo de hipoacusia es la audiometría de baja frecuencia, algunos individuos mostraron otros tipos de configuración. En cuanto a los síntomas vestibulares, no son característicos de este tipo de hipoacusia, los siete pacientes que refirieron vértigo o mareo, no fueron sometidos a pruebas vestibulares que confirmen afección a dicho nivel.

#### **1.5.4 Diabetes insípida:**

Estudio de Barret (1995), reportó una prevalencia de 73%, con una media de edad de aparición de 14 años (3 meses - 40 años). Se considera que del 51 al 87% de los pacientes presentará diabetes insípida central con buena respuesta a desmopresina oral o intranasal (Rigoli, 2012). En 1989, Thompson y colaboradores, realizaron estudio en siete pacientes con síndrome de Wolfram, con el fin de dilucidar el origen de la diabetes insípida presentada por estos pacientes; estudiaron la secreción de vasopresina mediante 3 estímulos dinámicos, uno osmótico, otro hipoglicémico y uno baroregulador. El estímulo osmótico realizado con infusión salina hipertónica demostró diabetes insípida de origen hipotalámico, completa en tres pacientes y parcial en cuatro; la administración nasal de desmopresina excluyó una etiología nefrogénica en los siete pacientes. La ausencia de respuesta de secreción de vasopresina ante estímulos no osmóticos en estos pacientes, sugirió una ausencia global de vasopresina secretada por las neuronas, en lugar de una alteración en osmorreceptores. Con ello se concluyó que los pacientes con síndrome de Wolfram presentaban una diabetes insípida de origen central y no nefrogénico. Posteriormente Gabreels et al (1998) demostraron que los pacientes con síndrome de Wolfram con diabetes insípida presentaban disminución en los niveles de expresión de la vasopresina, tanto en núcleos supraópticos como paraventriculares; además, demostraron que los precursores de esta hormona también se encontraban en menor concentración.

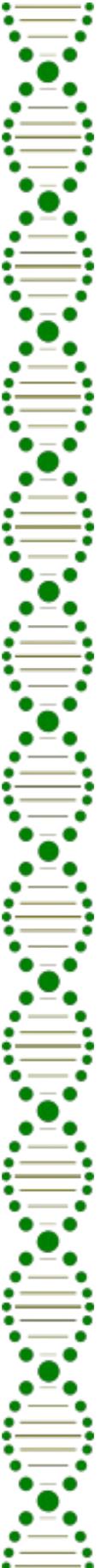


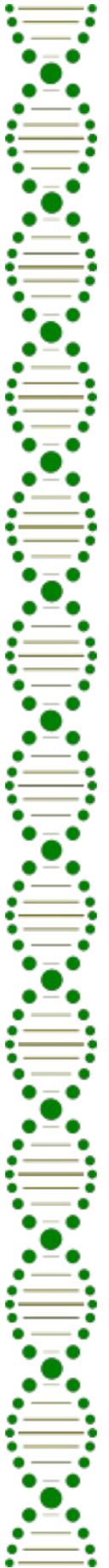
### 1.5.5 Manifestaciones psiquiátricas:

En 1990, Swift y colaboradores reportaron una cohorte de 68 pacientes con síndrome de Wolfram, los cuales cumplían los criterios mínimos para la entidad (diabetes mellitus a edad temprana y atrofia óptica bilateral), fueron 35 hombres y 33 mujeres; se les realizó un cuestionario de salud, donde debían especificar el número de hospitalizaciones, de estas cuantas había sido en una institución psiquiátrica, si recibían un tratamiento psiquiátrico y si hubo intentos de suicidio. En sus resultados destacó que 41 de ellos (60%) habían presentado episodios de depresión, psicosis, agresividad o síndrome cerebral orgánico. Se constató que 12 pacientes habían tenido admisiones en hospitales psiquiátricos, 5 de ellos en múltiples ocasiones, 11 habían tenido al menos un intento de suicidio. El 25% de la cohorte habían tenido intento de suicidio o requerido de admisión en un hospital psiquiátrico. En este primer estudio sobre las manifestaciones psiquiátricas en lo pacientes con síndrome de Wolfram, se hipotetizó que estas se relacionaban a la entidad per se, y no como una reacción afectiva a una entidad crónica; ya que las manifestaciones psiquiátricas no se correlacionaron con la exacerbación de otros síntomas; además de ser manifestaciones complejas como depresión profunda y eventos psicóticos. A pesar de que la base molecular de la entidad aún no había sido descubierta, se proponía que al tener un modo de herencia autosómico recesivo, eran los homocigotos quienes presentaban mayor riesgo para las manifestaciones psiquiátricas.

Posteriormente, en 1998 Swift y Polymeropoulos, describieron la predisposición a enfermedades psiquiátricas en familiares de pacientes con síndrome de Wolfram; sus resultados mostraron que la proporción de hospitalizaciones psiquiátricas en pacientes portadores fue 10 de 11 casos, más allá de la esperada (3.1/11), conllevando a la estimación de que los portadores en estado heterocigoto de variantes en *WFS1* tienen 26 veces más, la probabilidad de tener hospitalizaciones psiquiátricas, de aquellos que no lo sean.

Sequeira y Kim (2002) evaluaron la presencia del polimorfismo H611R del gen *WFS1*, como factor de riesgo para comportamiento impulsivo y riesgo de suicidio, realizaron un estudio de casos y controles, siendo 111 sujetos que cometieron suicidio y 129 controles con diagnóstico de ser mentalmente sanos. Se demostró una asociación significativa entre el polimorfismo H611R en el exón 8 de *WFS1* con riesgo de suicidio.





Sin embargo, en 2015, Bischoff y colaboradores, reportaron estudio en el que se incluyó 19 pacientes con síndrome de Wolfram, 25 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y 25 controles sanos. Se les sometió a pruebas cognitivas, se les realizó cuestionario sobre síntomas psiquiátricos a los probandos y padres y se les realizó una entrevista psiquiátrica. Contrario a lo reportado por otros autores, los pacientes con Wolfram incluso tuvieron mejor desempeño en algunas pruebas cognitivas como memoria selectiva y tareas específicas, únicamente fueron significativas la prueba de olfato y las alteraciones durante el sueño, en la que los pacientes con Wolfram se vieron significativamente más afectados a edades más tempranas. En cuando al interrogatorio sobre síntomas psiquiátricos, fueron los padres quienes se referían preocupados por la enfermedad de su hijo, los pacientes no refirieron sentirse especialmente preocupados. El diagnóstico psiquiátrico más frecuente fue trastorno de ansiedad generalizada, sin embargo, la comparación entre los tres grupos no fue significativa para apoyar que los pacientes con síndrome de Wolfram tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedades psiquiátricas, que otros pacientes con enfermedades crónicas.

### **1.5.6. Manifestaciones neurológicas:**

De acuerdo a la cohorte de 45 pacientes reportada por Barret et al, el 62% de los pacientes presentaron manifestaciones neurológicas, con una media de inicio de 30 años (5-44 años). Entre estas fueron ataxia quince pacientes, arreflexia de extremidades inferiores 9, mioclonus 9, nistagmus horizontal 7, apneas centrales 5, disartria 5, neuropatía autonómica 4, disminución en gusto/olfato 4, hemiparesia 4, respuesta plantar extensora 4, sensibilidad alterada 2. Otra cohorte reportada por Chausseot et al (2010) de 59 pacientes, las alteraciones neurológicas ocurrieron en 31 (53%), a una media de edad de 15 años. Los signos neurológicos fueron: alteración cerebelar en 17 pacientes (manifestada por ataxia cerebelar, disartria, disfagia y nistagmus), neuropatía periférica en 12 pacientes y alteraciones cognitivas en 10; de estas, seis pacientes presentaban alteraciones en el aprendizaje o retraso psicomotor, los otros cuatro pacientes presentaron alteraciones en la memoria o datos de demencia, ocho pacientes presentaron epilepsia, en siete de estos fue generalizada (de ausencia, mioclónica, tónico-clónica) y en uno fue parcial. En cuanto a datos de afección piramidal se encontró en cinco pacientes; neuropatía autonómica en cuatro e involucro de pares craneales en dos.

Se realizó resonancia magnética en 24 casos (77%), trece pacientes presentaron alteraciones en dicho estudio (54%), entre los hallazgos se encontraron: atrofia cerebelosa, la cual incluso se ha reportado que puede preceder a las manifestaciones clínicas neurológicas; atrofia de la vía óptica, hipoplasia hipotalámica e infundibular, ausencia o hiperintensidades en neurohipófisis, en cuatro pacientes adultos se visualizaron hiperintensidades en sustancia blanca y dos pacientes presentaron leucoencefalopatía difusa, la cual nunca se había reportado previamente en esta entidad, dicha manifestación fue sugestiva de un proceso neurodegenerativo. Posterior a la descripción general de las manifestaciones, puesto que la media de edad de las manifestaciones neurológicas había sido 15 años, estos investigadores realizaron dos grupos, en menores de quince años y mayores de esta edad, identificaron dos grandes diferencias, la primera fue que la alteración cognitiva era más frecuente en los pacientes que habían desarrollado síntomas neurológicos en la infancia (antes de los 15 años); y la segunda fue que la epilepsia también se presentó con mayor frecuencia en pacientes con manifestaciones neurológicas tempranas. Destacaron dos pacientes, en quien se conjunto déficit intelectual, epilepsia y malformaciones corticales. Características que no habían sido descritas en la entidad, sugiriendo un posible papel del gen *WFS1* durante el neurodesarrollo. Puesto que todos los pacientes de esta cohorte presentaban también diagnóstico molecular, se trató de realizar una correlación fenotipo-genotipo, asumiendo que las variantes de tipo sentido erróneo suelen tener un fenotipo menos grave, en comparación con aquellas de corrimiento del marco de lectura, sin embargo, las complicaciones neurológicas no se pudieron relacionar con el genotipo. Algo destacable, fue la localización de la mutación en correlación con el sitio de la proteína, cuando al menos una de las mutaciones, alteraba la región hidrofílica carboxilo-terminal, era más frecuente que los pacientes presentaran manifestaciones neurológicas (44.4% vs 26.9%), así como la presencia de mutaciones en la región N-terminal, se correlacionó significativamente con ausencia de complicaciones neurológicas (14.8% vs 38.4%). Se supuso que la localización de las mutaciones puede influenciar la función e interacción de la proteína.





complicaciones neurológicas no se pudieron relacionar con el genotipo. Algo destacable, fue la localización de la mutación en correlación con el sitio de la proteína, cuando al menos una de las mutaciones, alteraba la región hidrofílica carboxilo-terminal, era más frecuente que los pacientes presentaran manifestaciones neurológicas (44.4% vs 26.9%), así como la presencia de mutaciones en la región N-terminal, se correlacionó significativamente con ausencia de complicaciones neurológicas (14.8% vs 38.4%). Se supuso que la localización de las mutaciones puede influenciar la función e interacción de la proteína.

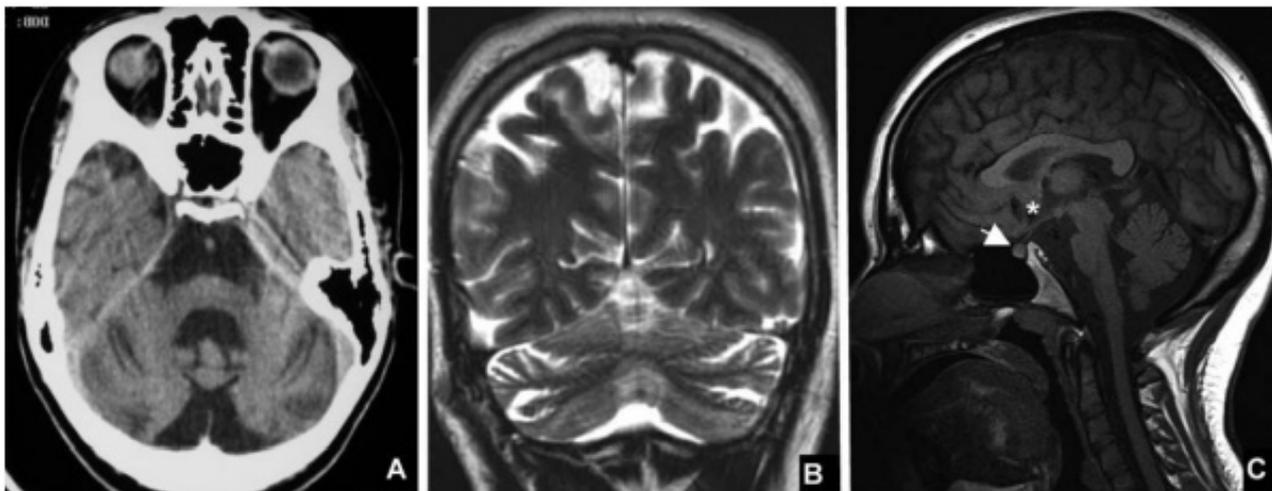
Zatika et al (2008) demostraron que la wolframina interactúa con subunidades de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, la cual tiene una gran influencia en funciones neuronales, incluyendo excitabilidad y funciones motoras a través de su dominio C-terminal; mientras que el dominio N-terminal se ha relacionado con unión a calmodulina, quien juega un rol importante en la señalización de calcio.

Se ha demostrado que las células mielinizantes son altamente sensibles al estrés del retículo endoplásmico, vía que se encuentra alterada en los pacientes con síndrome de Wolfram. Estudios neuropatológicos en cerebros de pacientes con este síndrome evidenciaron pérdida de axones mielinizados en la región del tronco encefálico, especialmente a nivel ventral de la protuberancia; y disminución en la sustancia blanca en el cerebelo.

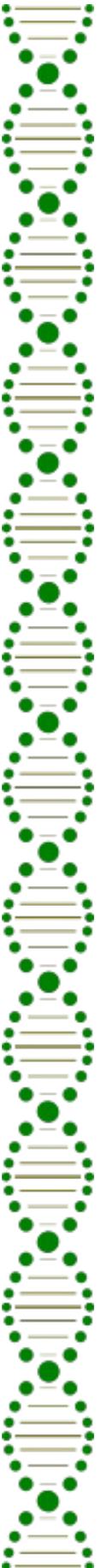
Lugar et al (2016) en un estudio de casos y controles, mediante estudios de neuroimagen, compararon los hallazgos imagenológicos de 21 pacientes con síndrome de Wolfram contra 50 controles, de los hallazgos más relevantes fueron, que el grupo de casos presentaron un perímetro cefálico menor ( $p=0.019$ ), un menor volumen cortical en sustancia blanca y en ciertas regiones subcorticales (basilar, tegmentaria y mesencéfalo, médula, sustancia blanca y gris cerebelar y tálamo); por el contrario, la región amigdalina fue de mayor tamaño. Los núcleos caudados, putamen, hipocampo y cuerpo calloso no mostraron diferencia significativa. De acuerdo a los patrones y mediadas obtenidas en neuroimagen se sugirió que la reducción de mielinización es una característica neuropatológica primaria durante la progresión de la entidad, y de llegarse a corroborar esto en modelos animales o células pluripotenciales, el síndrome de Wolfram podría clasificarse como una patología del neurodesarrollo caracterizada por alteración en la mielinización debida a una respuesta anormal al estrés por el retículo endoplásmico.

Resulta relevante que los oligodendrocitos son altamente sensibles a interrupciones en el retículo endoplásmico, dada su alta necesidad de síntesis de mielina, colesterol y membranas lipídicas, poniéndolos en alto riesgo de apoptosis. Se hipotéticas que la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplásmico en células mielinizantes como los oligodendrocitos puede ocurrir tanto en etapas del neurodesarrollo (infancia y adolescencia), como en la adultez.

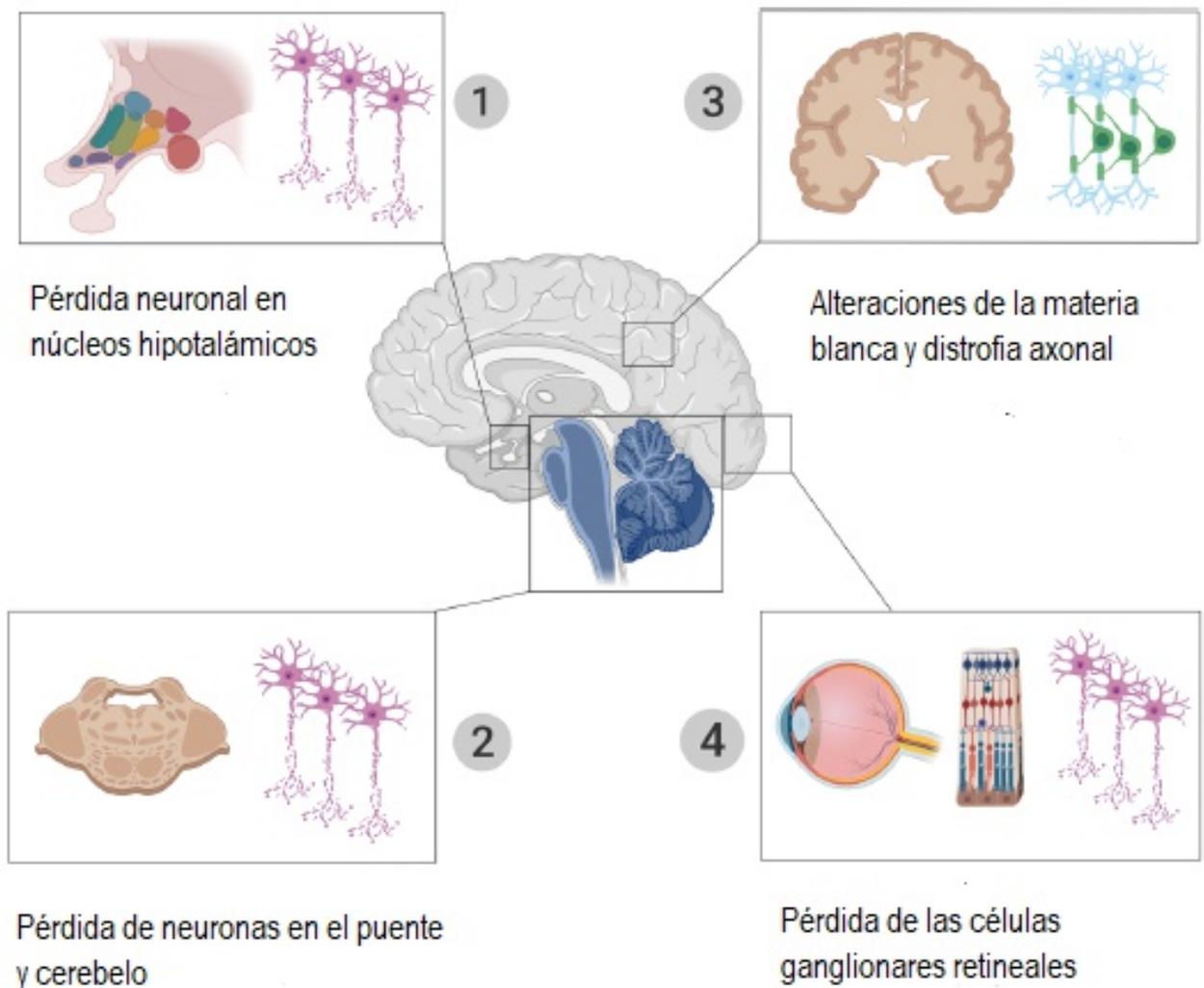
En diversos estudios se ha demostrado disminución en el tamaño a nivel del puente, tanto en su región dorsal como ventral; en la región dorsal se localizan centros reguladores como el centro respiratorio, la formación reticular, implicada en regulación del sueño. Falla respiratoria y apneas centrales son condiciones descritas en el síndrome de Wolfram.



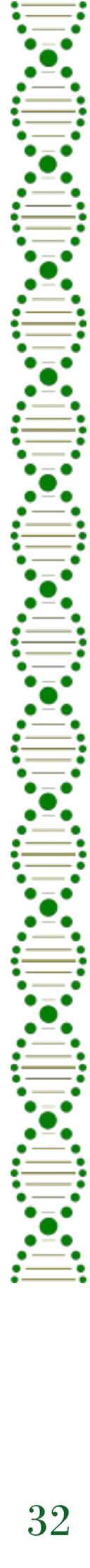
**Fig. 12.** RMI cerebral de 6 pacientes (A-C) ilustrando los hallazgos típicos en pacientes con síndrome de Wolfram. A. imagen de tomografía axial con atrofia severa del puente, vermis y cerebelo. Paciente con SW de 24 años de edad. B. RM coronal en T2 que muestra atrofia parieto-occipital y cerebelar en un paciente sin síntomas neurológico. C. RM sagital en T1, con atrofia de mesencéfalo y médula, adelgazamiento del quiasma óptico e infundibular, ausencia de señal hiperintensa fisiológica en neurohipófisis. Chaussonot et al (2011).



Los hallazgos histopatológicos y estudios microscópicos reportan pérdida neuronal y gliosis en la mayoría de los núcleos de del mesencéfalo. En el cerebelo, existe evidencia de pérdida neuronal en el núcleo de dentado y reducción de las células de Purkinje. Por otro lado, en el hipotálamo existe gliosis y una grave pérdida de neuronas magnocelulares en los núcleos supraópticos y paraventriculares. Otros hallazgos menos frecuentes con daño axonal moderado en la corteza calcarina, gliosis en las neuronas motoras de la médula espinal y pérdida de pigmentación, pérdida de neuronas y gliosis en la sustancia nigra (Carson et al. 1977).



**Figura. 13. Estructuras cerebrales y tejidos, predominantemente afectados en el Síndrome de Wolfram. Samara et al. (2019). Modificada.**



### **1.5.7. Alteraciones urológicas:**

Las manifestaciones de tracto urinario son comúnmente reportadas en esta entidad, entre ellas, dilatación de tracto superior, incontinencia urinaria, infecciones recurrentes y vejiga neurogénica. Alrededor del 90% de los pacientes pueden llegar a presentarlas, a una media de edad de 20 años.

La disfunción vesical puede manifestarse como vejiga atónica de gran volumen o como vejiga pequeña, de poca capacidad, alta presión y disinergia en los esfínteres (Kumar, 2010).

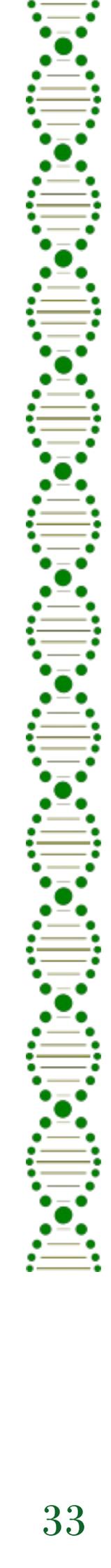
Aunque la falla renal crónica no es lo común, existen reportes en la literatura de dicha complicación; Yuca y colaboradores (2012), describieron una familia, con tres hermanas con insuficiencia renal crónica, dos de ellas en tratamiento con hemodiálisis desde los 12 años de edad. En la cohorte de Barret et al (1995), se reportó una prevalencia del 58%, con una media de edad de 20 años (10-44).

### **1.5.8. Manifestaciones endocrinológicas:**

Dentro de este rubro, el diagnóstico más frecuente es hipogonadismo, ya sea hipo o hipergonadotrófico; el cual se ha observado, afecta preferentemente al sexo masculino; de la cohorte de Barret (1995), siete de diez varones presentaron atrofia gonadal primaria; y varias de las mujeres presentaban irregularidades menstruales y menarca retrasada, pero con función ovárica conservada, incluso reportaron que nueve embarazos exitosos.

Se ha propuesto que la deficiencia de wolframina podría afectar el desarrollo de las células de Sertoli, conllevando a hipo o infertilidad (Haghighi et al. 2012).

También se ha llegado a describir disfunción de la hipófisis anterior, asociado a deficiencia de hormona del crecimiento, lo cual podría explicar la talla baja, presente en algunos casos.



### 1.5.9. Manifestaciones gastrointestinales

En cuanto a los síntomas gastrointestinales, se han descrito dismotilidad gastrointestinal, incluyendo constipación y diarrea crónica. Otros hallazgos han sido enfermedad celiaca y colitis ulcerativa. También ha sido reportado mayor intolerancia al gluten, hasta 20 veces más frecuente.

La causa de estos síntomas se ha relacionado con neurodegeneración de las células de los plexos mientéricos. Los pacientes que cursan con diarrea crónica, se ha reportado buena respuesta a anticolinérgicos.



### 1.5.10. Otras alteraciones

Los problemas respiratorios no son frecuentes, sin embargo, los pacientes pueden llegar a presentar apneas centrales, con posterior falla respiratoria central, esto, secundario a la atrofia cerebral y alteraciones del puente, previamente descritas. Entre las causas de muerte se han descrito comas hipoglicémicos, neumonía, falla renal, estatus epiléptico, falla respiratoria centra y suicidio.



### 1.6. Mortalidad

Del estudio de Barret et al (1995) se reportó una media de edad de muerte a los 30 años. Reportes sugieren una mortalidad del 65% a los 35 años. Las principales causas de muerte son hipoglicemia, coma, estatus epiléptico, enfermedad renal terminal y suicidio, con una media de edad de 30 años (25-49 años).

Tabla 2. Principales manifestaciones clínicas y edad promedio de aparición (Barret et al, 1995).

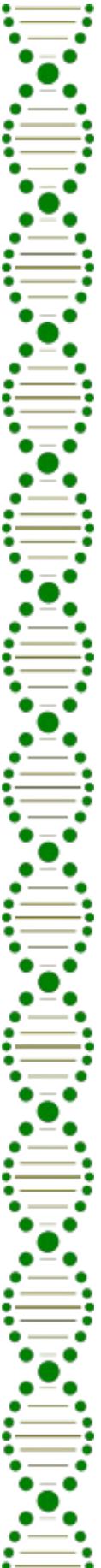
Principales manifestaciones	Edad promedio de aparición
<b>Diabetes Mellitus</b>	<b>6 años</b>
<b>Atrofia óptica</b>	<b>10.5 años</b>
<b>Diabetes insípida</b>	<b>14.5 años</b>
<b>Hipoacusia neurosensorial</b>	<b>16 años</b>
<b>Manifestaciones neurológicas</b>	<b>15 años</b>



## 1.7 Síndrome de Wolfram en México

En 2008 (Zenteno et al) se describió en una familia mexicana, las manifestaciones clínicas y hallazgos moleculares en cuatro hermanos con síndrome de Wolfram. Algo interesante de esta familia, es que los cuatro descendientes de una pareja no consanguínea presentaban la entidad. Los afectados resultaron ser heterocigotos compuestos para dos mutaciones en *WFS1*, hasta ese momento no reportadas. Una de ellas, heredada por rama materna, consistía en una delección de 16pb en el exón 8, que conlleva a un codón de paro prematura 65 codones río abajo. La otra, heredada por rama paterna, una variante de sentido erróneo en la posición 530G>C, en el codón 5. Además de las características clínicas asociadas al síndrome, los cuatro pacientes presentan alteraciones dentales, las cuales, no habían sido asociadas a esta entidad.

En 2013 (Chacón-Camacho et al.) publicaron un reporte de caso, de una familia con dos hermanas afectadas. Se describió de manera detallada el espectro fenotípico a nivel oftalmológico de las pacientes, ambas presentaban microesferofaquia, hallazgo asociado con otras entidades genéticas como síndrome de Marfan o Weil-Marchesani, pero no reportado en síndrome de Wolfram; además presentaban glaucoma juvenil, el cual únicamente se había reportado previamente en una familia turca.

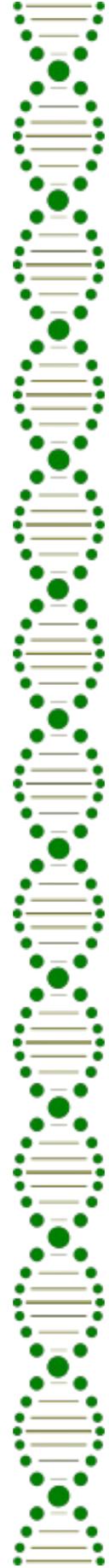




El análisis molecular reveló una mutación no reportada previamente de 15 pb (c.1525\_1539del) en estado homocigoto, que provocaba una delección de 5 aminoácidos (p.V509\_Y513), sin generar un cambio en el marco de lectura.

Blanco-Aguirre et al (2015) obtuvieron de una cohorte de 131 pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1, seis pacientes (4.58%) cumplían los criterios mínimos para síndrome de Wolfram (diabetes mellitus de inicio temprano y atrofia óptica bilateral o hipoacusia neurosensorial). De estos seis pacientes, cuatro de ellos (66.6%) presentaban atrofia óptica y catarata, dos (33.3%) tenían vejiga neurogénica e hidronefrosis secundaria, uno de ellos (16.6%) presentó ataxia, y otro, hipoacusia. En cuatro de estos seis pacientes, se identificó al menos una variante patogénica en *WFS1*. Las mutaciones encontradas, se localizaban en los dominios transmembrana y carboxiterminal, y ya habían sido previamente reportadas en la literatura.

En la Gaceta Médica de México, Rivas-Gómez et al (2016), describieron las manifestaciones clínicas de cinco pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Wolfram, todos ellos pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. La edad promedio de diagnóstico de diabetes mellitus fue de 5.8 +/- 8.37, la edad promedio de la atrofia óptica fue de 12.2 +/- 6.37 años, De los cinco pacientes, cuatro presentaban manifestaciones psiquiátricas y neurodegenerativas, tres tenían alteraciones auditivas, y todos presentaron alteraciones urológicas.



## 1.8. Síndrome de Wolfram like

En 2006, Eiberg et al describieron por primera vez la asociación de atrofia óptica e hipoacusia en cuatro individuos de una familia danesa, los cuatro pacientes presentaban hipoacusia, predominantemente a bajas frecuencias; además, dos de ellos mostraron cifras glicémicas compatibles con intolerancia a la glucosa. En primera instancia se descartó que fueran portadores de variantes patogénicas en los principales genes asociados con atrofia óptica (OPA1, OPA3, OPA4, OPA5, GJB2 y GJB6). Por análisis de haplotipos y posteriormente secuenciación, se describió una mutación en estado heterocigoto en *WFS1*, la variante correspondía a un cambio de G>A en la posición 2590, lo que conllevaba a un cambio en la secuencia de aminoácidos E864K. La mutación confería un cambio en la región C-terminal, al sustituir ácido glutámico, un aminoácido sin carga, por una lisina, con carga positiva. Dicha región está altamente conservada entre especies, por lo que el cambio sugirió patogenicidad.

Posteriormente, en 2008, Valéro et al., describieron una segunda familia con en la que dos miembros presentaban diabetes mellitus tipo 2 e hipoacusia, ambos resultaron portadores en estado heterocigoto de la misma variante descrita por Eiberg (2006). En este estudio, se descartó que la variante estuviera presente en 100 controles sanos.

A raíz de estos dos reportes, se hipotetizó que ciertas variantes en estado heterocigoto, especialmente aquellas localizadas en la región C-terminal, conferían cambios en la estructura proteica, conllevando a desregulación en la función; predisponiendo así a los pacientes a presentar características del espectro de síndrome de Wolfram, como la atrofia óptica, hipoacusia y diabetes mellitus, aunque a edades más avanzadas; además de descartarse las otras manifestaciones del síndrome como alteraciones neurológicas, psiquiátricas y diabetes insípida.



## 1.9 Diagnósticos diferenciales

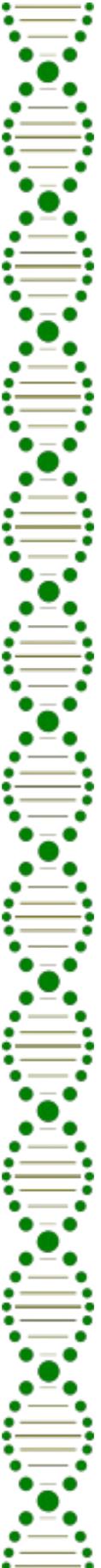
Existen diversos diagnósticos que pueden sobrelapar la clínica del síndrome e Wolfram; entre las entidades que presentan diabetes mellitus y alteraciones neurodegenerativas, se encuentran:

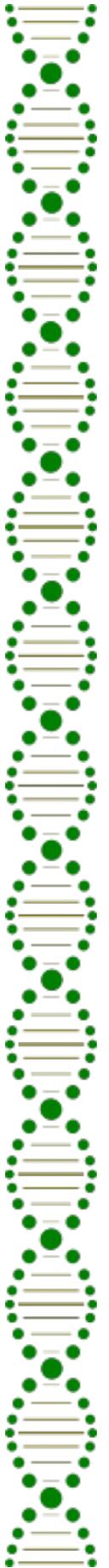
1. **Síndrome de Alstrom:** el cual se caracteriza por distrofia de conos-bastones, hipoacusia neurosensorial progresiva, cardiomiopatía, y resistencia a la insulina. Dentro de las manifestaciones endocrinológicas, destaca hipogonadismo hipogonadotrófico, ovario poliquístico e hipotiroidismo. Casado por mutaciones en el gen *ALMS1*, con forma de herencia autosómica recesiva.
2. **Síndrome de Bardet-Biedl:** caracterizado por distrofia de conos-bastones, obesidad truncal, polidactilia posaxial, déficit intelectual, malformaciones genitourinarias e hipogonadismo hipogonadotrófico.
3. **Ataxia de Friedreich:** ataxia lentamente progresiva, de inicio antes de los 25 años, generalmente se asocia disartria, debilidad muscular, espasticidad, escoliosis, vejiga neurogénica, Dos tercios de los pacientes presentaran cardiomiopatía, un 25% diabetes mellitus. Asociado a expansión de repetidos en el intrón 1 del gen *FXN*.
4. **Síndrome de anemia megaloblástica respondedora a tiamina:** se caracteriza por anemia megaloblástica, hipoacusia, diabetes mellitus. Esta enfermedad tiene la particularidad de responder a tiamina (vitamina B1). Causada por mutaciones en el gen *SLC19A2*, con forma de herencia autosómica recesiva.
5. **Síndrome de Kearns-Sayre:** es causado por deleciones en DNA mitocondrial, clínicamente se caracteriza por oftalmoplejía externa progresiva, retinitis pigmentaria, debilidad muscular, hipoacusia, diabetes mellitus, bloqueos de conducción cardíaca y proteinorrea. Con forma de herencia mitocondrial.

Las entidades que presentan atrofia óptica e hipoacusia como manifestaciones principales, se encuentran:

1. **Atrofia óptica tipo 1:** se caracteriza principalmente por atrofia óptica progresiva, que inicia entre los 4 y 6 años de edad, con las complicaciones oftalmológicas que esto implica. Puede acompañarse de hipoacusia neurosensorial, que va de rangos desde profunda de manera congénita, hasta subclínica. Causada por mutaciones en gen *OPA1*, con modo de herencia autosómica dominante.

2. **Síndrome de hipoacusia, distonía y neuropatía óptica:** hipoacusia neurosensorial pre o poslingual, atrofia óptica alrededor de la segunda década de la vida; y demencia. Entidad causada por mutaciones s en el gen *TIMM8A*, con modo de herencia ligado a X.





## 1.10. Correlación fenotipo-genotipo

A raíz del descubrimiento de las bases moleculares de la entidad, se ha intentado determinar la historia natural de las distintas manifestaciones clínicas que caracterizan la entidad; sin embargo, la complejidad molecular, el amplio espectro de las manifestaciones y el número pequeño de pacientes en las cohortes reportadas, han complicado el establecimiento de una posible correlación fenotipo-genotipo.

Distintas mutaciones en *WFS1*, se han asociado con fenotipos más leves o graves del síndrome; sin embargo, al comparar las distintas cohortes, las contradicciones comienzan a evidenciarse; Cano y colaboradores (2007) realizaron una correlación fenotipo-genotipo en una cohorte francesa de 31 pacientes, en el análisis se incluyeron a los homocigoto o heterocigotos compuestos, se excluyeron a 4 pacientes heterocigotos. A los 27 pacientes se les clasificó en dos grupos por genotipo: genotipo 1, fueron 19 pacientes, no presentaban mutaciones sin sentido, y genotipo 2, 9 pacientes, al menos una mutación sin sentido. Reportaron que los pacientes con genotipo 1 presentaban a edades más tempranas diabetes mellitus y atrofia óptica, con una media de 5 y 8 años respectivamente en comparación con pacientes del genotipo 2, quienes presentaban estas manifestaciones a una edad media de 10.5 y 16 años, este hallazgo resulta estadísticamente significativo. Además, con el fin de incrementar el potencial del análisis estadístico, prosiguieron a realizar un metaanálisis donde incluyeron la información fenotípica y genotípica de cinco cohortes, obteniendo un total de 96 casos, los cuales dividieron en tres grupos genotípicos, A: 58 pacientes sin mutación sin sentido, B: 27 pacientes con una mutación sin sentido, C: 11 pacientes con dos mutaciones sin sentido. La edad de presentación de la diabetes mellitus fue antes en el grupo A (media de edad de 5 años), que en el grupo B y C (media de 9 y 12 años respectivamente); la atrofia óptica también apareció antes en el grupo A (media de 10 años) en comparación con los otros dos (media 11 y 14 años). La hipoacusia y diabetes insípida no difirieron en edad de presentación entre los grupos.

Chaussonot y colaboradores (2010) no encontraron una asociación entre el genotipo de los pacientes y las manifestaciones neurológicas, cuyos hallazgos en estudios de resonancia se describieron previamente. Por otra parte, Royahem y colaboradores (2011) analizaron una cohorte de 50 pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Wolfram, de estos, en 34 pacientes se corroboró una mutación en *WFS1*.

Se dividió a estos 34 pacientes en 3 grupos, de acuerdo a la pérdida de función proteica en: grupo 1: individuos con mutaciones con predicción de pérdida de función total, incluyendo mutaciones sin sentido o corrimiento de marco de lectura en la porción N-terminal; grupo 2: individuos con mutaciones con predicción de pérdida parcial de la función, incluyendo mutaciones sin sentido o corrimiento del marco de lectura en la región C-terminal; grupo 3: individuos portadores de mutaciones puntuales con pérdida mínima de la función proteica, incluyendo mutaciones de sentido erróneo. La comparación entre estos tres grupos arrojó significancia estadística en la edad de inicio de la diabetes mellitus, ya fue a menor edad, en aquellos pacientes portadores de mutaciones que se predecía provocaban una pérdida total de la función proteica, conclusión ya propuesta por Cano et al.

En 2013, De Heredia y colaboradores, hacen una recopilación de las distintas cohortes de pacientes con síndrome de Wolfram, analizando y comparando las mutaciones y fenotipos de 412 pacientes; con el fin de actualizar la información de la historia natural de la enfermedad y correlacionar las manifestaciones clínicas con las mutaciones en *WFS1*, tomando en cuenta una nueva clasificación genotípica que consideraba el efecto mutacional sobre la expresión proteica y estimar por primera vez, el rango de progresión del síndrome. Se obtuvo la información de 412 pacientes de 49 referencias, se excluyeron pacientes de quienes no se contó con la información esencial, quedando un total de 392 pacientes. Se procedió a realizar una clasificación mutacional, basándose en el efecto predictivo de la proteína: tipo I: depleción completa de la wolframina, tipo II: degradación completa de la proteína, tipo III: proteína con expresión reducida o más pequeña. A la par se realizó una clasificación genotípica: A: sin producción de wolframina (A1: degradación de mRNA, A2 degradación de mRNA y proteína, A3 degradación proteica), B: expresión reducida de una proteína ineficiente y C: expresión normal de una proteína deficiente. En sus resultados, reportaron la frecuencia y edad de inicio de las manifestaciones de los 392 pacientes, siendo de la siguiente manera: 98.2% tenían diabetes mellitus (DM), 82.14% atrofia óptica (AO), 48.21% hipoacusia neurosensorial (HN), 37.76%, diabetes insípida (DI) 19.39%, manifestaciones urológicas (AU) 17.09%, alteraciones neuropsiquiátricas (AN) 7.40%. La DM fue diagnosticada en la primera década de la vida, la AO a inicios de la segunda, DI e HN durante la segunda década, AU y AN durante la tercera. Estos porcentajes fueron similares a los previamente reportados. La edad media de muerte fue 27 +/- 11.4 años, con dos picos de mayor frecuencia, a los 24 y 45 años. De los 392 pacientes, únicamente 110 (28.06%) presentaban el fenotipo clásico de DIDMOAD. Una posibilidad, es que las manifestaciones son dependientes de edad, y algunos de estos eran muy jóvenes cuando fue reportado su caso.





Posteriormente, procedieron a analizar la distribución genotípica, 337 de los 412 pacientes presentaban al menos una mutación en *WFS1*, los 75 pacientes restantes, o no tuvieron acceso al estudio molecular, no se evidenció una mutación o los datos no estuvieron disponibles. Treinta y cuatro pacientes presentaron mutación en estado heterocigoto, de estas, cuatro han sido reportadas en el síndrome de Wolfram-like. Las 178 mutaciones descritas, están distribuidas a lo largo de la proteína, se concentraron en dominios transmembrana, una región importante para degradación (degradon), sitios de glicosilación, en el dominio N-terminal (94-237 aa) y en los últimos 100 aminoácidos. No se identificó ninguna mutación fundadora, y solamente 6 de ellas están presentes en >5% de los casos (c.2649delC 7.42%, c.1230\_1233del 6.82%, c.409\_424dup 6.53%, c.2119G>A 6.23%, c.1362\_1377del 5.64%, c.1243\_1245del 5.34%). La alta heterogeneidad en las mutaciones conlleva a dificultades para el establecimiento de una correlación fenotipo-genotipo; se procedió a clasificar estas mutaciones, de acuerdo a la clasificación previamente comentada, 5.62% fueron tipo I, 55.61 tipo II, 38.20% tipo III. En cuanto a la clasificación genotípica 51.9% de los pacientes fueron clase A, 19% clase B y 29.1 clase C. En cuanto sus resultados en correlación fenotipo-genotipo, describieron que los pacientes con clasificación genotípica C presentaban a edades más tempranas la mayoría de las manifestaciones clínicas, los de clase A1 presentaban DM a edades más tempranas, los pacientes con clase A2 desarrollaban DI y AO antes; esto concordó con los dos picos de incidencia observados durante el análisis de las manifestaciones clínicas. Además, observaron que los picos reportados en mortalidad, el primero (25 años) correspondía con pacientes en clasificación C y el segundo (45 años) a la clasificación B y C.

Es importante destacar que, en las distintas cohortes reportadas, no existen regiones con mayor susceptibilidad a mutación, y pocas mutaciones se observan en más de una familia, considerándose mutaciones privadas. Hasta el momento se han descrito alrededor de 230 mutaciones distintas, A continuación, se anexa lista de base de mutaciones para síndrome de Wolfram.

[https://lovd.eurowabb.org//home.php?select\\_db=WFS1](https://lovd.eurowabb.org//home.php?select_db=WFS1).

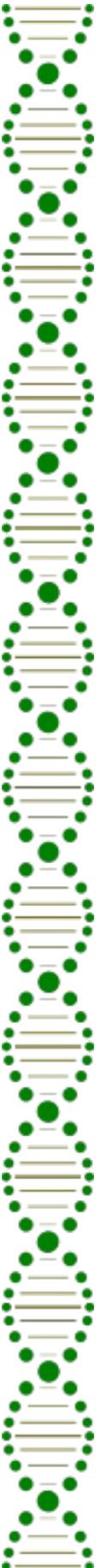


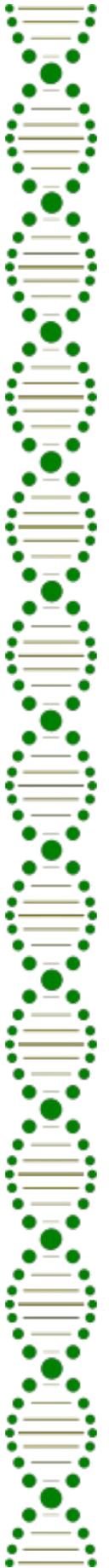
### 1.11. *WFS1* asociado a otros diagnósticos

Si bien, el enfoque de este trabajo, es la descripción clínica y genotípica de pacientes con síndrome de Wolfram, es importante conocer, que conforme avanza la tecnología de técnicas moleculares, y cada vez más pacientes son sometidos a pruebas de este tipo, se ha asociado que variantes patogénicas en estado heterocigoto en *WFS1* se relacionan con diabetes mellitus 2, tanto riesgo incrementado, como reporte de una familia con herencia autosómica dominante (Bonnycastle et al. 2013), hipoacusia neurosensorial 6/14/38, síndrome de Wolfram like y catarata 41. En la siguiente tabla, se muestra la información comentada.

**Tabla 3. Otros fenotipos asociados a *WFS1*.**

LOCUS	FENOTIPO	NO. OMIM	HERENCIA
<i>WFS1</i> 4p16.1	Catarata 41	116400	AD
	Hipoacusia autosómica dominante 6/14/38	125853	AD
	Síndrome de Wolfram-like	222300	AD
	Asociación con diabetes mellitus no insulino-dependiente	125853	AD





## 2. Planteamiento del problema y justificación

El síndrome de Wolfram pertenece al grupo de enfermedades huérfanas, caracterizada por la triada clásica de diabetes de inicio temprano, atrofia óptica bilateral e hipoacusia neurosensorial de alta frecuencia. Su prevalencia fue estimada por Barret et al (1995) en Reino Unido, y fue de 1 en 770 000 individuos; sin embargo, se desconoce su prevalencia en América Latina. Es importante que médicos en distintos niveles de atención estén sensibilizados ante esta entidad, ya que podría estar infradiagnosticada en la población de pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Por otro lado, a pesar de que esta entidad segrega de forma autosómica recesiva, la detección de portadores es relevante, ya que ciertas variantes de sentido erróneo en estado heterocigoto, se asocian con síndrome de Wolfram like, hipoacusia neurosensorial de baja frecuencia, riesgo incrementado para diabetes mellitus tipo 2 y trastorno depresivo mayor. Finalmente, aportar más datos sobre esta entidad en México, puede ayudar al entendimiento de la historia natural de la enfermedad y con ello identificar de manera temprana las complicaciones en los pacientes, resultando en una mejor calidad de vida y pronóstico.



### 3. Objetivos



#### Objetivo general

Describir las características clínicas y espectro genotípico del gen *WFS1*, en pacientes que cumplen criterios clínicos para síndrome de Wolfram.



#### Objetivos específicos:

1. Describir la frecuencia y edad de presentación de las manifestaciones clínicas, en los pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Wolfram
2. Describir el control y las complicaciones de la diabetes mellitus asociada a síndrome de Wolfram
3. Describir el tipo y frecuencia de mutaciones puntuales en el gen *WFS1*
4. Determinar si existe una relación entre el tipo de mutación y la presentación de las manifestaciones clínicas



## **4. Material y métodos**



### **4.1. Diseño del estudio:**

Se trata de un estudio descriptivo, transversal y retrolectivo.



### **4.2. Población de estudio:**

Casos de pacientes con diagnóstico clínico o molecular de síndrome de Wolfram, pertenecientes el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición e Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, en un periodo comprendido entre primero de enero 1999 a 30 de mayo 2019.



### **4.3. Tamaño de la muestra:**

Se incluyeron 19 pacientes (10 hombres y 9 mujeres), provenientes de 12 familias mexicanas.



#### 4.4. Criterios de selección:

#### Criterios de inclusión:

Individuos que cumplieran con al menos dos de las siguientes características:

- Diabetes mellitus de edad temprana de aparición (<18 años) con anticuerpos negativos y en tratamiento con insulina
- Atrofia óptica bilateral
- Hipoacusia neurosensorial
- Individuos con diagnóstico clínico de síndrome de Wolfram
- Individuos con diagnóstico molecular de síndrome de Wolfram

#### Criterios de exclusión:

Individuos con atrofia óptica bilateral de otra etiología

#### Criterios de eliminación:

Individuos con expediente clínico incompleto



## Estructura de la base de datos:

Se obtuvo de la base de datos del archivo clínico de ambos institutos, la relación de pacientes que conjuntaran, al menos dos criterios diagnósticos de diabetes mellitus de inicio temprano, atrofia óptica bilateral e hipoacusia neurosensorial; de acuerdo con los códigos del CIE10. En un periodo comprendido entre enero 1999 a mayo 2019. La información se capturó en una base de datos, con las siguientes variables:



### 4.5. Variables:

Para este estudio se consideraron treinta y nueve variables, clasificadas en cuatro grupos: tres variables de datos generales, tres de antecedentes familiares, veintiuno de manifestaciones y doce de biología molecular.

El grupo de variables de datos generales incluye: sexo, edad y lugar de origen; el de antecedentes familiares incluye: parientes con síndrome de Wolfram o con alguna de sus manifestaciones fenotípicas, consanguinidad y número de casos por familia.

En el grupo de manifestaciones clínicas se incluye: edad de diagnóstico del SW, edad de diagnóstico de diabetes mellitus, última medición de glucosa, última medición de hemoglobina glucosilada; edad de diagnóstico de atrofia óptica, edad de diagnóstico de hipoacusia, audiometría, edad de diagnóstico de diabetes insípida, edad de diagnóstico y tipo de manifestaciones neurológicas, psiquiátricas, urológicas, endocrinológicas y gastroenterológicas, y otras manifestaciones clínicas no asociados al SW. Se incluyeron estudios e interpretación de imagen cerebral y renal.

El grupo de estudios de biología molecular fueron los resultados de la secuenciación de muestras de ADN de los casos, madre y padre (cuando disponibles), que comprendía, variantes alélicas identificadas, localización exónica, localización de los cambios en dominios proteicos y tipo de mutación.





### 4.7.3. Amplificación de los fragmentos del gen *WFS1*

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron los exones codificantes del gen *WFS1*, es decir exones 2,3,4,5,6 y7. Esto se realizó, utilizando oligonucleótidos específicos para cada exón, dado el tamaño del exón 8, se realizaron varios oligonucleótidos para esta región. A continuación, se muestran los oligonucleótidos utilizados y la temperatura media.

Tabla 4. Oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados en amplificación de fragmentos del gen *WFS1*

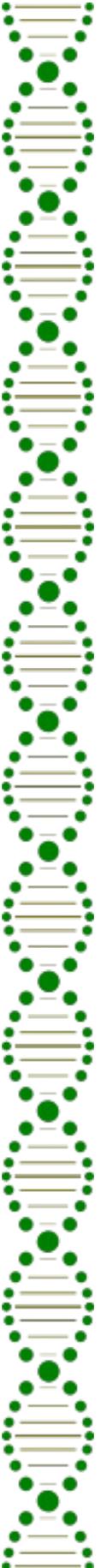
EXON	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	TM °C
2	5'-GCAGACACTAAGTGCCAGA-3'	5'-CTGAACTGCAGAGGACCTG-3'	56
3	5'-GCAGCAGCAGATCTGAAGA-3'	5'-TCTCAGGCACCGACACTTCT-3'	56.6
4	5'-GAAGTGGGTGAAAGGAGGT-3'	5'-CAGTTAGCAAGCATTAC-3'	53.9
5 y 6	5'-GTCAGAGTGGCACCGAAAGC-3'	5'-TCGCCCTGCAGGTGCAGGCTGGGA-3'	65.1
7	5'-ATTGCTCTGTGTGAGGGTG-3'	5'-CCTGCCTGAGGTGCGCGAGT-3'	62.8
8 (1)	5'-TTGCCAGAGGCAGGGTGGT-3'	5'-ATGGAGGGCAGCAGCGATAGCA-3'	61.3
8 (2)	5'-ATCCCCTGCTCGGAGCTGGCT-3'	5'-AGTTGTAGACCTTCATGCC-3'	63
8 (3)	5'-CAAGGCCAGCTTCTCTGTGGT-3'	5'-ATGGCCTTGAGCTCGAAGACA-3'	59.1
8 (4)	5'-CAAGGACATCGTGCTGCGGGC-3'	5'-AGTCTGCACACGTGGGCACA-3'	63
8 INTRON	5'-GAACTTCCGCACCCTCACCGA-3'		

Se realizó una mezcla de reacción de PCR que contenía 20  $\mu\text{l}$  del mix de reacción HotStarTaq Plus (Qiagen®) y 0.25  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido en un volumen final de 40  $\mu\text{l}$  el cual fue ajustado con agua libre de DNAsas. La amplificación de los fragmentos se realizó en el termociclador GeneAmpPCR System 9700 (Applied Biosystems, Thermo Fisher®) de acuerdo con el siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 95 °C/ 10 min
2. Desnaturalización: 95 °C/ 30 s
3. Alineamiento/hibridación: temperatura variable /30 s
4. Extensión/elongación: 72°C/ 40 s
5. Repetir los pasos 2-4 por 34 ciclos mas
6. Fase final de extensión: 72 °C/ 10 min

#### 4.7.4. Evaluación y purificación de los fragmentos amplificados

La cantidad y la longitud de los fragmentos amplificados se evaluaron mediante la separación por electroforesis en el gel de agarosa al 1.0%. La purificación de los productos de PCR se realizó mediante separación en columna usando el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.



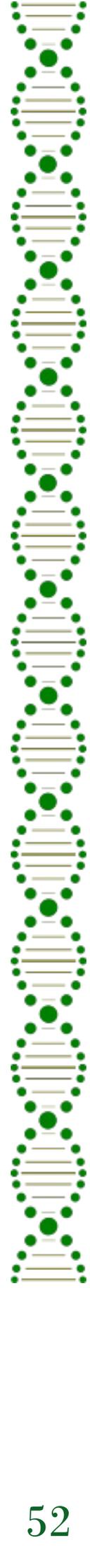


#### 4.7.5. Secuenciación Sanger del gen *WFS1*

La secuenciación directa es un método de secuenciación de primera generación desarrollado por Sanger (Sanger et al 1977), se basa en la síntesis de una sola cadena de ADN, mediante PCR usando la mezcla de deoxinucléotidos (dNTPs) y dideoxinucléotidos (ddNTPs), donde estos últimos cumplen la función de la terminación de la síntesis de la cadena, al carecer de un grupo hidroxilo en el extremo 5'. La separación y visualización de los fragmentos se realiza usando equipos automatizados de electroforesis capilar.

Para la secuenciación del gen *WFS1*, se utilizó la mezcla comercial de reactivos BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ThermoFisherScientific®). Cada reacción de secuencia incluyo los siguientes componentes: 2 µl de BigDye 10X, 3 µl de buffer 5x incluido en el kit, 1 µl del oligonucleótido (sentido o antisentido) a una concentración 10 mM, 5 µl del producto amplificado y purificado de PCR, 8 µl de agua libre de DNAasas en un total de 20 µl. La reacción de secuenciación se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific®), de acuerdo al siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 96 °C/ 3 min
2. Desnaturalización: 95 °C/ 10 s
3. Alineamiento/hibridación: 52 °C/15 s
4. Extensión/elongación: 60°C/ 2 min
5. Repetir los pasos 2-4 por 34 ciclos mas
6. Fase final de extensión: 60 °C/ 3 min



#### **4.7.6. Purificación de los productos de la reacción de secuencia**

Los productos de la reacción de secuencia contienen sales dNTPs, ddNTPs, y otros productos no puros de bajo peso molecular, que podrían afectar la resolución y la intensidad de la señal durante la electroforesis capilar. Con el fin de poder eliminar dichas impurezas, se realizó purificación de las reacciones de secuencia mediante separación por centrifugación en columna de gel usando las comunas comerciales Centri-Sep (ThermoFisher Scientific®).

#### **4.7.7. Análisis de los productos de la reacción de secuencia mediante electroforesis capilar**

Los productos de la reacción de secuencia purificados y deshidratados se resuspendieron en 15 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific®), se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos y se analizaron en el equipo ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific®).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia de referencia del gen WFS1, con localización 4: 6303573 de la versión GRCh38.p7 del genoma humano (Genome-NCB1-2005-).

#### **4.7.8. Identificación de mutaciones y análisis**

Se analizaron los electroferogramas de secuenciación y se consultaron las bases de mutaciones (ExAC, gnomAD, 1000 Genomes, ClinVar, lovd.eurowabb y PubMed). En el caso de mutaciones nuevas utilizamos programas en línea disponibles para determinar el efecto biológico funcional de la mutación en la proteína codificada. Los programas utilizados fueron:

1. Mutation Taster
2. Poly-Phen
3. MCAP
4. Human Splicing Finder

## 5. Resultados

### 5.1. Resultados análisis clínico

Se incluyeron 19 casos, de 12 familias, no relacionadas, de distintas áreas geográficas del país, con diagnóstico clínico y molecular de síndrome de Wolfram o síndrome de Wolfram like; para la descripción y evaluación de las manifestaciones clínicas y características genotípicas.

#### Características demográficas:

Un total de 19 individuos, de 12 familias no relacionadas, diez varones y nueve mujeres. Las familias son originarias de los siguientes estados: Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Morelos, Hidalgo, Guerrero, Querétaro y Veracruz. En cuanto a los datos de consanguinidad y endogamia, ocho familias desconocían esta información, en dos fue positiva y en dos fue negada.



Fig. 14. Imagen donde se muestra procedencia de las familias.



## Antecedentes heredofamiliares:

Se recabó la genealogía de las doce familias, se describió el número de casos por familia, así como probables datos de consanguinidad y endogamia. Siete familias contaban con un solo caso, tres familias con dos casos, una familia con tres casos y por último una familia en la que toda la hermandad se encontraba afectada, con un total de cuatro casos.

En la familia 3, existen dos casos, el segundo caso es primo en segundo grado de la probando; existen datos de consanguinidad dos generaciones previas. La familia 5, caso único en la familia, con datos de consanguinidad cinco generaciones previas.

La familia 8, con toda la hermandad afectada, tres de los cuatros casos fueron incluidos en este estudio, ya que el cuarto caso falleció, debido a complicaciones de la entidad. La familia 12, caso único en la familia, desconocemos antecedentes de familia biológica, ya que fue adoptada.

**Tabla 5. Muestra cuantos casos fueron únicos o múltiples**

<b>ANTECEDENTES FAMILIARES</b>	
<b>Familias</b>	12
<b>Caso único</b>	7
<b>Dos casos</b>	3
<b>Tres casos</b>	1
<b>Cuatro casos</b>	1





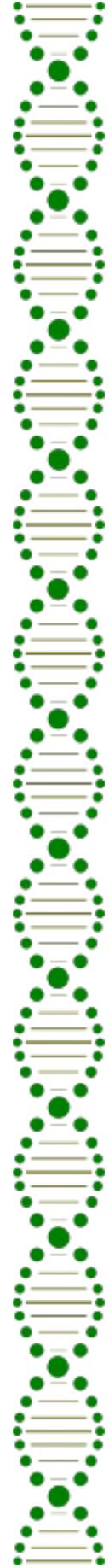
## Características demográficas:

La edad promedio para integrar el diagnóstico clínico de síndrome de Wolfram fue de 15.21 años, con un mínimo de edad de 6 años y un máximo de 30 años. En aquellas familias con más de un caso, el diagnóstico en la hermandad se hizo de forma más temprana.

**Tabla 6. Distribución por sexo, edad del diagnóstico y antecedentes de consanguinidad.**

**\*\* En edad de diagnóstico, se excluyeron edades de casos con probable WL**

<b>CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS</b>	
<b>Total casos</b>	<b>19</b>
<b>Familias</b>	<b>12</b>
<b>Distribución por sexo</b>	<b>10 (52.6%) varones</b>
	<b>9 (47.3%) mujeres</b>
<b>Edad de diagnóstico **</b>	<b>13 años promedio</b>
	<b>25 años máximo</b>
	<b>5 años mínimo</b>
<b>Consanguinidad</b>	<b>8 desconoce</b>
	<b>2 positiva</b>
	<b>2 negada</b>



## Manifestaciones clínicas:

La manifestación más frecuente, así como la primera en presentarse fue diabetes mellitus en 18 (94.73%) de los diecinueve casos, situación que va acorde con la literatura; seguida de esta, se presentó atrofia óptica bilateral en 17 (89.47%) de los casos, posteriormente hipoacusia neurosensorial y alteraciones psiquiátricas en 9 (47.36%) casos, las alteraciones neurológicas se presentaron en 7 (36.84) de los casos, las manifestaciones urológicas en 6 (31.57%) casos, mientras que la diabetes insípida y las manifestaciones gastrointestinales en 4 pacientes (21%).

A continuación, se muestra tabla con las manifestaciones clínicas, y el porcentaje de afectados.

Tabla 7. Frecuencia absoluta y porcentaje de manifestaciones clínicas.

<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>No. Casos</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b><i>Diabetes Mellitus</i></b>	18	94.73
<b><i>Atrofia óptica</i></b>	17	89.47
<b><i>Hipoacusia</i></b>	9	47.36
<b><i>Diabetes Insípida</i></b>	4	21.05
<b><i>Neurológicas</i></b>	7	36.84
<b><i>Psiquiátricas</i></b>	9	47.36
<b><i>Urológicas</i></b>	6	31.57
<b><i>Endocrinológicas</i></b>	7	36.84



## Manifestaciones clínicas por género:

Al separar la frecuencia de las manifestaciones clínicas por sexo, se observó que todas las manifestaciones eran más frecuentes en el sexo masculino, a excepción de las endocrinológicas. A continuación, se muestra una tabla con la cantidad de casos presentando determinada manifestación, separado entre varones, mujeres y los dos casos con síndrome de Wolfram-like.

**Tabla 8. Frecuencia absoluta y porcentaje de manifestaciones clínicas, en casos con síndrome de Wolfram y síndrome de Wolfram like, dividido por género**

MANIFESTACIONES CLÍNICAS					
	Varones	Porcentaje (%)	Mujeres	Porcentaje (%)	WL
<b>Diabetes Mellitus</b>	<b>10</b>	<b>100.00</b>	<b>7</b>	<b>100</b>	<b>1</b>
<b>Atrofia Óptica</b>	<b>9</b>	<b>90.00</b>	<b>6</b>	<b>85.7</b>	<b>2</b>
<b>Hipoacusia</b>	<b>6</b>	<b>60.00</b>	<b>2</b>	<b>28.57</b>	<b>1</b>
<b>Psiquiátricas</b>	<b>6</b>	<b>60.00</b>	<b>2</b>	<b>28.57</b>	<b>1</b>
<b>Neurológicas</b>	<b>4</b>	<b>40.00</b>	<b>2</b>	<b>28.57</b>	<b>1</b>
<b>Endocrinológicas</b>	<b>3</b>	<b>30.00</b>	<b>3</b>	<b>42.8</b>	<b>1</b>
<b>Urológicas</b>	<b>4</b>	<b>40.00</b>	<b>2</b>	<b>28.57</b>	<b>0</b>
<b>Diabetes Insípida</b>	<b>3</b>	<b>30.00</b>	<b>1</b>	<b>14.28</b>	<b>0</b>

Posteriormente se procedió a analizar la cantidad de casos que cumplían con las tres manifestaciones cardinales, que son diabetes mellitus, atrofia óptica e hipoacusia neurosensorial.

De los 19 casos, 7 presentaban la tríada clásica, otros 9 casos, presentaban diabetes mellitus y atrofia óptica, únicamente un caso presentó atrofia óptica junto con hipoacusia, este caso era uno de los Wolfram-like. Dos casos, procedentes de la misma familia, presentaban únicamente diabetes mellitus de inicio temprano. En ellos, el diagnóstico se sospechó por la presencia de un hermano mayor afectado.

Tabla 9. Frecuencia absoluta de casos con tres, dos y una, de las manifestaciones características.

Manifestaciones clínicas	No. Casos
Diabetes Mellitus + Atrofia Óptica + Hipoacusia Neurosensorial	7
Diabetes Mellitus + Atrofia Óptica	9
Atrofia Óptica + Hipoacusia Neurosensorial	1
Diabetes Mellitus	2

### Edades de presentación:

La mediana de diagnóstico del síndrome fue de 14 años; la diabetes mellitus fue la primera manifestación en los 18 casos que la presentaban, la mediana de edad de esta, fue de 4 años; la de la atrofia óptica fue de 12 años, para la hipoacusia neurosensorial de 14 años.

Al separar por sexo, la mediana de edad de diagnóstico de la entidad en varones fue de 12.5 años, la mediana de diagnóstico de diabetes mellitus, atrofia óptica e hipoacusia neurosensorial fue de 4, 9 y 14.5 años, respectivamente; para las mujeres con diagnóstico de síndrome de Wolfram, la mediana de diagnóstico de la entidad fue de 20 años, la mediana para diabetes mellitus, atrofia óptica e hipoacusia neurosensorial fueron de 4, 16 y 10 años respectivamente. Para los casos con síndrome de Wolfram-like, el diagnóstico de la entidad se realizó en un promedio de 29 años, y el de la atrofia óptica fue de 20 años, la diabetes mellitus y la hipoacusia neurosensorial no fue calculada, ya que estas manifestaciones no eran compartidas entre los casos.

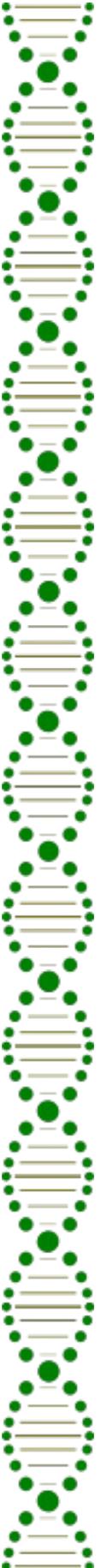


Tabla 10. Mediana y percentiles 25 y 75 en edades de presentación de las distintas manifestaciones en varones y mujeres con síndrome de Wolfram y los dos casos con síndrome de Wolfram-like.

EDAD DE PRESENTACIÓN							
Manifestaciones clínicas	Varones			Mujeres			SW-L
	Mediana	p25	p75	Mediana	p25	p75	Mediana
Diagnóstico entidad	12.5	7.5	14.5	20	9	23	29
Diabetes Mellitus	4	3.5	6	4	2	7	
Atrofia Óptica	9	6.5	15.75	16	8.25	20.5	20
Hipoacusia neurosensorial	14.5	11.25	18	10			
Alt. Psiquiátricas	13	7	20	29.5			
Alt. Neurológicas	25	15.5	27	28	25	31	
Alt. Endocrinológicas	23	17	26	12	10	12	
Alt. Urológicas	14.5	8.5	20.5	20.5			
Diabetes Insípida	17	16	21				

### Análisis por familias:

La familia 8 y 11 tienen tres casos cada una, se analizó la variabilidad intrafamiliar. Iniciando con la familia 8, casos 9,10,11, fueron diagnosticados a los 8, 13 y 5 años respectivamente. Todos cuentan con el diagnóstico de diabetes mellitus, atrofia óptica, hipoacusia neurosensorial y trastorno depresivo; el caso 10 y 11 cuentan además con diagnóstico de diabetes insípida e hipogonadismo hipogonadotrófico; mientras que el caso 9 y 10 comparten el diagnóstico de epilepsia.

La familia 11, incluye los casos 16, 17 y 18, con edad de diagnóstico de la entidad a los 14, 10 y 9 años respectivamente. Los tres casos cuentan con diagnóstico de diabetes mellitus a los 4, 2 y 2 años; únicamente el caso 9 tiene atrofia óptica, el caso 16 con papila pálida; al caso 17, se le realizó diagnóstico de hipoacusia neurosensorial a los 9 años. A continuación, se muestra tabla con edades de presentación de las distintas manifestaciones en las dos familias.

Tabla 11. Edades de diagnóstico de las manifestaciones clínicas en I familia 8 y 11.

EIDADES DE DIAGNÓSTICO DE MANIFESTACIONES CLÍNCIAS						
	Familia 8			Familia 11		
Manifestaciones clínicas	Caso 9	Caso 10	Caso 11	Caso 16	Caso 17	Caso 18
Diabetes Mellitus	7	10	5	4	2	2
Atrofia Óptica	8	18	8			9
Hipoacusia Neurosensorial	17	21	15		9	
Psiquiátricas	7	26	18			
Neurológicas	23	27				
Endocrinológicas		26	23			
Urológicas		21				
Diabetes Insípida		21	16			

## Diabetes mellitus:

Se estimó el promedio de valores de glucosa en suero y hemoglobina glicosilada de acuerdo a los últimos reportes de laboratorio de cada paciente. El promedio de los niveles de glucosa en suero fue de 158.8 mg/dl, con un máximo de 316 y un mínimo de 75 mg/dl; mientras que el promedio del nivel de hemoglobina glicosilada, fue de 8.45%, con un máximo de 17.6 y un mínimo de 8%. Con dichas cifras, resulta evidente el descontrol glicémico en que se encontraban todos los pacientes. Únicamente el caso 19, no contaba con diagnóstico de diabetes mellitus, sin embargo, en cifras de glucosa sérica en ayuno del 2013, presentó en tres ocasiones, cifras entre 115 y 157 mg/dl.

Los 18 casos se encontraban en tratamiento con insulina, de los nueve casos en los que se pudo recabar la información sobre el esquema, cinco se encontraban en tratamiento combinado con insulina de acción intermedia e insulina de acción rápida; tres casos se encontraban en tratamiento con insulina de acción prolongada y rápida; mientras que un paciente era portador de bomba microinfusora. con esquema.

Las complicaciones de esta manifestación fueron, múltiples eventos de cetoacidosis diabética en el caso 2. A pesar del descontrol glicémico, y el mal apego al tratamiento y dieta que se refiere en algunos pacientes, la ocurrencia de cetoacidosis diabética es baja en comparación con los pacientes con diabetes mellitus tipo1. Dos casos con diagnóstico

de retinopatía diabética no proliferativa. En tres casos se reportaba la ocurrencia de eventos de hipoglicemia; finalmente, un paciente con nefropatía diabética, actualmente con insuficiencia renal crónica KDIGO G5, en tratamiento con diálisis peritoneal, actualmente se encuentra en lista de espera para trasplante renal.

**Tabla 12. Características y complicaciones asociadas a diabetes Mellitus.**

<b>DIABETES MELLITUS</b>	
<b>Número de pacientes</b>	<b>18</b>
<b>Mediana edad de presentación</b>	<b>4 años (1 a 14 años)</b>
<b>Promedio de glucosa en suero</b>	<b>158.8 mg/dL</b>
<b>Promedio de HbA1c</b>	<b>8.40%</b>
<b>Complicaciones</b>	<b>3 casos con cetoacidosis diabética</b>
	<b>2 casos con hipoglicemias graves</b>
	<b>1 caso con retinopatía diabética no proliferativa</b>
	<b>1 caso con ERC KDIGO 5</b>

### **Hipoacusia neurosensorial:**

Nueve casos (47.3%) cuentan con el diagnóstico de hipoacusia neurosensorial bilateral, sin embargo, de los diez casos restantes, cuatro no contaban con audiometrías que corroboraran la normoacusia.

En las audiometrías revisadas, el caso 3 presentaba hipoacusia neurosensorial superficial-severa descendente, con patrón típico de alta frecuencia; el caso 9, presentaba hipoacusia neurosensorial moderada ascendente, con reconocimiento de voz preservado; este caso, también presentaba tinnitus, con discriminación del 100%, bilateral, sin regresión fonémica a partir de 40dB. El caso 19 presentaba hipoacusia neurosensorial profunda con configuración audiométrica plana, con reconocimiento de voz perdido, portador de auxiliar auditivo desde hace 5 años.



## Atrofia óptica:

Diecisiete de diecinueve pacientes contaban con diagnóstico de atrofia óptica bilateral. Los casos 16 y 17, en los que no se encontró dicha alteración, pertenecen a la familia 12; el caso 16, actualmente tiene 24 años de edad, el reporte oftalmológico describió papila pálida, con agudeza visual 20/20; mientras que el caso 17, actualmente de 21 años, con un reporte oftalmológico sin alteraciones.

Otras manifestaciones oftalmológicas fueron, catarata y estrabismo en tres casos, únicamente el caso 5 presentó ambas manifestaciones; y dos casos con retinopatía diabética no proliferativa.

**Tabla 13. Otras manifestaciones oftalmológicas presentes en 9 casos.**

<b>OTRAS MANIFESTACIONES OFTALMOLÓGICAS</b>	
<b>Catarata</b>	<b>3</b>
<b>Estrabismo</b>	<b>3</b>
<b>Nistagmus</b>	<b>1</b>
<b>RDNP</b>	<b>2</b>



## Manifestaciones psiquiátricas:

Nueve pacientes presentaron alteraciones psiquiátricas (47.36%). El diagnóstico psiquiátrico más frecuente fue trastorno depresivo mayor, en 5 casos, tres de ellos con al menos un intento suicida: otros dos casos con diagnóstico de trastorno de ansiedad generalizado, un caso con trastorno depresivo mayor y trastorno de ansiedad generalizada y otro con trastorno depresivo mayor y personalidad múltiple.

Tabla 14. Manifestaciones psiquiátricas consignadas en los casos.

<b>MANIFESTACIONES PSIQUIÁTRICAS</b>	
<b>Trastorno depresivo mayor e intento suicida</b>	<b>3</b>
<b>Trastorno Depresivo Mayor</b>	<b>2</b>
<b>Trastorno de Ansiedad Generalizada</b>	<b>2</b>
<b>Trastorno depresivo mayor y trastorno de ansiedad generalizada</b>	<b>1</b>
<b>Trastorno depresivo mayor y personalidad múltiple</b>	<b>1</b>

El tratamiento farmacológico preferentemente utilizado fue uso de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y benzodicepinas en el tratamiento de trastorno de ansiedad generalizada. Dos casos requirieron al menos dos internamientos en institutos psiquiátricos, uno de ellos por brote psicótico y otro por alto riesgo de suicidio.

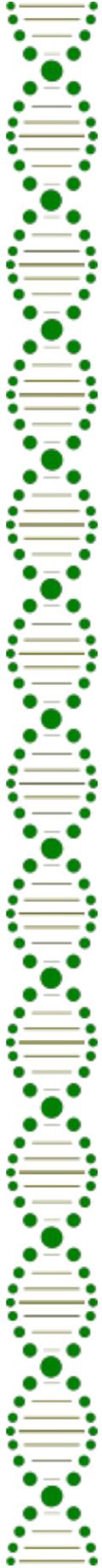


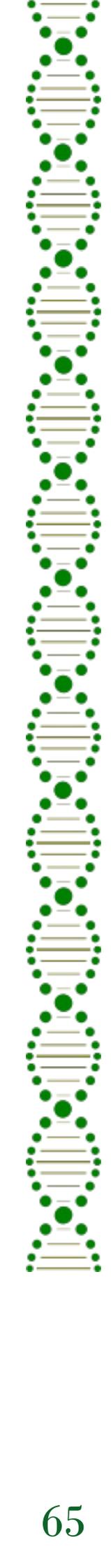
## Manifestaciones endocrinológicas:

Siete pacientes cuentan con al menos un diagnóstico endocrinológico, esto representa el 36.84% de la muestra, con una mediana de edad de presentación de 17 años. Los diagnósticos endocrinológicos fueron: hipogonadismo hipogonadotrófico en un caso; hipogonadismo hipogonadotrófico y dislipidemia mixta en dos casos; hipogonadismo hipogonadotrófico, hipotiroidismo primario y dislipidemia mixta en un caso; hipotiroidismo y dislipidemia mixta en un caso, tiroiditis en uno al igual que bocio tiroideo en otro. De los cuatro casos con hipogonadismo hipogonadotrófico, tres fueron varones, con una edad promedio de diagnóstico de 22.6 años.

Tabla 15. Manifestaciones endocrinológicas consignadas en los casos

Manifestación endocrinológica	No. Pacientes
Hipogonadismo hipogonadotrófico	1
Hipogonadismo hipogonadotrófico + dislipidemia mixta	2
Hipogonadismo hipogonadotrófico + Hipotiroidismo primario + dislipidemia mixta	1
Hipotiroidismo primario + dislipidemia mixta	1
Tiroiditis	1
Bocio tiroideo	1





## Manifestaciones neurológicas:

Siete casos contaban con el diagnóstico de manifestaciones neurológicas, el 36.84%, con una media de edad de 24.04 +/- 5.7 años. Dentro de las manifestaciones reportadas fueron neuropatía periférica en cinco casos, uno de estos pacientes presentaba además anosmia. Otros dos casos (caso 9 y 10) presentaban convulsiones. Un caso, como se mencionó anteriormente, con nistagmus, se desconoce el tipo, finalmente el caso 3, con probable déficit intelectual.

En cuanto a los estudios de imagen cerebral, cinco casos (2,5,6,9 y 10) contaban con al menos uno estudio (cuatro resonancias magnéticas y una tomografía computarizada). En tres casos, los estudios fueron reportados sin evidencia de lesiones intra o extra axiales, el caso 5 contaba con una RMI que reportaba datos compatibles con malformación Chiari tipo II; en nivel medular C4 y C5 área deiringomelia y probable mielomeningocele posterior; mientras que el caso 6, se reportó, evidencia de hipoplasia cerebelosa y disminución del volumen pontino; los cuales son hallazgos frecuentes en estos pacientes.

## Manifestaciones urológicas:

Seis pacientes con diagnóstico de vejiga neurogénica (31.52% de la muestra), con una mediana de edad de diagnóstico de 19.5 años. Esta manifestación fue dos veces más frecuente en varones que en mujeres, además de presentarse a una edad más temprana, con una mediana de 14.5 contra 20.5 años, respectivamente. Cinco de los seis casos con diagnóstico de vejiga neurogénica, contaban además con los siguientes diagnósticos: dos casos con hidronefrosis bilateral, dos casos con ectasia renal y un caso con enfermedad crónica terminal.

Seis casos contaban con USG renal, de los cuales, dos fueron reportados como normales (caso 2 y 15), otros dos casos tenían hallazgos compatibles con ectasia renal (caso 4 y 8), un caso con datos de hidronefrosis bilateral con daño nefrotubular crónico y finalmente un caso con sistemas colectores con prominencia de las pirámides, a nivel del hilio.



## **Diabetes insípida:**

Cuatro pacientes (21.05%), cuentan con el diagnóstico de diabetes insípida central, tratados con desmopresina, con adecuada respuesta. Tres de los cuatro casos son varones, con una mediana de edad de 18.5 años. De los pacientes procedentes del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana se desconoce si se les ha realizado alguna prueba diagnóstica para esta manifestación clínica.

## **Manifestaciones gastrointestinales:**

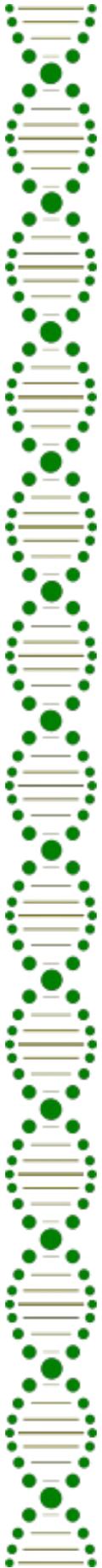
Las manifestaciones gastrointestinales se presentaron en cinco casos, no se especifican edades de diagnóstico. Fueron, estreñimiento crónico, y hepatopatía de origen a determinar, ya se han descartado etiología infecciosa, autoinmune y alcohólica.

## **Otras manifestaciones clínicas:**

A continuación, se describen otras manifestaciones no reportadas en asociación al síndrome de Wolfram, cada manifestación es única para cada paciente, a excepción del seminoma y osteocondroma, los cuales se presentaron en el mismo individuo (caso 11).

Tabla 16. Otras manifestaciones clínicas no relacionadas con la entidad, consignadas en los casos.

OTRAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS		
Afección	Manifestaciones clínicas	No. Individuos
Malformación congénita	Fistula traqueoesofágica	1
	Mielomeningocele + Arnold Chiari II	1
Disautonomía	Taquicardia	1
Esquelética	Escoliosis	1
Misceláneo	LEG	1
	Agranulocitosis idiopática	1
	Hepatopatía congestiva	1
Neoplásicas	Seminoma	1
	Osteocondroma	1
	CaCU	1





## 5.2. Resultados de biología molecular

Posterior a la realización de secuenciación Sanger de los siete exones codificantes del gen *WFS1* (2-7) en los 19 casos, se realizó búsqueda de mutación dirigida en los familiares de primer grado, en quienes fue posible obtener una muestra, con el fin de conocer las variantes de novo, y las heredadas.

Se registraron 15 mutaciones en las 12 familias analizadas; seis mutaciones eran nuevas, y nueve habían sido previamente reportadas. La localización de las variantes en la secuencia de *WFS1*, fueron doce en el exón 8, una en el exón 5, otra en el 4, y finalmente una variante en el intrón 3.

El espectro genotípico fue amplio, nueve mutaciones se clasificaron de sentido erróneo, cuatro deleciones, una de las cuales dos provocan corrimiento de marco de lectura, y una duplicación, la cual también genera corrimiento del marco de lectura, conllevando a un codón de paro prematuro; finalmente una variante en sitio del corte y empalme en el intrón tres.

Las variantes de sentido erróneo y deleciones sin corrimiento de marco de lectura, confirieron cambios de aminoácidos o pérdidas de ellos, en distintas regiones de la estructura proteica; nueve se localizaron en los dominios transmembrana, dos en el dominio C-termina y una en la región N-terminal.



Tabla 17. Mutaciones encontradas, enumeradas por orden de aparición en la secuencia. Se especifica localización exónica, cambio de aminoácido, clasificación de mutación y región proteica. (En la siguiente página.)

<b>MUTACIONES</b>					
<b>Número</b>	<b>ADN</b>	<b>Exón</b>	<b>Proteína</b>	<b>Tipo de mutación</b>	<b>Región proteica</b>
1	c.315+1G>A	IN 3	****	Corte y empalme	****
2	c.409_424dup	4	p.Val142GlyfsTer110	Corrimiento marco de lectura	****
3	c.530G>C	5	p.Arg177Pro	Sentido erróneo	N-terminal
4	c.1078_1083del	8	p.Cys360Thr361del	Delección	Transmembrana
5	c.1082C>T	8	p.Thr361Ile	Sentido erróneo	Transmembrana
6	c.1091 T>G	8	p.Val364Gly	Sentido erróneo	Transmembrana
7	c.1161C>G	8	p. Asn387Lys	Sentido erróneo	Transmembrana
8	c.1202A>C	8	p.His401Pro	Sentido erróneo	Transmembrana
9	c.1330C>G	8	p.Ser443Arg	Sentido erróneo	Transmembrana
10	c.1355_1370del	8	p.Glu452GlyfsTer20	Corrimiento marco de lectura	****
11	c.1511C>T	8	p.Pro504Leu	Sentido erróneo	Transmembrana
12	c.1525_1539del	8	p.Val509_Tyr513del	Delección	Transmembrana
13	c.1787A>G	8	p.Lys596Arg	Sentido erróneo	Transmembrana
14	c.2416G>C	8	p.Ala806Pro	Sentido erróneo	C-terminal
15	c.2638_2643del	8	p.Asp880_Phe881del	Delección	C-terminal



A continuación, se muestra diagrama donde se evidencian sitios afectados en los distintos dominios de la proteína, para las mutaciones de sentido erróneo y deleciones que no provocaron corrimiento de marco de lectura.

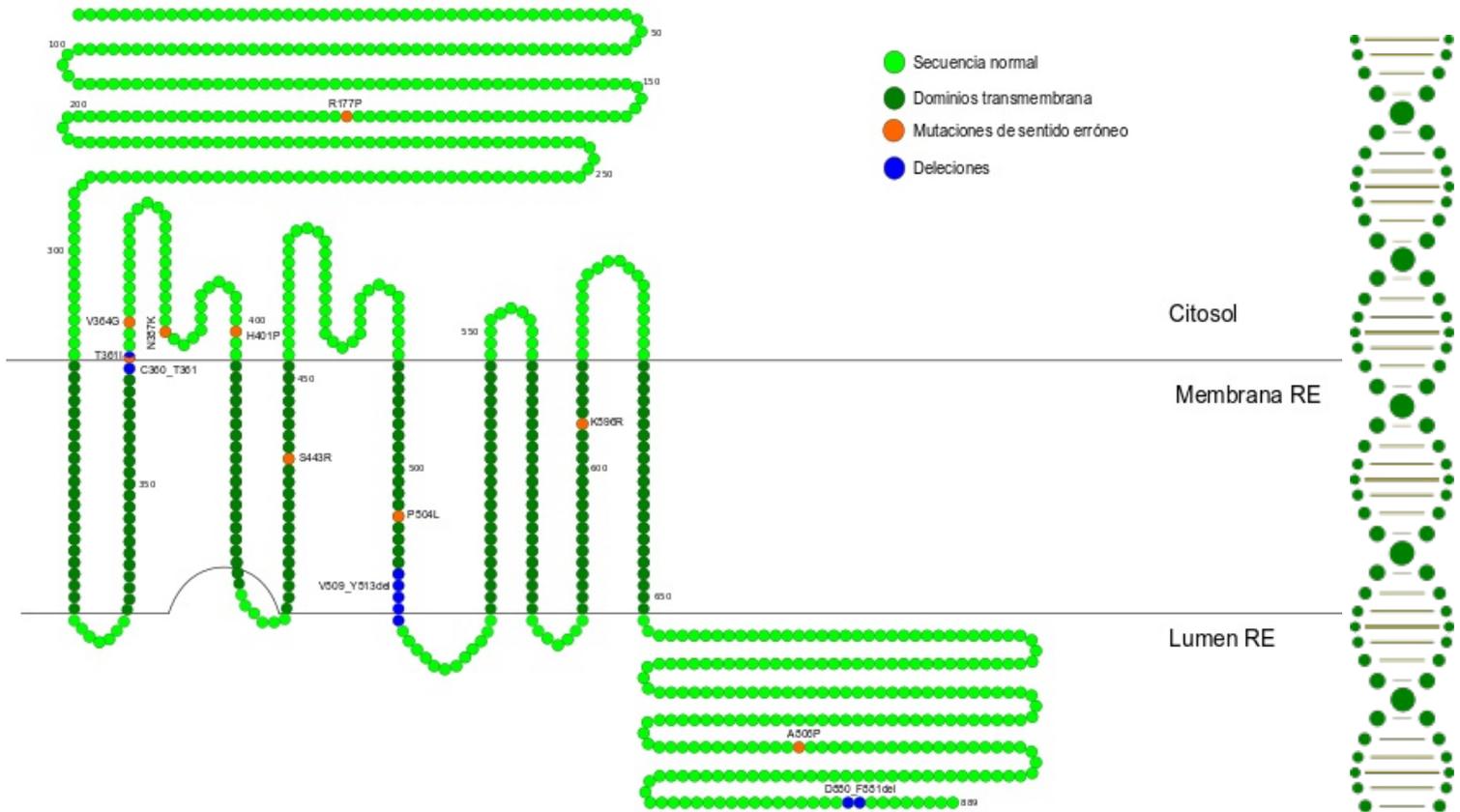


Fig. 15. Diagrama con mutaciones de sentido erróneo y deleciones, representadas en color naranja y azul respectivamente.

De los 19 casos estudiados, doce fueron heterocigotos compuestos, cinco homocigotos, y dos casos heterocigotos, estos últimos dos casos, se clasificaron como síndrome de Wolfram-like.

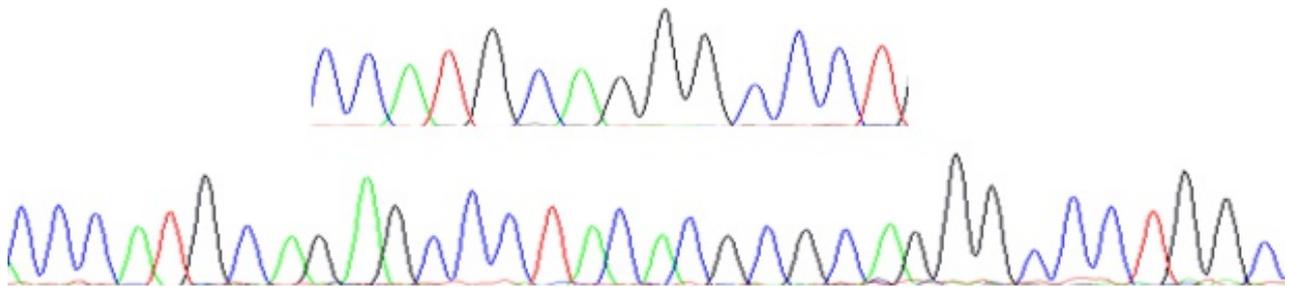


Fig. 16. Electroferograma de la familia 3, homocigotos para la variante c.1355\_1370del

Tabla 18. Mutaciones enlistadas por familia, especificación de localización exónica, secuencia de DNA, cambio de aminoácido y tipo de mutación.

MUTACIONES POR FAMILIA								
Variante 1					Variante 2			
Familia	Exón	ADN	Cambio proteína	Tipo de mutación	Exón	ADN	Cambio proteína	Tipo de mutación
I	8	c.1525_1539del	p.Val509_Tyr513del	D	8	c.1525_1539del	p.Val509_Tyr513del	D
II	8	c.1091T>G	p.Val364Gly	M	8	c.1161C>G	p. Asn387Lys	S
III	8	c.1355_1370del	p.Glu452GlyfsTer20	F	8	c.1355_1370del	p.Glu452GlyfsTer20	F
IV	8	c.1202A>C	p.His401Pro	M				
V	8	c.1511C>T	p.Pro504Leu	M	8	c.1511C>T	p.Pro504Leu	M
VI	8	c.1525_1539del	p.Val509_Tyr513del	D	8	c.2638_2643del	p.Asp880_Phe881del	D
VII	8	c.2416G>C	p.Ala806Pro	M	8	c.2416G>C	p.Ala806Pro	M
VIII	8	c.1355_1370del	p.Glu452GlyfsTer20	F	5	c.530G>C	p.Arg177Pro	M
IX	8	c.1330C>G	p.Ser443Arg	M	8	c.1082C>T	p.Thr361Ile	M
X	4	c.409_424dup	p.Val142GlyfsTer110	F	3	c.315+1G>A	Corte y empalme	S
XI	4	c.409_424dup	p.Val142GlyfsTer110	F	8	c.1078_1083del	p.Cys360_Thr361del	D
XII	8	c.1787A>G	p.Lys596Arg	M				F





El caso 19, era portador de seis variantes distintas, de las cuales tres eran sinónimas, tres de sentido erróneo; sin embargo, dos de ellas, con frecuencia alélica >1%, por lo cual, únicamente la variante c.1787A>G, fue considerada para estudios posteriores. En la siguiente tabla se muestran las variantes encontradas en el caso 19.

**Tabla 19. Variantes encontradas en estudio de secuenciación Sanger en caso 19.**

**M:** missence, **S:** sinónima, **B:** benigna, **P:** patogénica, **PP:** probablemente patogénica, **PyP:** Poly-Phen

Edo	ADN	Posición	Exón	Cambio aa	Tipo	MT	PyP	M-CAP	SIFT	Reportada
HM	c.997G>A	4: 6302519	8	p.Val333Ile	M	B	0.001	FA >1%	Tolerada 0.8	Si
HT	c.1185C>T	4:6302707	8	p.Val395=	S	B	**	FA >1%	**	Si
HT	c.1787A>G	4:6303309	8	p.Lys596Arg	M	P	0.999	PP	Tolerada 0.44	No
HT	c.1832G>A	4:6303354	8	p. Arg611His	M	B	0.146	FA >1%	Tolerada 0.11	Si
HT	c.2565A>G	4:6304087	8	p.Ser855=	S	B	**	FA >1%	**	No
HT	c.2625G>A	4:6304147	8	p.Val875=	S	P	**	FA >1%	**	No

Un total de seis mutaciones no habían sido previamente reportadas, se realizó una búsqueda intencionada de ellas ExAC, gnomAD, 1000 Genomes, ClinVar, lovd.eurowabb y PubMed; sin encontrar resultados, por lo que se procedió al análisis de su patogenicidad, mediante el uso de predictores in silico. Se utilizaron los siguientes predictores: Mutation Taster, Poly-Phen, M-CAP, SIFT, Varsome, y Human Splicing Finder.

El predictor Poly-Phen fue utilizado para calcular el índice de tolerancia de las 6 variantes, además de reportar un análisis evolutivo de conservación. La primera mutación c.1091T>G, conlleva a un cambio de valina por glicina en la posición 364; Poly-Phen arrojó un puntaje de 0.96 de probabilidad de ser patogénica; mientras que SIFT la reporta con score de 0 de ser benigna, M-CAP la reporta como probablemente patogénica con un puntaje de 0.625.

En las secuencias de alineamiento generadas por Poly-Phen, se observa que la presencia de valina en esta posición, en un elemento altamente conservado de manera evolutiva. La segunda mutación c. 1161C>G, genera un cambio de aminoácidos en la posición 387, asparagina por lisina. Poly-Phen la reporta como benigna, con un puntaje de 0.185, SIFT la reporta como tolerada con un puntaje de 0.11, M-CAP la reporta como posiblemente patogénica con puntaje de 0.396. La tercera mutación c.1202 A>C, Poly-Phen la reporta como patogénica, con puntaje de 0.998, en análisis de alineación región altamente conservada, SIFT la reporta como patogénica con puntaje de 0.05, M-CAP como posiblemente patogénica, con un puntaje de 0.752. La cuarta mutación c.315+1G>A, como se ha mencionado anteriormente, es una variante en región de corte y empalme del exón 3; utilizando el predictor Human Splicing Finder, reporta una probable alteración de la región donadora y con ello un rompimiento del sitio de corte y empalme; con una probabilidad de variación de -92.27% y un puntaje de 0.23.

La quinta mutación, c.1078\_1083del, genera la pérdida de dos aminoácidos en la posición 360 y 361, p.Cys360Thr361del, SIFT la reporta como patogénica, con puntaje de 0.858. Finalmente, la sexta mutación c.1787 A>G, Poly-Phen la reporta como probablemente patogénica con puntaje de 0.99, SIFT la reporta como tolerada, con puntaje de 0.44, M-CAP como posiblemente patogénica con un puntaje de 0.219.

A continuación, se muestran los resultados de los distintos predictores en las seis mutaciones nuevas encontradas en nuestro grupo de pacientes.

**Tabla 20 Mutaciones nuevas, con puntaje de patogenicidad obtenidos mediante predictores in silico: Mutation Taster, Poly-Phen, SIFT, M-CAP y Human Splicing Finder.**

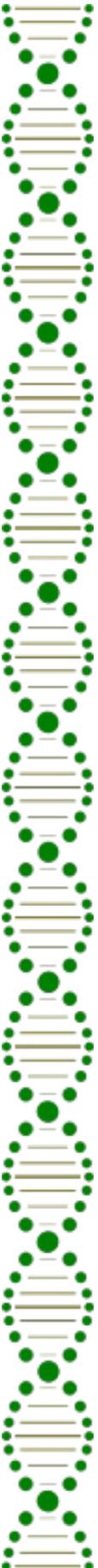
Posición	Cambio	Proteína	MT	PP score	SIFT Score	M-CAP score	HSF score
1091	T>G	Val364Gly	PT	0.96	0	0.625	
1161	C>G	Asn387Lys	PT	0.185	0.11	0.396	
1202	A>C	His401Pro	PT	0.998	0.05	0.752	
315+1	G>A						0.23
1078_1083		Cys360Thr361del	PL		0.858		
1787	A>G	Lys596Arg	PT	0.99	0.44	0.219	

Posteriormente, se analizó, como estos cambios, influían en el plegamiento proteico, mediante el uso del predictor proteico STRUM

En la tabla siguiente, se muestra los resultados obtenidos con el predictor proteico de STRUM. El score de ddG nos habla sobre la posibilidad de que la proteína pierda estabilidad al modificarse las fuerzas de Gibbs, y con ello alteraciones en la estructura conformacional. Posteriormente, se muestran los esquemas 2D, de las proteínas portadores de un cambio en un aminoácido.

**Tabla 21. Mutaciones nuevas de sentido erróneo, evaluadas mediante el predictor STRUM**

<b>Cambio DNA</b>	<b>Cambio aminoácido</b>	<b>ddG STRUM</b>
<b>c. 1091T&gt;G</b>	<b>Val364Gly</b>	<b>1.37</b>
<b>c.1161C&gt;G</b>	<b>Asn387Lys</b>	<b>3.2</b>
<b>C.1202A&gt;G</b>	<b>His401Pro</b>	<b>2.47</b>
<b>C. 1787A&gt;G</b>	<b>Lys596Arg</b>	<b>2.93</b>



A.

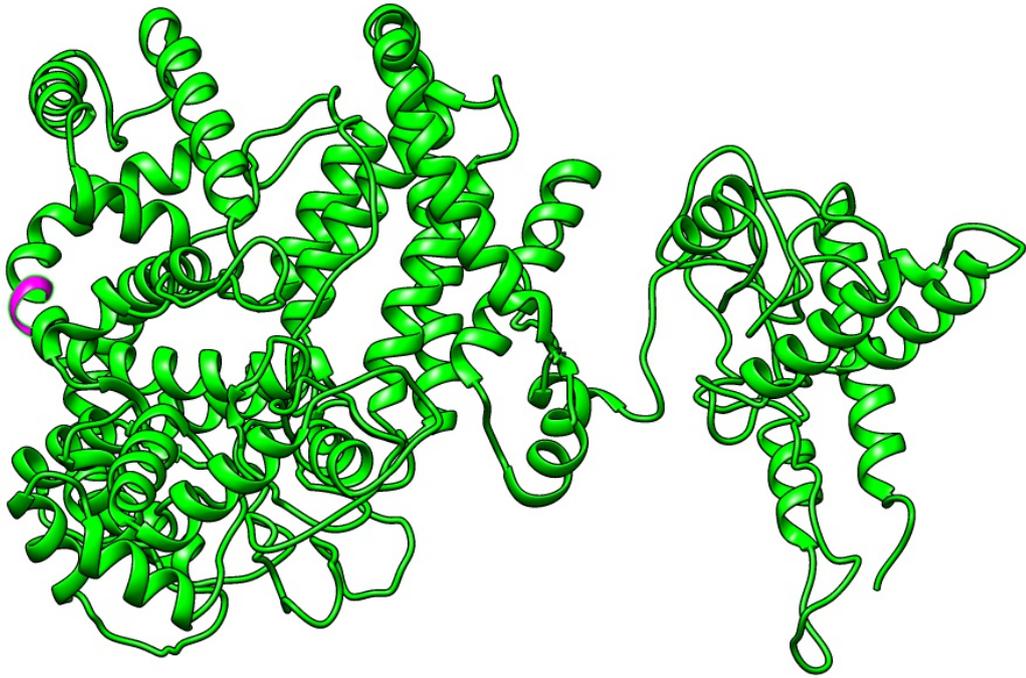


Fig. 17. Cambio proteico Val364Gly

B.



Fig. 18. Cambio proteico Asn387Lys

C.

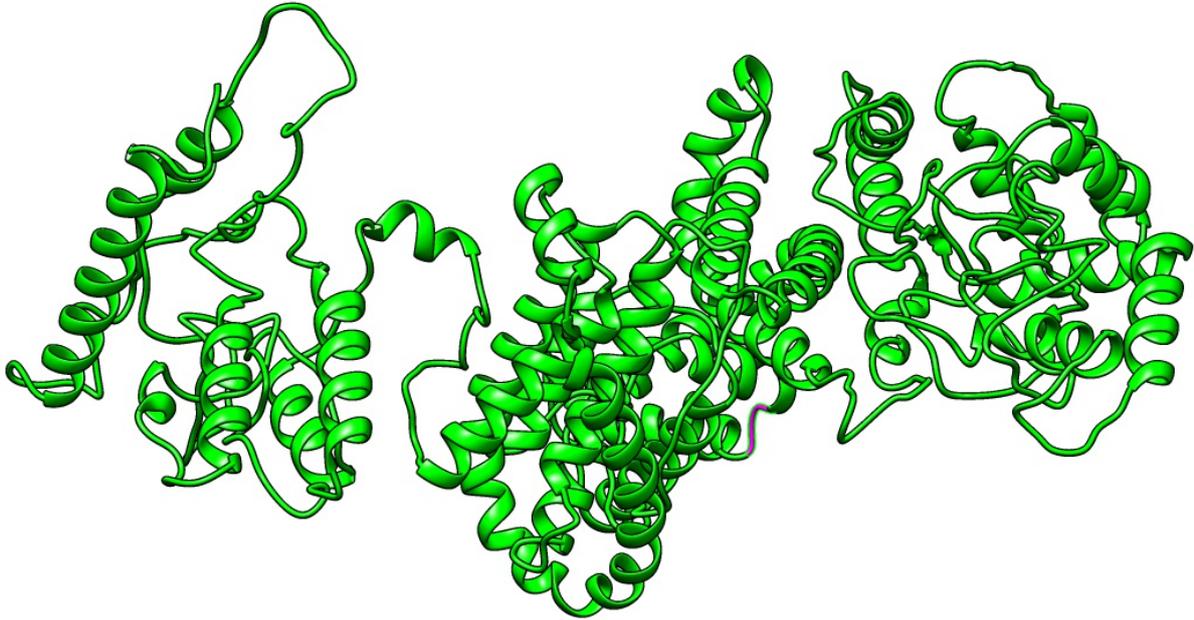


Fig. 19. Cambio proteico His401Pro

D.



Fig. 20. Cambio proteico Lys596Arg



El análisis de STRUM, predice que probabilidad existe de que una variante de un solo nucleótido, genere un cambio en las fuerzas de Gibbs, y con ello, una modificación en el plegamiento proteico. En valores negativos, el puntaje ddG indica mayor probabilidad de alteraciones en fuerzas de atracción. nos indica esta probabilidad, siendo mayor al resultar en valores negativos. Un ddG de 1.37 a 3, indica poca probabilidad de que la proteína modifique su plegamiento con los cambios de aminoácidos propuestos.

Posteriormente, utilizando el programa Varsome Clinical, el cual utiliza las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica, clasificamos las nuevas variantes nuevas, 5 de ellas clasificadas como significado incierto y una de ellas, patogénica.

**Tabla 22. Clasificación de las variantes nuevas, acorde a lineamientos del Colegio Americano de Genética Médica.**

<b>Posición</b>	<b>Cambio</b>	<b>Proteína</b>	<b>Clasificación ACMG</b>
<b>1091</b>	<b>T&gt;G</b>	<b>Val364Gly</b>	<b>Significado Incierto</b>
<b>1161</b>	<b>C&gt;G</b>	<b>Asn387Lys</b>	<b>Significado Incierto</b>
<b>1202</b>	<b>A&gt;C</b>	<b>His401Pro</b>	<b>Significado Incierto</b>
<b>315+1</b>	<b>G&gt;A</b>		<b>Patogénica</b>
<b>1078_1083</b>		<b>Cys360Thr361del</b>	<b>Significado Incierto</b>
<b>1787</b>	<b>A&gt;G</b>	<b>Lys596Arg</b>	<b>Significado Incierto</b>

Como se mencionó previamente, se extendió el estudio molecular a los familiares de primer grado que estaban disponibles. En el caso de la familia 1, la probando es homocigota para la variante c.1525\_1539del, con ambos progenitores portadores.

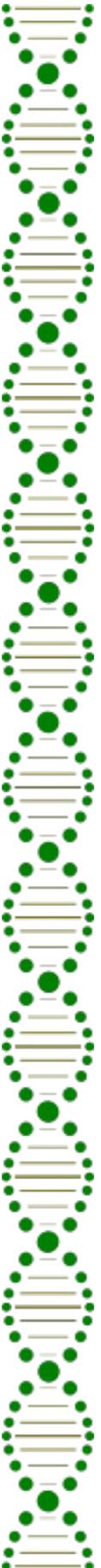
Familia 2, probando heterocigoto compuesto para c.1091 T>G y c.1161C>G, con padre portador de la primera variante, madre no portadora. Suponemos, que la segunda variante se trató de una mutación de novo.

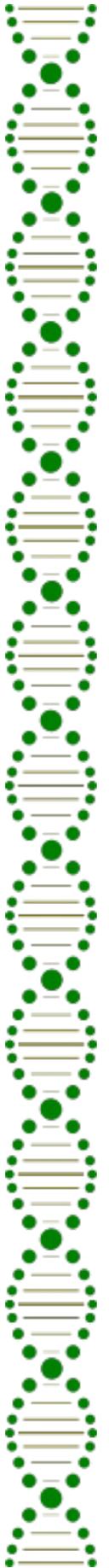
Familia 3 con casos 3 y 4, ambos portadores en estado homocigoto de la variante c.1355\_1370del, con los cuatro progenitores portadores. Familia 4, caso 5, portadora en estado heterocigoto de la variante c.1202A>C, al padre no se realizó estudio molecular, madre no portadora.

Familia 5, caso 6, homocigoto de la variante c.1511C>T, madre portadora de la misma variante, al padre no se le realizó estudio molecular. Familia 6, caso 7, heterocigota compuesta para dos deleciones (c.1525\_1539del, c.2638\_2643del), ambos progenitores no portadores de alguna de las variantes. Familia 7, caso 8, homocigoto para variante c.2416G>C, madre heterocigota para dicha variante, padre finado.

Familia 8, caso 9,10 y 11, heterocigotos compuestos para variantes c.1355\_1370del y c.530G>C, madre y padre heterocigotos para las variantes respectivamente. Familia 9, caso 12 y 13, heterocigotos compuesto para las variantes c.1330C>G y c.1082C>T, con padre y madre portadores para las variantes respectivamente. Familia 10, caso 14 y 15, heterocigotos compuestos para las variantes c.409\_424dup y c.315+1G>A, padre heterocigoto para la duplicación y madre para la variante en sitio de corte y empalme.

Familia 11, caso 16, 17 y 18, heterocigotos compuestos para las variantes c.1078\_1083del y c.409\_424dup, progenitores portadores, padre de deleción y madre de duplicación. Finalmente, la familia 12, caso 19, heterocigota para la variante c.1787A>G, la paciente es adoptada, por ello, no se les realizó estudio a los padres.





## 6. Discusión

El síndrome de Wolfram (SW) es una entidad con modo de herencia autosómica recesiva, debida a mutaciones en el gen *WFS1*.

Se caracteriza por la presencia de diabetes mellitus y atrofia óptica bilateral de inicio temprano, desarrollo posterior de hipoacusia neurosensorial, diabetes insípida, alteraciones psiquiátricas, neurológicas y urológicas.

En este estudio se analizaron las manifestaciones clínicas y genotípicas de 19 pacientes de 12 familias, diecisiete con SW y dos con probable Wolfram-like (WL). Los pacientes eran originarios de distintos estados del centro del país (Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Morelos, Hidalgo, Guerrero, Querétaro y Veracruz), muy probablemente debido a la cercanía con los centros especializados de la Ciudad de México.

Cuatro familias fueron homocigotas, sin embargo, solo dos refirieron consanguinidad positiva, esto representa el 16.6% de la muestra; dicho porcentaje es alto, en comparación al establecido en población general, del 1%.

Los casos únicos fueron más frecuentes, en siete familias; tres familias con dos casos, una familia con tres casos, y una con cuatro casos, en esta última, toda la hermandad se encontraba afectada.

La edad promedio del diagnóstico de SW fue de 13 años, 5 años la edad mínima y 25 años, la máxima (se excluyeron casos con probable WL en este análisis). En familias con más de un caso, el diagnóstico se realizó en edades más tempranas en el resto de la hermandad.

Las manifestaciones clínicas presentadas por orden de frecuencia fueron: diabetes mellitus en dieciocho casos, atrofia óptica en diecisiete, hipoacusia y manifestaciones psiquiátricas en nueve, manifestaciones neurológicas y endocrinológicas en siete, manifestaciones urológicas en seis y diabetes insípida en cuatro casos.

Al separar por sexo y excluir los casos de probable WL, se evidenció que las manifestaciones eran más frecuentes en el sexo masculino, a excepción de la diabetes mellitus, presente en el 100% de ambos grupos y las manifestaciones endocrinológicas, más frecuentes en mujeres.

La hipoacusia y las manifestaciones psiquiátricas se diagnosticaron en 60% de los varones, en comparación con 28.5% de las mujeres. No se encuentra reportado una mayor afección en el sexo masculino, a excepción del hipogonadismo hipogonadotrófico; esto puede deberse a un seguimiento clínico cercano en los casos de varones de las familias 7 y 8, lo que ha permitido realizar el diagnóstico de un mayor número de manifestaciones.

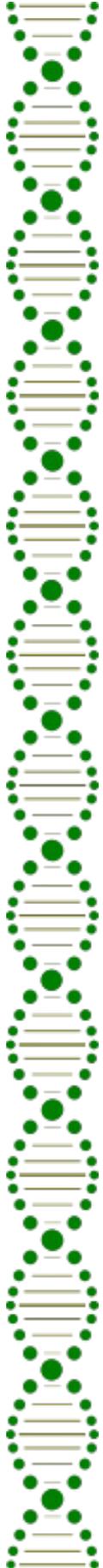
En el análisis de edades de diagnóstico de las manifestaciones, se observó, que los varones fueron diagnosticados a edades más tempranas, excepto diabetes mellitus, con una mediana de 4 años en ambos grupos; hipoacusia y manifestaciones endocrinológicas, que se presentaron antes en las mujeres. Esto tampoco ha sido previamente reportado. Podría asociarse a modificación en edades de diagnóstico en familias con más de un caso.

Se han propuesto como criterios diagnósticos, la triada de diabetes mellitus, atrofia óptica e hipoacusia, sin embargo, esta última, suele presentarse en la segunda o tercera década de la vida, con una frecuencia del 60 a 70%, por ello, se toman como criterios mínimos la conjunción de diabetes mellitus y atrofia óptica. En esta muestra, siete casos presentaron la triada característica, nueve casos diabetes mellitus y atrofia óptica, un caso con atrofia óptica e hipoacusia neurosensorial y dos casos diabetes mellitus. Los casos con diabetes mellitus fueron diagnosticados dado el antecedente de SW en la hermandad.

La diabetes mellitus fue la primera manifestación diagnosticada, con una mediana de diagnóstico de 4 años, similar a lo reportado por Barret et al (1995), de 6 años. Las complicaciones asociadas fueron, eventos de cetoacidosis en tres casos, eventos hipoglucémicos en dos, un caso con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) y uno con enfermedad renal crónica y RDNP.

La atrofia óptica se diagnosticó en diecisiete casos, con una mediana de diagnóstico de 9 años en varones y 11.8 años en mujeres. Otros hallazgos oftalmológicos fueron catarata y estrabismo, manifestaciones previamente asociados a SW.

El diagnóstico de hipoacusia se realizó en nueve casos, con distintos patrones audiométricos. De los casos negativos, cuatro no contaban con audiometría. La hipoacusia característica del SW es de frecuencias altas, con patrón de voz preservado, por lo que una hipoacusia leve-moderada puede pasar desapercibida clínicamente.





La frecuencia de manifestaciones psiquiátricas fue de 47.36%; el diagnóstico más frecuente fue trastorno depresivo mayor en siete casos, tres de ellos con intento suicida, dos casos con diagnóstico de trastorno de ansiedad generalizada concomitante.

A nivel mundial, se estima una prevalencia de 5% de trastorno depresivo, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (2017), por lo cual, que el 36.84% de la muestra presente este diagnóstico, nos hace suponer que se encuentra asociado a la entidad, sin embargo, desconocemos el porcentaje de este diagnóstico en otras entidades crónico-degenerativas.

Swift y Polymeropoulos (1998) describieron la relación entre SW y una mayor probabilidad de ser ingresado en una institución psiquiátrica, con resultados estadísticamente significativas, sin embargo, Bischoff et al (2015), en un grupo de casos y controles (pacientes con diabetes mellitus 1), mediante el uso de pruebas cognitivas, cuestionarios psicológicos y prueba de olfato, concluyeron que los diagnósticos psiquiátricos no tienen mayor prevalencia en pacientes con síndrome de Wolfram, en comparación con otras entidades crónico-degenerativas.

Las manifestaciones neurológicas se presentaron en el 36.84%; cinco con diagnóstico de neuropatía periférica; dos casos de la familia 8, con convulsiones tipo mioclónica; y respectivamente un caso con anosmia, probable déficit intelectual, y nistagmus. Barret (1995) y Chaussonot (2010), reportaron las manifestaciones cerebelosas como las más frecuentes.

En esta muestra, el diagnóstico de neuropatía periférica podría asociarse a una complicación de diabetes mellitus en descontrol, más que al SW per se. La ausencia de otras manifestaciones neurológicas, podría deberse a la falla en el seguimiento y ausencia de valoración por el servicio de neurología. En 2010, Chaussonot et al reportaron por primera vez a dos pacientes, con déficit intelectual, epilepsia y malformaciones corticales, se hipotetizó que *WFS1* podría estar involucrado en el neurodesarrollo; en esta muestra, el caso 5 presentó un defecto de tubo neural con malformación de Arnold Chiari II asociada.

Las manifestaciones endocrinológicas se presentaron en siete casos, 30% en varones y 42.8% en mujeres. Cuatro casos con hipogonadismo hipogonadotrófico, tres de ellos con dislipidemia mixta asociada y otro con dislipidemia mixta e hipotiroidismo primario. Un caso con hipotiroidismo primario y dislipidemia mixta, otro con tiroiditis y finalmente uno con diagnóstico de bocio tiroideo.

Las alteraciones tiroideas ya han sido descritas en el SW (Hilson et al. 2009), sin embargo, que cuatro de los diecinueve casos presenten una manifestación a este nivel, representa una frecuencia alta.

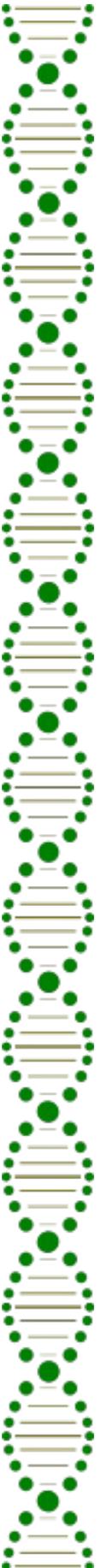
En las manifestaciones urológicas, seis casos con diagnóstico de vejiga neurogénica, esta manifestación fue dos veces más frecuente en varones que en mujeres, además de presentarse a una edad más temprana, 14.5 años y 20.5 años, respectivamente. De estos seis casos, dos presentaban hidronefrosis bilateral, dos, ectasia renal y un caso enfermedad crónica terminal.

La diabetes insípida fue diagnosticada en cuatro casos (21.05%), tres de ellos varones, con una mediana de diagnóstico de 18.5 años; Barret et al (1995) reportaron una prevalencia de 73%, con una mediana de 14 años. Es posible que esta manifestación se encuentre infradiagnosticada, ya que la principal manifestación es poliuria, la cual también se presenta en vejiga neurogénica y diabetes mellitus en descontrol.

En las manifestaciones no asociadas a la entidad; dos casos presentaron malformaciones congénitas: fistula traqueoesofágica y mielomeningocele asociado a malformación de Arnold Chiari II; en manifestaciones neoplásicas, un caso con seminoma clásico y osteocondroma y otro con antecedente de cáncer cervicouterino; en misceláneos, dos casos, provenientes de la misma familia, con hepatopatía de origen a determinar, un caso con lupus eritematoso generalizado y otro con agranulocitosis idiopática. Hasta el momento, ninguna de estas manifestaciones ha sido reportada en SW, incluso los niveles de expresión de wolframina se han reportado bajos en tejido hepático (Illumina Body Map).

Los resultados de biología molecular posterior a secuenciación Sanger de los exones codificantes del gen *WFS1* (2-7) en los casos, madre y padre (de estar disponibles) fueron los siguientes:

Doce casos heterocigotos compuestos, cinco homocigotos, y dos casos heterocigotos, estos últimos, se clasificaron con probable WL. Se reportaron quince mutaciones en total, nueve previamente reportadas y seis nuevas. La localización exónica, fue acorde a lo reportado en la literatura, ya que doce se localizaron en el exón 8; una en el exón 5, otra en el 4, y una variante en la región donadora del intrón tres.



Las variantes se clasificaron, nueve de sentido erróneo, cuatro deleciones, una duplicación, y una variante en sitio de corte y empalme. Dos de las deleciones y la duplicación, conllevan a un corrimiento de marco de lectura, con la formación de un codón de paro prematuro.

Familia 1, caso 1, homocigoto de la deleción c.1525\_1539del (p.Val509\_Tyr513del); de acuerdo al Euro-Wabb Project, ha sido reportada en diecinueve ocasiones; en México, fue reportada por Chacón-Camacho et al (2013), en dos hermanas, con microesferofaquia, un nuevo hallazgo oftalmológico no asociado previamente a SW; nuestro caso no contaba con dicho hallazgo. Esta deleción causa la pérdida de cinco aminoácidos en región transmembrana. Los progenitores eran heterocigotos para la deleción.

Familia 2, caso 2, heterocigoto compuesto para variantes de sentido erróneo, no reportadas previamente: c.1091T>G (p.Val364Gly) y c.1161C>G(p.Asn387Lys). Acorde a los estatutos de ACMG se clasificó como de sentido erróneo; se requerirán estudios de función, para corroborar la patogenicidad de las mismas. Padre portador de la primera variante, madre homocigota silvestre.

Familia 3, caso 3 y 4, homocigotos para la variante c.1355\_1370del (p.Glu452GlyTer20); esta variante fue descrita por primera vez por Zenteno et al (2008) en la familia 8. Esta mutación no ha sido descrita en otras poblaciones; esto alude a un posible efecto fundador, sin embargo, las familias son originarias de distintas regiones. Progenitores heterocigotos para deleción.

Familia 4, caso 5, heterocigoto de la variante c.1202A>C (p. His401Pro), no reportada previamente, los predictores in silico utilizados refieren alta probabilidad de patogenicidad, por afección de una región altamente conservada; acorde a los estatutos de ACMG se clasificó de significado incierto. No se realizó estudio al padre, madre homocigota silvestre.

Familia 5, caso 6, homocigoto para la variante c.1511C>T (p.Pro504Leu), fue reportada por primera vez, por Inoue et al (1998). De Heredia et al. (2012), la reportó con una prevalencia del 2.7% en una muestra de 412 pacientes. Madre heterocigota para la variante, al padre no se le realizó estudio.



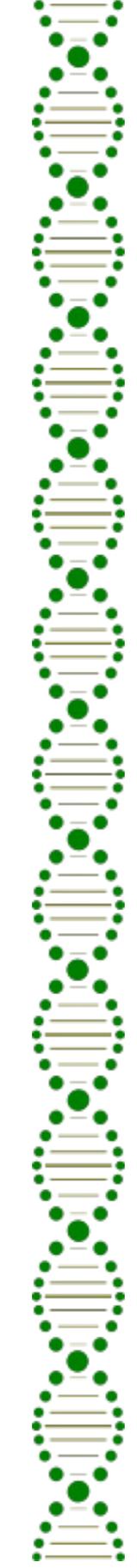
Familia 6, caso 7, heterocigoto compuesto para c.1525\_1530del (p.Val509\_Tyr513del) y c.2638\_2643del (p.Asn880\_Phe881del), la primera delección, fue comentada previamente; la segunda fue reportada por primera vez por Eller et al (2001), los aminoácidos deletados se encuentran altamente conservados en la secuencias de WFS1 de *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* (GenBank AF084482/AJ011971, AF136378). Los progenitores fueron homocigotos silvestres.

La familia 7, caso 8, homocigoto para la variante c.2416G>C (p.Ala806Pro), reportada por Chausseot et al (2014), se ha asociado en estado heterocigoto a hipoacusia neurosensorial de baja frecuencia. Madre heterocigota para la variante, se desconoce si cursa con alteraciones auditivas, padre falleció.

La familia 8, casos 9, 10 y 11, el cuarto caso falleció. Heterocigotos compuestos de c.530G>C (p.Arg177Pro) y c.1355\_1370del (p.Glu452GlyfsTer20); esta familia fue reportada por Zenteno et al en 2011. Madre heterocigota de la delección y padre de la variante de sentido erróneo. Esta familia presenta varias de las manifestaciones asociadas a SW; no consideramos que se trate de una mayor afección determinada por el genotipo, únicamente un seguimiento cercano, lo cual permitió el diagnóstico oportuno.

Familia 9, casos 12 y 13, heterocigotos compuestos para c.1330C>G (p.Ser443Arg) y c.1082C>T (p.Thr361Ile); ambas mutaciones han sido previamente reportadas, la primera de ellas, por primera vez por Zmyslowska et al (2001), padre heterocigoto. La segunda, c.1082C>T, reportada por Chausseot et al, en 2011, madre heterocigota.

Familia 10, casos 14 y 15, heterocigotos compuestos para c.409\_424dup (p.Val142GlyfsTer110) y c.315+1G>A; la duplicación fue descrita por primera vez por Gomez-Zaera (2001), en 6 de 12 familias españolas con SW, Heredia et al (2012), estimaron una prevalencia del 6.5%. Inicialmente fue descrita como una inserción de 16 pares de bases, posteriormente se describiría como duplicación por Royahem y Chausseot (2011). Esta es de las pocas variantes que se consideran frecuentes. La variante intrónica, c.315+1G>A, es nueva; utilizando el predictor Human Splicing Finder y Varsome Clinical, es posible que la variante afecte el sitio donador del corte y empalme; acorde a los estatutos de la clasificación de ACMG, fue catalogada como patogénica. Madre heterocigota para la variante de sitio de corte y empalme, y padre para duplicación.



Familia 11, casos 16, 17 y 18, heterocigotos compuesto para la duplicación de 16 pares de bases, previamente comentada, y la delección c.1078\_1083del (p.Cys360Thr361del). Acorde a los criterios de la ACMG, clasificada de significado incierto, se requerirá de estudios funcionales para su reclasificación. Madre heterocigota para duplicación, padre heterocigoto para delección.

Familia 12, caso 19, heterocigota para la variante c.1787A>G (p.Lys596Arg), reportada en los predictores in silico como probablemente patogénica, clasificada como de significado incierto por los criterios del ACMG. No se extendió estudio a los padres, ya que la paciente es adoptada. También se requerirán de estudios funcionales para su reclasificación.

No se puede afirmar una asociación entre las variantes nuevas de significado incierto y las manifestaciones clínicas de los casos, se requiere corroborar si existe un efecto deletéreo en la proteína.

Se desconoce porque algunas variantes de sentido erróneo se asocian a WL y otros son silentes en los portadores. En 2019, Lusk et al. reportaron una familia, dos hermanas con hipoacusia neurosensorial y atrofia óptica, heterocigotas compuestas para una variante clasificada como probablemente patogénica y una de significado incierto, el padre con hipoacusia neurosensorial, portador de la primera variante, la madre era sana, portadora de la segunda. Se catalogó como un probable WL autosómico recesivo, ya que no se comprobó que la variante de significado incierto provocara un efecto deletéreo.

Ante variantes nuevas, con clasificación de significado incierto, son necesarios estudios de funcionalidad que corroboren o descarten, un efecto deletéreo. El caso 19 por ejemplo, heterocigoto de múltiples variantes de sentido erróneo, solo una fue clasificada como probablemente patogénica en los predictores in silico; desconocemos, si las manifestaciones clínicas son secundarias a esta variante, o son el resultado un efecto aditivo de las múltiples variantes presentadas.

Las limitantes de nuestro estudio fueron, falta de información en expediente clínico de algunos casos, interrupción del seguimiento en varios casos; por otro lado, es posible que no hayamos captado a todos los casos con esta entidad, al mimetizarse de manera importante con la diabetes mellitus tipo 1. Finalmente, no se realizaron estudios de funcionalidad que corroboren el efecto de las variantes nuevas, clasificadas como de significado incierto.



## 7. Conclusiones

En este estudio se describen las manifestaciones clínicas y genóticas de diecisiete casos de SW y dos casos con probable WL, en dos centros de especialidades de la ciudad de México.

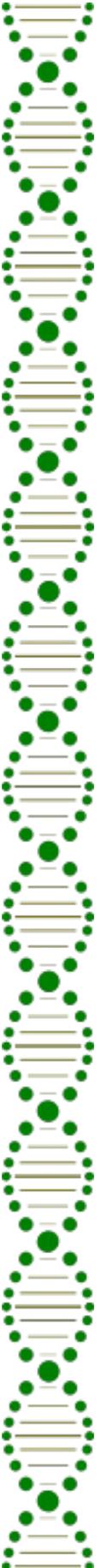
La enfermedad muestra una edad de inicio temprano, en promedio a los 13 años, el paciente más joven a los 5 años de edad y el de presentación más tardía a los 25. Las manifestaciones fenotípicas características del SW fueron: diabetes mellitus (94.73%), atrofia óptica (89.47%), hipoacusia neurosensorial y trastornos psiquiátricos (47.36%), alteraciones neurológicas y endocrinológicas (36.84%), urológicas (31.57%) y diabetes insípida (21.05%).

Se describen 15 mutaciones, nueve previamente reportadas y seis nuevas. Doce casos fueron heterocigotos compuestos, cinco homocigotos y dos heterocigotos. Las variantes se localizaron con mayor frecuencia el exón 8, acorde con lo previamente reportado. Nueve son variantes de sentido erróneo, cuatro deleciones, una duplicación y una de corte y empalme.

De las seis mutaciones nuevas, acorde a los estatutos del ACMG, la variante intrónica es considerada patogénica y las cinco restantes, cuatro de sentido erróneo y una deleción; fueron clasificadas de significado incierto. Si bien no es posible afirmar causalidad de las variantes de significado incierto, las manifestaciones clínicas de los casos sugieren esa posibilidad. Posteriores estudios funcionales y nueva casuística propia y de otros grupos muy probablemente permitirán reclasificar estas variantes genéticas.

El síndrome de Wolfram es una entidad de baja prevalencia, sin embargo, debe ser sospechado en pacientes con diabetes mellitus de inicio temprano y alteraciones visuales asociadas.

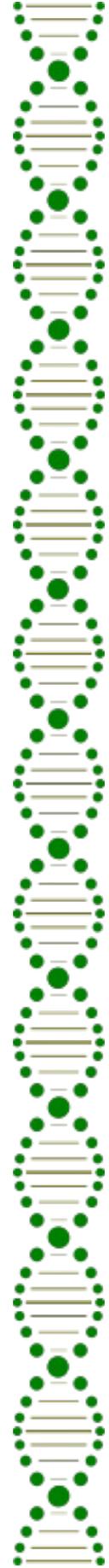
Un adecuado asesoramiento genético es indispensable en personas portadoras de variantes en el gen *WFS1*, ya que, si bien se ha descrito una clásica segregación autosómica recesiva; actualmente variantes heterocigotas del gen *WFS1*, se asocian a diabetes mellitus 2, hipoacusia neurosensorial de baja frecuencia, catarata tipo 41 y síndrome de Wolfram-like.





## 8. Bibliografía

- Al-Till, M. (2002). Ophthalmologic findings in fifteen patients with Wolfram syndrome. *European Journal of Ophthalmology*, 12(2), 84–88.
- Angebault, C., Fauconnier, J., Patergnani, S., Rieusset, J., Danese, A., Affortit, C. A., . . . Delettre, C. (2018). ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca<sup>2+</sup> sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. *Science Signaling*, 11(553). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaq1380>
- Barret, T., Scott-Brown, M., Seller, A., Bednarz, A., Poulton, K., & Poulton, J. (2000). The mitochondrial genome in Wolfram syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 37(6), 463–466.
- Barret, T. G. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *The Lancet*, 346, 1458–1463.
- Bischoff, A., Reiersen, A., Buttlair, A., Al-lozi, A., Doty, T., Marshall, B., & Hershey, T. (2015). Selective cognitive and psychiatric manifestations in Wolfram Syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0282-1>
- Blanco-Aguirre, M. E., La Parra, D. R., Tapia-Garcia, H., Gonzalez-Rodriguez, J., Welskin, D., Arroyo-Yllanes, M. E., . . . Zenteno, J. C. (2015). Identification of unsuspected Wolfram syndrome cases through clinical assessment and WFS1 gene screening in type 1 diabetes mellitus patients. *Gene*, 566(1), 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.040>
- Bonnycastle, L. L., Chines, P. S., Hara, T., Huyghe, J. R., Swift, A. J., Heikinheimo, P., . . . Laakso, M. (2013). Autosomal Dominant Diabetes Arising From a Wolfram Syndrome 1 Mutation. *Diabetes*, 62(11), 3943–3950. <https://doi.org/10.2337/db13-0571>
- Cano, A. (2007). Microvascular Diabetes Complications in Wolfram Syndrome (Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, and Deafness [DIDMOAD]). *Diabetes Care*, 30, 2327–2330.

- 
- Chacón-Camacho, O., Arce-Gonzalez, R., Granillo-Alvarez, M., Flores-Limas, S., Ramírez, M., & Zenteno, J. C. (2013). Expansion of the Clinical Ocular Spectrum of Wolfram Syndrome in a Family Carrying a Novel WFS1 Gene Deletion. *Ophthalmic Genetics*, 34(4), 243–248. <https://doi.org/10.3109/13816810.2012.755631>
- Chausseot, A. (2014). Mutation update and uncommon phenotypes in a French cohort of 96 patients with WFS1-related disorders. *Clinical Genetics*, 87(5), 430–439. <https://doi.org/10.1111/cge.12437>
- Chausseot, A., Bannwarth, S., Rouzier, C., Vialettes, B., Mkaem, S. A. E., Chabrol, B., .. Paquis-Flucklinger, V. (2010). Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Annals of Neurology*, 69(3), 501–508. <https://doi.org/10.1002/ana.22160>
- Collier, D. A. (1996). Linkage of Wolfram Syndrome to Chromosome 4p16.1 and Evidence for Heterogeneity. *American Journal of Human Genetics*, 59, 855–863.
- Cremers, C. (1977). Juvenile Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Hearing Loss, Diabetes Insipidus, Atonia of the Urinary Tract and Bladder, and Other Abnormalities (Wolfram Syndrome). *Acta Paediatrica*, 66(s264), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1977.tb15069.x>
- Cryns, K. (2003). Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Human Mutation*, 22(4), 275–287. <https://doi.org/10.1002/humu.10258>
- De Heredia, M. L., Clèries, R., & Nunes, V. (2013). Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genetics in Medicine*, 15(7), 497–506. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.180>
- Eiberg, H. (2005). Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *Journal of Medical Genetics*, 43(5), 435–440. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.034892>



Eller, P. (2001). Wolfram syndrome: a clinical and molecular genetic analysis. *Journal of Medical Genetics*, 38(11), –37. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.11.e37>

Fraser, F. C., & Gunn, T. (1977). Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome? *Journal of Medical Genetics*, 14, 190–193.

Gabreëls, B. A. T. F. (1998). The Vasopressin Precursor Is Not Processed in the Hypothalamus of Wolfram Syndrome Patients with Diabetes Insipidus: Evidence for the Involvement of PC2 and 7B2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(11), 4026–4033. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.11.5158>

Giuliano, F. (2004). Wolfram syndrome in French population: Characterization of novel mutations and polymorphisms in the WFS1 gene. *Human Mutation*, 25(1), 99–100. <https://doi.org/10.1002/humu.9300>

Gunn, T. (1976). Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, sensory nerve deafness, and diabetes insipidus—a syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 89(4), 565–570. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(76\)80387-3](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(76)80387-3)

Gómez-Zaera, M., Strom, T. M., Rodríguez, B., Estivill, X., Meitinger, T., & Nunes, V. (2001). Presence of a Major WFS1 Mutation in Spanish Wolfram Syndrome Pedigrees. *Molecular Genetics and Metabolism*, 72(1), 72–81. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3107>

Haghighi, A., Haghighi, A., Setoodeh, A., Saleh-Gohari, N., Astuti, D., & Barrett, T. G. (2012). Identification of homozygous WFS1 mutations (p.Asp211Asn, p.Gln486\*) causing severe Wolfram syndrome and first report of male fertility. *European Journal of Human Genetics*, 21(3), 347–351. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.154>

Hetz, C., & Papa, F. R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular Cell*, 69(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>

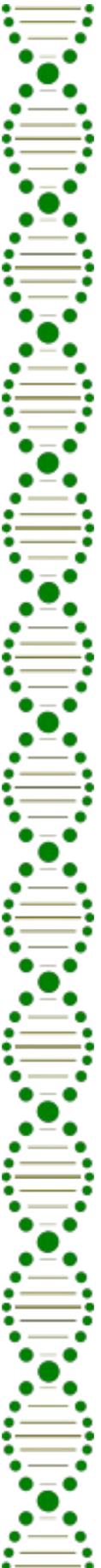
Hofmann, S. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Human Molecular Genetics*, 12(16), 2003–2012. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg214>

Home - Genome - NCBI. (s.f.), de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>

Human Splicing Finder - Version 3.1. (s.f.), de <http://www.umd.be/HSF/>

Inoue, H. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics*, 20, 143–148.

- Ishihara, H. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive  $\beta$ -cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1159–1170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh125>
- Karzon, R. (2018). Longitudinal hearing loss in Wolfram syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0852-0>
- Khanim, F., Kirk, J., Latif, F., & Barrett, T. G. (2001). WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Human Mutation*, 17(5), 357–367. <https://doi.org/10.1002/humu.1110>
- Kumar, S. (2010). Wolfram syndrome: important implications for pediatricians and pediatric endocrinologists. *Pediatric Diabetes*, 11(1), 28–37. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2009.00518.x>
- Kytövuori, L., Seppänen, A., Martikainen, M. H., Moilanen, J. S., Kamppari, S., Särkioja, T., Majamaa, K. (2013). WFS1 variants in Finnish patients with diabetes mellitus, sensorineural hearing impairment or optic atrophy, and in suicide victims. *Journal of Human Genetics*, 58(8), 495–500. <https://doi.org/10.1038/jhgc.2013.29>
- Lugar, H. M. (2016). Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep21167>
- Lusk, L., Black, E., & Vengoechea, J. (2019). Segregation of two variants suggests the presence of autosomal dominant and recessive forms of WFS1-related disease within the same family: expanding the phenotypic spectrum of Wolfram Syndrome. *Journal of Medical Genetics*, , 1–3. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105782>
- M-CAP: Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity Score, Bejerano Lab, Stanford University. (s.f.). Recuperado 10 enero, 2020, de <http://bejerano.stanford.edu/mcap/>
- Medlej, R., Wasson, J., Baz, P., Azar, S., Salti, I., Loiselet, J., . . . Halaby, G. (2004). Diabetes Mellitus and Optic Atrophy: A Study of Wolfram Syndrome in the Lebanese Population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(4), 1656–1661. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-030015>
- MutationTaster. (s.f.). Recuperado 10 enero, 2020, de <http://www.mutationtaster.org/>
- Ohata, T. (1998). Evidence of an increased risk of hearing loss in heterozygous carriers in a Wolfram syndrome family. *Human Genetics*, 103, 470–474.
- OMIM Entry - # 614296 - WOLFRAM-LIKE SYNDROME, AUTOSOMAL DOMINANT; WFSL. (s.f.). Recuperado 13 enero, 2020, de <https://www.omim.org/entry/614296>

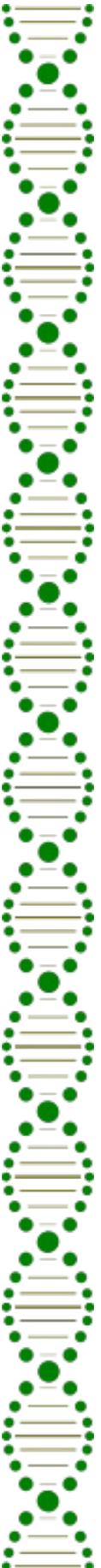


- 
- Pallotta, M. T., Tascini, G., Crispoldi, R., Orabona, C., Mondanelli, G., Grohmann, U., & Esposito, S. (2019). Wolfram syndrome, a rare neurodegenerative disease: from pathogenesis to future treatment perspectives. *Journal of Translational Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1993-1>
- Plantinga, R. F. (2008). Hearing Impairment in Genotyped Wolfram Syndrome Patients. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 117(7), 494–500. <https://doi.org/10.1177/000348940811700704>
- Polymeropoulos, M. H. (1994). Linkage of the gene for Wolfram syndrome to markers on the short arm of chromosome 4. *Nature Genetics*, 8, 95–97.
- PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs. (s.f.). Recuperado 10 enero, 2020, de <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- Qian, X., Qin, L., Xing, G., & Cao, X. (2015a). Phenotype Prediction of Pathogenic Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms in WFS1. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep14731>
- Qian, X., Qin, L., Xing, G., & Cao, X. (2015b). Phenotype Prediction of Pathogenic Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms in WFS1. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep14731>
- Quan, L., Lv, Q., & Zhang, Y. (2016). STRUM: structure-based prediction of protein stability changes upon single-point mutation. *Bioinformatics*, 32(19), 2936–2946. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw361>
- Rigoli, L. (2012). Wolfram syndrome 1 and Wolfram syndrome 2. *Current Opinion in Pediatrics*, , 1. <https://doi.org/10.1097/mop.0b013e328354ccdf>
- Rigoli, L., Lombardo, F., & Di Bella, C. (2010). Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clinical Genetics*, 79(2), 103–117. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01522.x>
- Rivas-Gómez, B., & Reza-Albarran, A. A. (2016). Diabetes Mellitus y atrofia óptica: estudio del síndrome de Wolfram. *Gaceta Médica de México*, 153, 466–472.
- Rohayem, J., Ehlers, C., Wiedemann, B., Holl, R., Oexle, K., Kordonouri, O., . . . Lee-Kirsch, M. A. (2011). Diabetes and Neurodegeneration in Wolfram Syndrome: A multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care*, 34(7), 1503–1510. <https://doi.org/10.2337/dc10-1937>

- Rotig, A. (1991). Deletion of Mitochondrial DNA in a Case of Early-Onset Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, and Deafness. *Journal of Clinical Investigations*, 91, 1095–1098.
- Samara, A., Rahn, R., Neyman, O., Park, K. Y., Samara, A., Marshall, B., . . . Hershey, T. (2019). Developmental hypomyelination in Wolfram syndrome: new insights from neuroimaging and gene expression analyses. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1260-9>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Scaramuzzi, M. (2018). Evidence of retinal degeneration in Wolfram syndrome. *Ophthalmic Genetics*, 40(1), 34–38. <https://doi.org/10.1080/13816810.2018.1551494>
- Sequeira, A., & Kim, C. (2003). Wolfram syndrome and suicide: Evidence for a role of WFS1 in suicidal and impulsive behavior. *American Journal of Medical Genetics*, 119B(1), 108–113. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.20011>
- Simsek, E., Simsek, T., Tekgüt, S., Hosal, S., Seyrantepe, V., & Aktan, G. (2007). Wolfram (DIDMOAD) syndrome: a multidisciplinary clinical study in nine Turkish patients and review of the literature. *Acta Paediatrica*, 92(1), 55–61. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2003.tb00469.x>
- Sobhani, M., Amin Tabatabaiefar, M., Ghafouri-Fard, S., Rajab, A., Mozafarpour, S., Nasrnia, S., . . . Noori-Daloi, M. R. (2019). Clinical and molecular assessment of 13 Iranian families with Wolfram syndrome. *Endocrine*, 66(2), 185–191. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-02004-w>
- Strom, T. M. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genetics*, 13, 2021–2028.
- Swift, R. G. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet*, 336, 667–669.
- Swift, R. G., & Polymeropoulos, M. H. (1998). Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Molecular Psychiatry*, 3, 86–91.

- 
- Takeda, K. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human Molecular Genetics*, 10(5), 477–484. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.5.477>
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., . . . Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*, 580(24), 5635–5640. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.007>
- Thompson, C. J. (1989). Vasopressin secretion in the DIDMOAD (Wolfram) syndrome. *The Quarterly Journal of Medicine*, 71, 333–345.
- Tranebjærg, L. (2013, 19 diciembre). WFS1-Related Disorders - GeneReviews® - NCBI Bookshelf. Recuperado 15 enero, 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4144/>
- Ustaoglu, M. (2019). Ophthalmic, systemic, and genetic characteristics of patients with Wolfram syndrome. *European Journal of Ophthalmology*, , 112067211984248. <https://doi.org/10.1177/1120672119842489>
- Ustaoglu, M., Onder, F., Karapapak, M., Taslidere, H., & Guven, D. (2019). Ophthalmic, systemic, and genetic characteristics of patients with Wolfram syndrome. *European Journal of Ophthalmology*, , 112067211984248. <https://doi.org/10.1177/1120672119842489>
- Valéro, R., Bannwarth, S., Roman, S., Paquis-Flucklinger, V., & Vialettes, B. (2008). Autosomal dominant transmission of diabetes and congenital hearing impairment secondary to a missense mutation in the WFS1 gene. *Diabetic Medicine*, 25(6), 657–661. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02448.x>
- Van Den Ouweland, J. M., Cryns, K., Pennings, R. J., Walraven, I., Janssen, G. M., Maassen, J. A., . . . Dikkeschei, L. D. (2003). Molecular Characterization of WFS1 in Patients with Wolfram Syndrome. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 5(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/s1525-1578\(10\)60457-6](https://doi.org/10.1016/s1525-1578(10)60457-6)
- WFS1 Gene - GeneCards | WFS1 Protein | WFS1 Antibody. (s.f.-c). Recuperado 12 noviembre, 2019, de <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WFS1>
- Wolfram, D. J. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases.. *Mayo Clinic*, 1, 715–718.

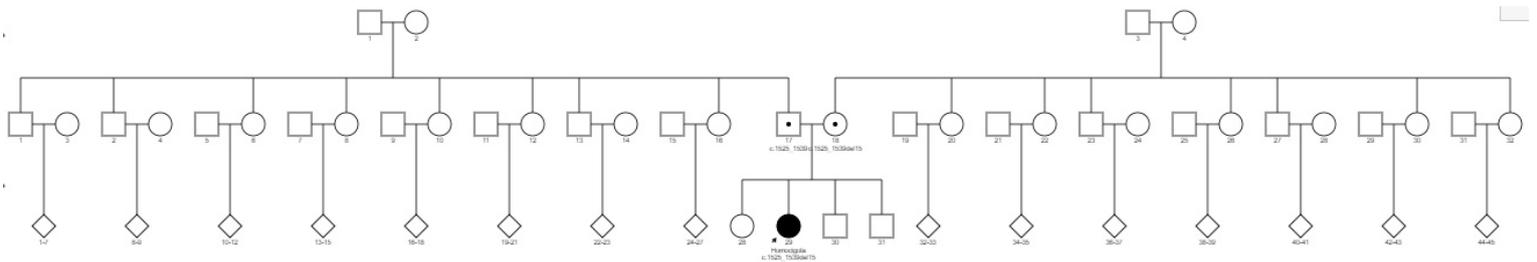
- Yamamoto, H., Hofmann, S., Hamasaki, D. I., Yamamoto, H., Kreczmanski, P., Schmitz, C., . . . Schmidt-Kastner, R. (2006). Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein expression in retinal ganglion cells and optic nerve glia of the cynomolgus monkey. *Experimental Eye Research*, 83(5), 1303–1306. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.06.010>
- Yuca, S. A. (2012). Rapidly progressive renal disease as part of Wolfram syndrome in a large inbred Turkish family due to a novel WFS1 mutation (p.Leu511Pro). *European Journal of Medical Genetics*, 55(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.08.005>
- Zatyka, M., Ricketts, C., Da Silva Xavier, G., Minton, J., Fenton, S., Hofmann-Thiel, S., . . . Barrett, T. G. (2007). Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Human Molecular Genetics*, 17(2), 190–200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm296>
- Zenteno, J. C., Ruiz, G., Pérez-Cano, H., & Camargo, M. (2008). Familial Wolfram syndrome due to compound heterozygosity for two novel WFS1 mutations. *Molecular Vision*, 14, 1353–1357.
- Zmyslowska, A., Borowiec, M., Antosik, K., Szalecki, M., Stefanski, A., Iwaniszewska, B., . . . Mlynarski, W. (2011). Wolfram syndrome in the Polish population: novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Clinical Endocrinology*, 75(5), 636–641. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04102.x>



# 9. Anexos

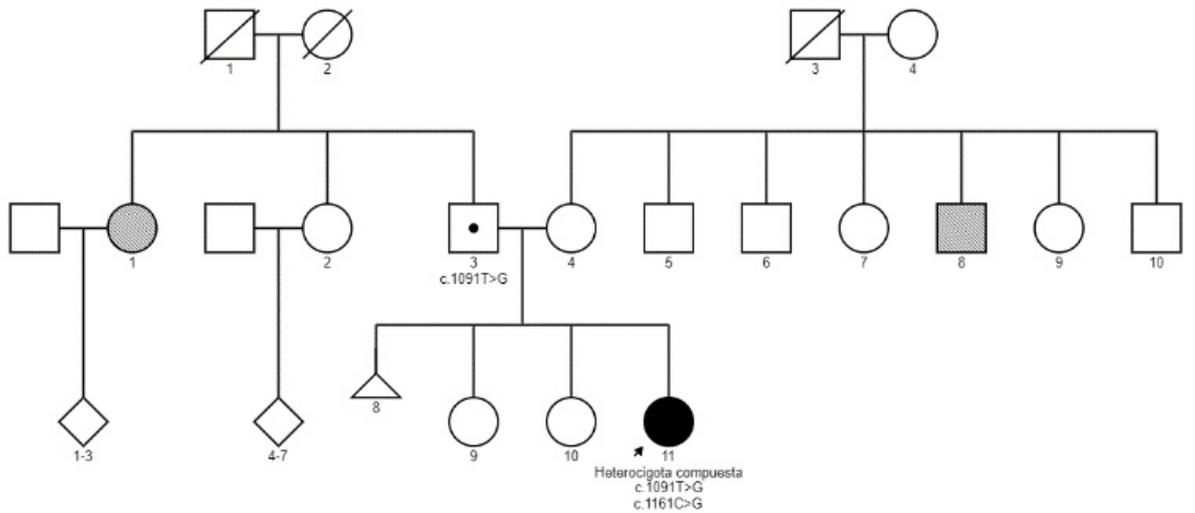
## Anexo. I Genealogías

Familia 1



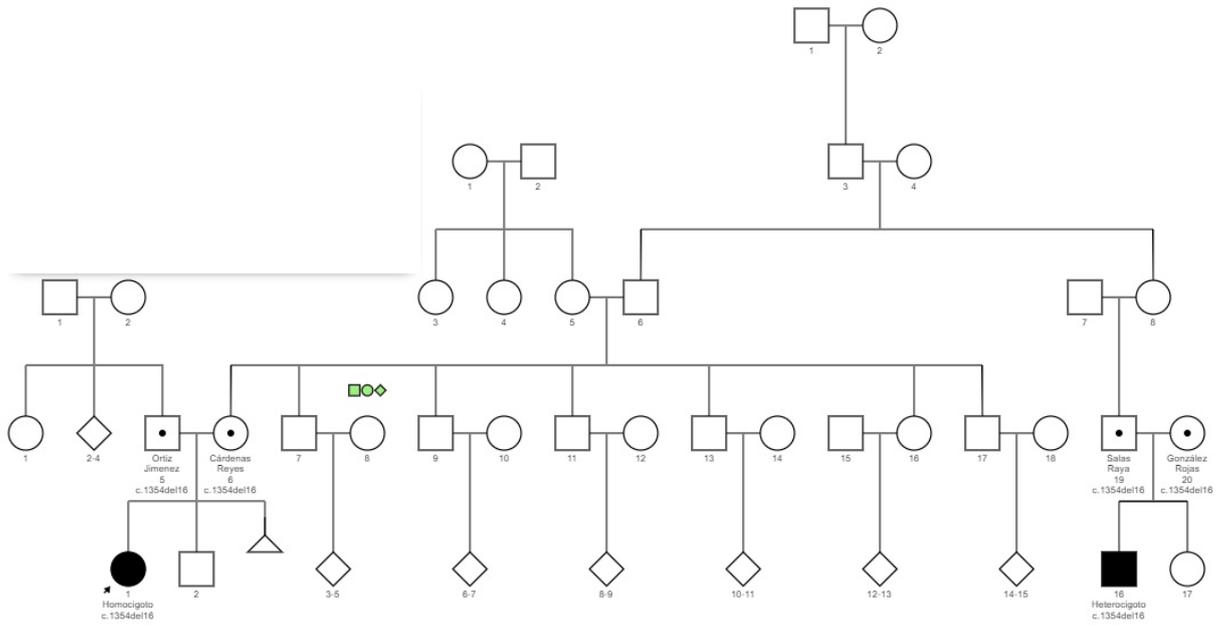
	Síndrome de Wolfram
	Heterocigoto variante WFS1
	New Entry..

Familia 2



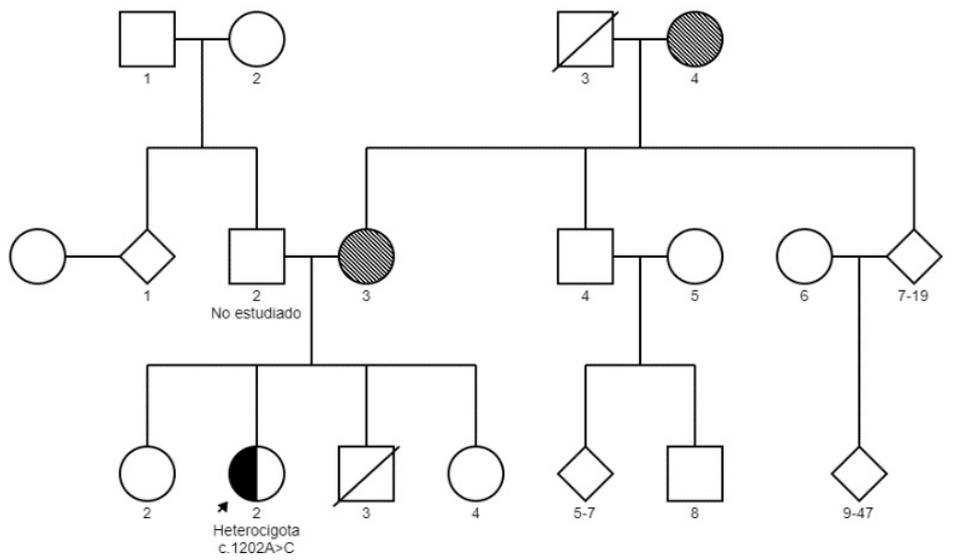
	Síndrome de Wolfram
	Heterocigoto variante WFS1
	New Entry..

### Familia 3



■ Síndrome de Wolfram  
 ● Heterocigoto variante en WFS1

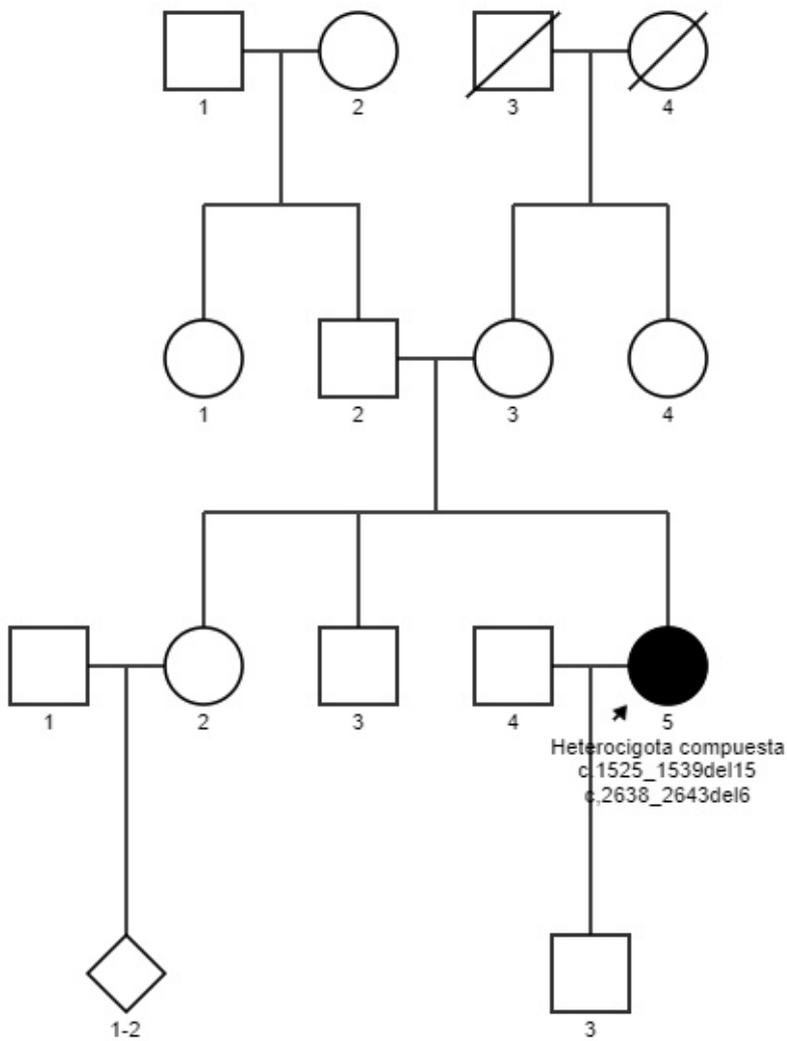
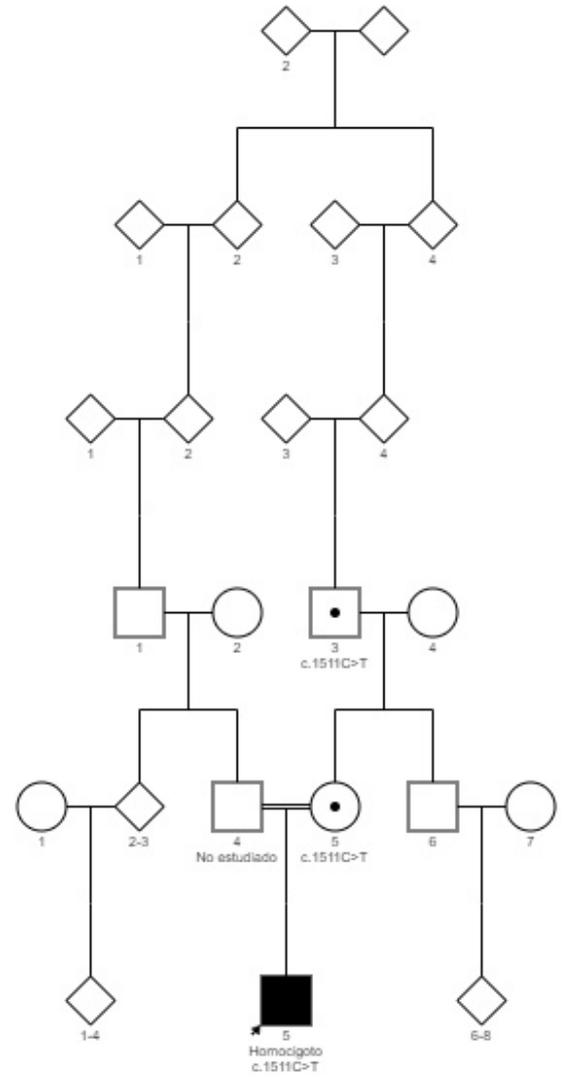
### Familia 4



■ Diabetes Mellitus 2  
 ■ Síndrome de Wolfram-like

Familia 5

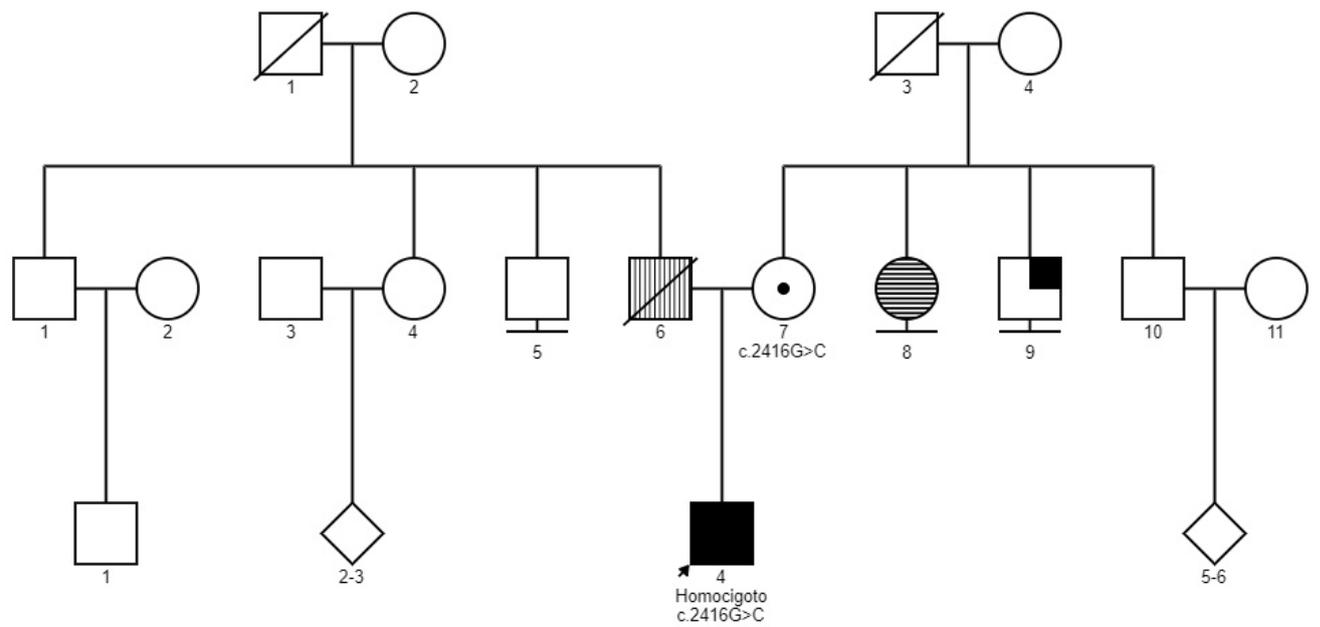
	Síndrome de Wolfram
	Heterocigoto variante WFS1
	New Entry..



Familia 6

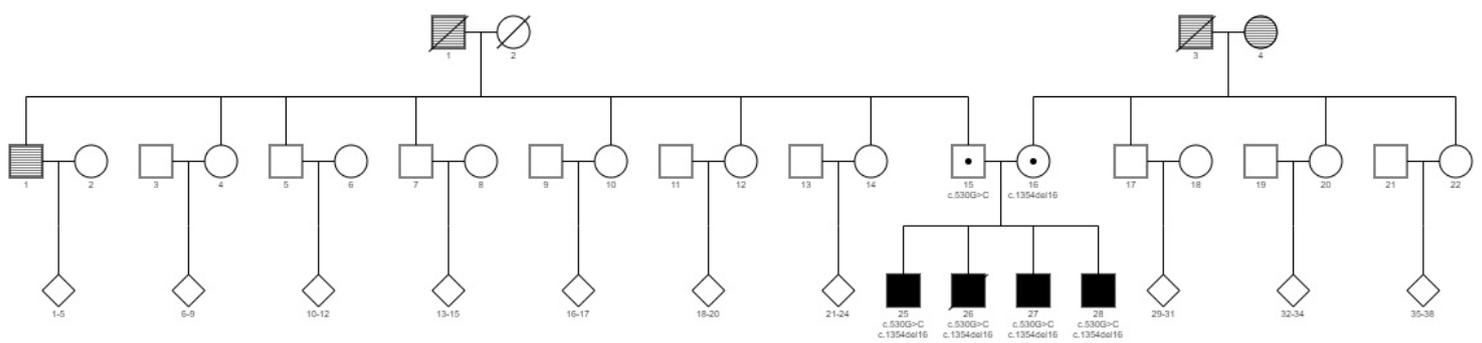
	Síndrome de Wolfram
	Heterocigoto variante WFS1
	New Entry..

## Familia 7

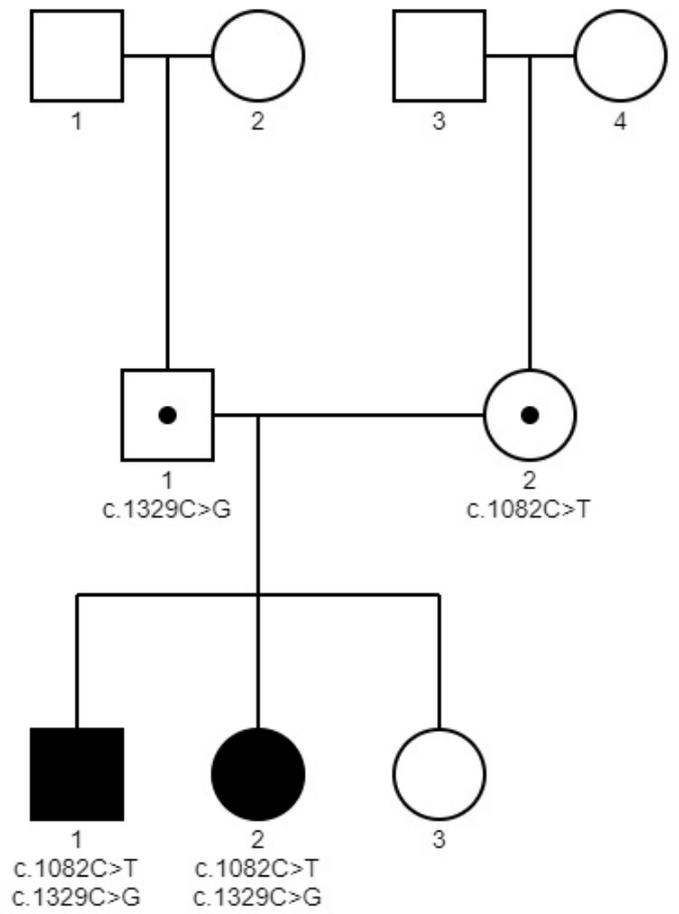


	Síndrome de Wolfram
	Cirrosis hepática
	Trastorno psiquiátrico
	Diabetes Mellitus 2
	Heterocigoto variante WFS1
	New Entry..

## Familia 8

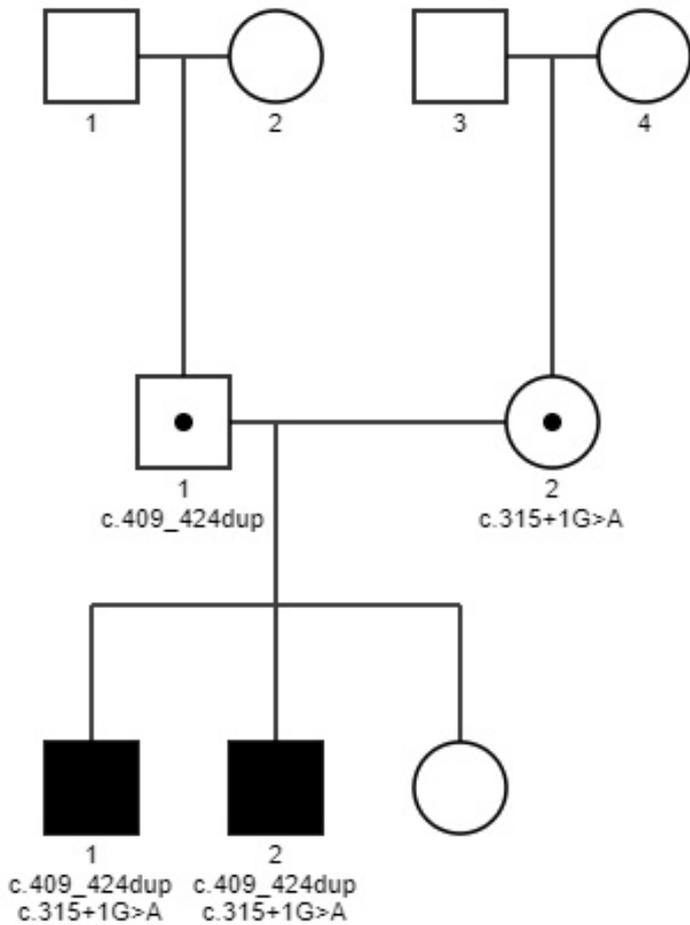


	Síndrome de Wolfram
	Heterocigoto variante WFS1
	Diabetes Mellitus 2
	New Entry..



Familia 9

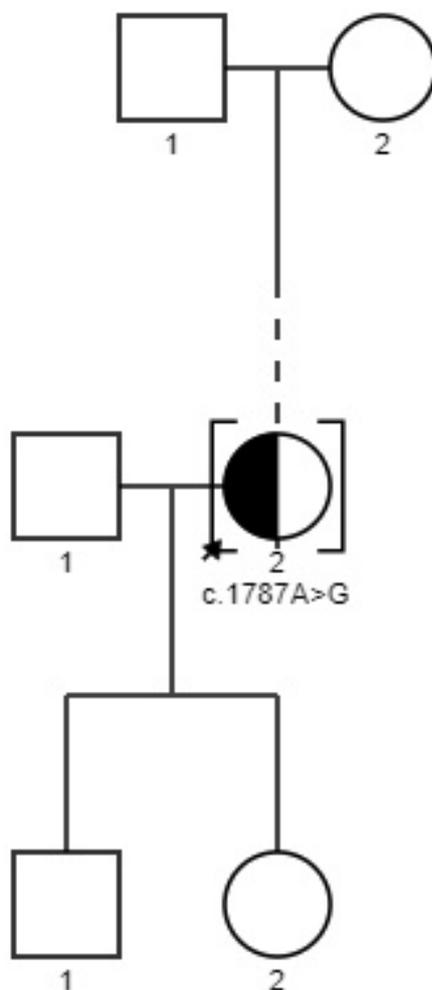
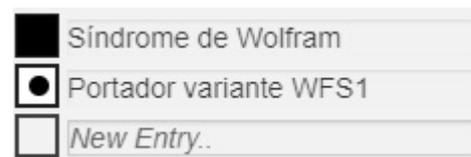
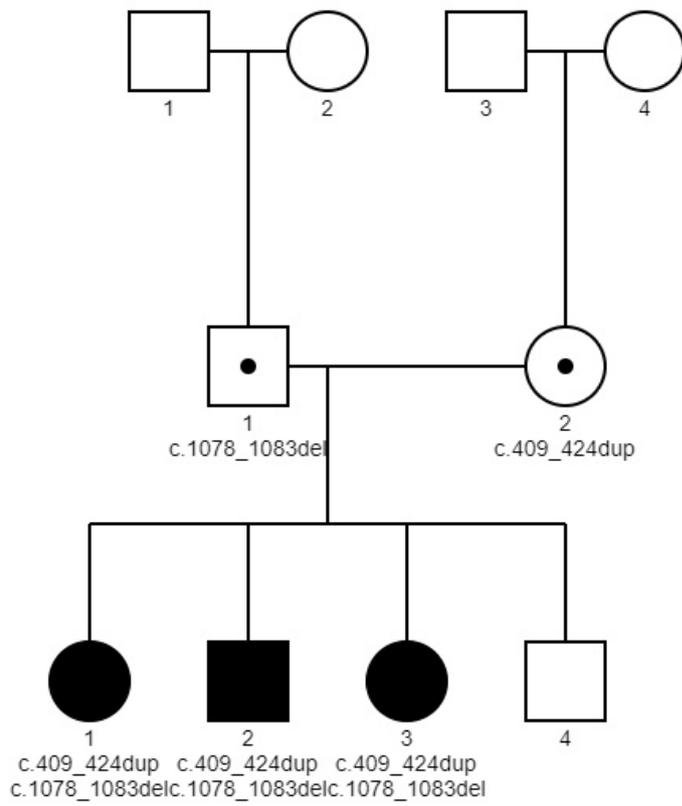
	Heterocigoto variante WFS1
	Síndrome de Wolfram
	New Entry..



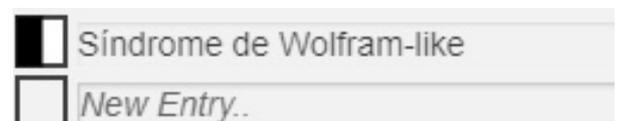
Familia 10

	Síndrome de Wolfram
	Heterocigoto variante WFS1
	New Entry..

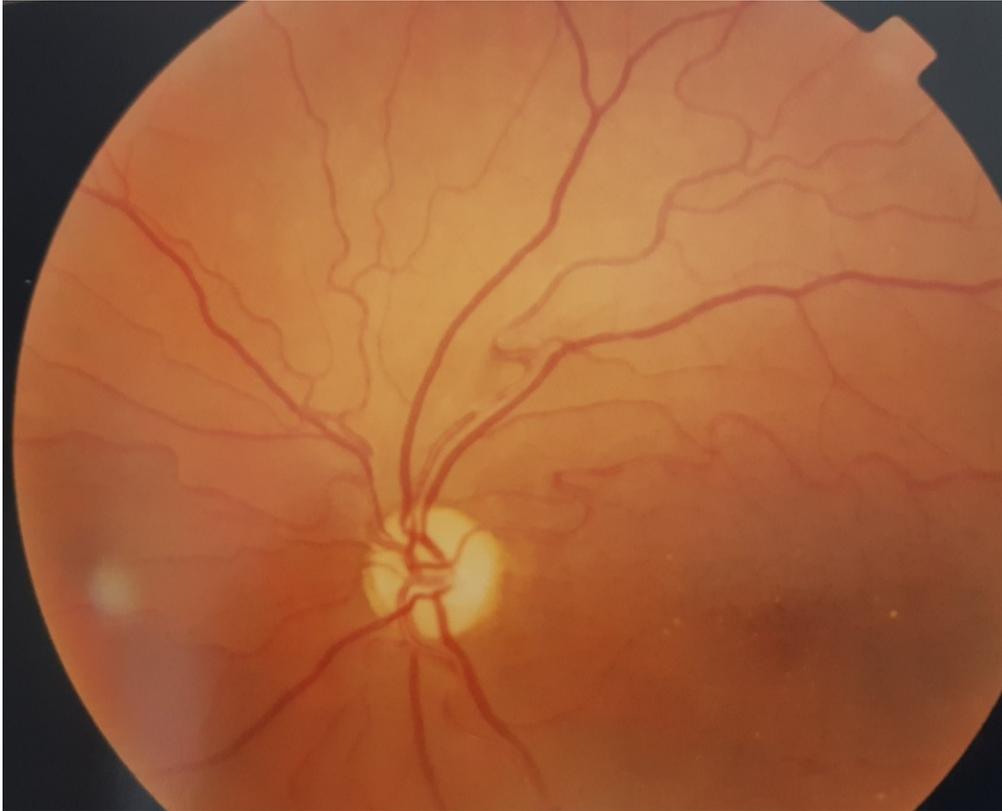
## Familia 11



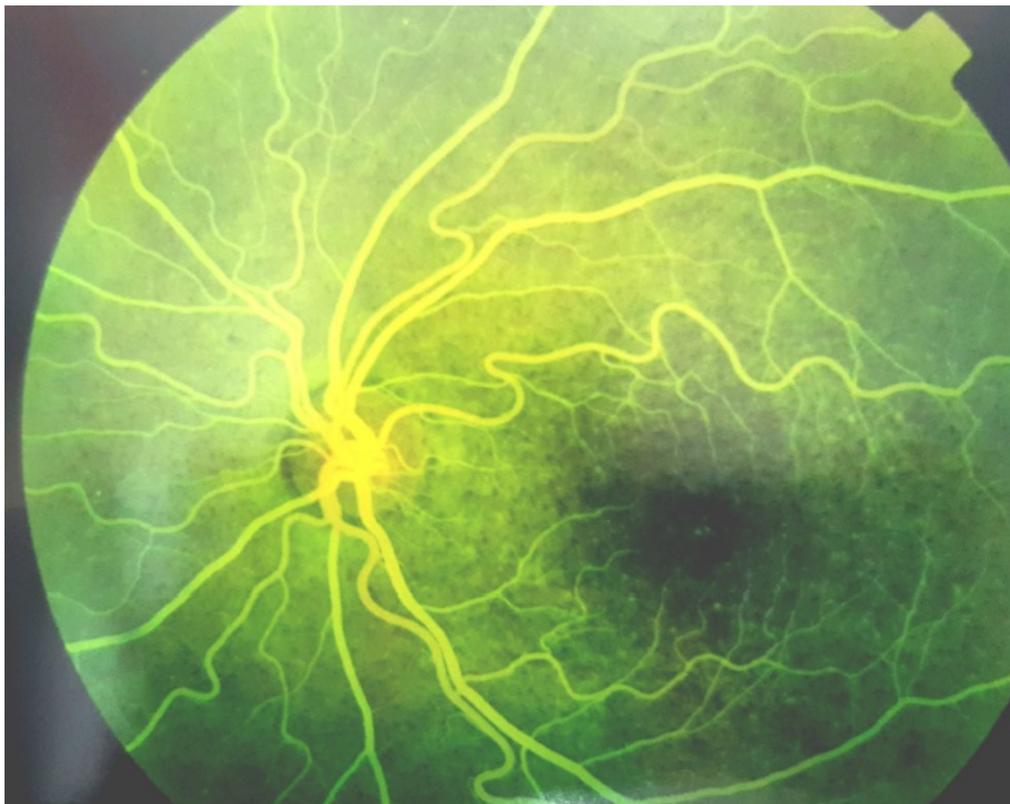
## Familia 12



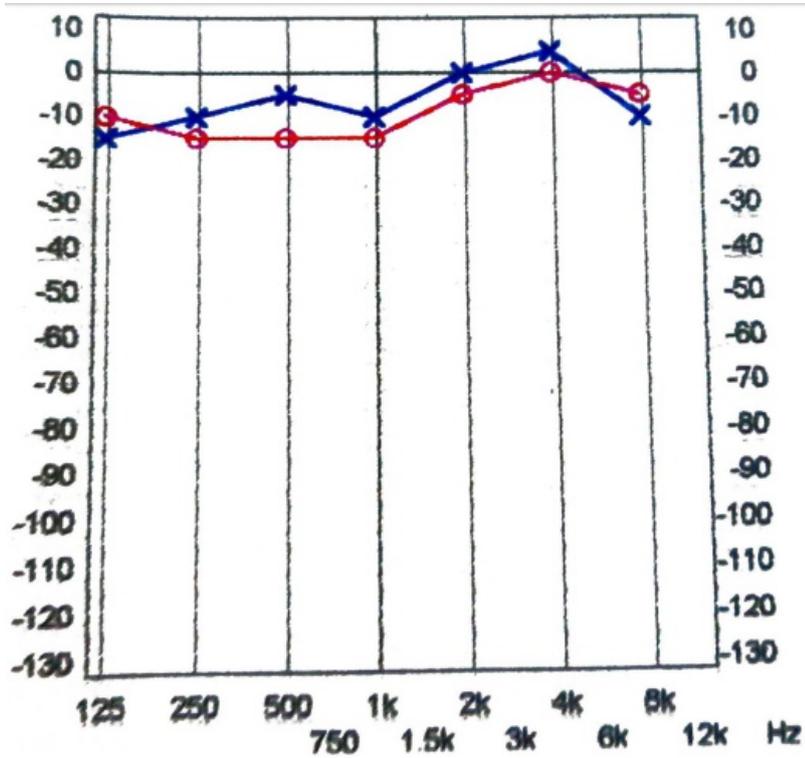
## Anexo II. Fondo de ojo



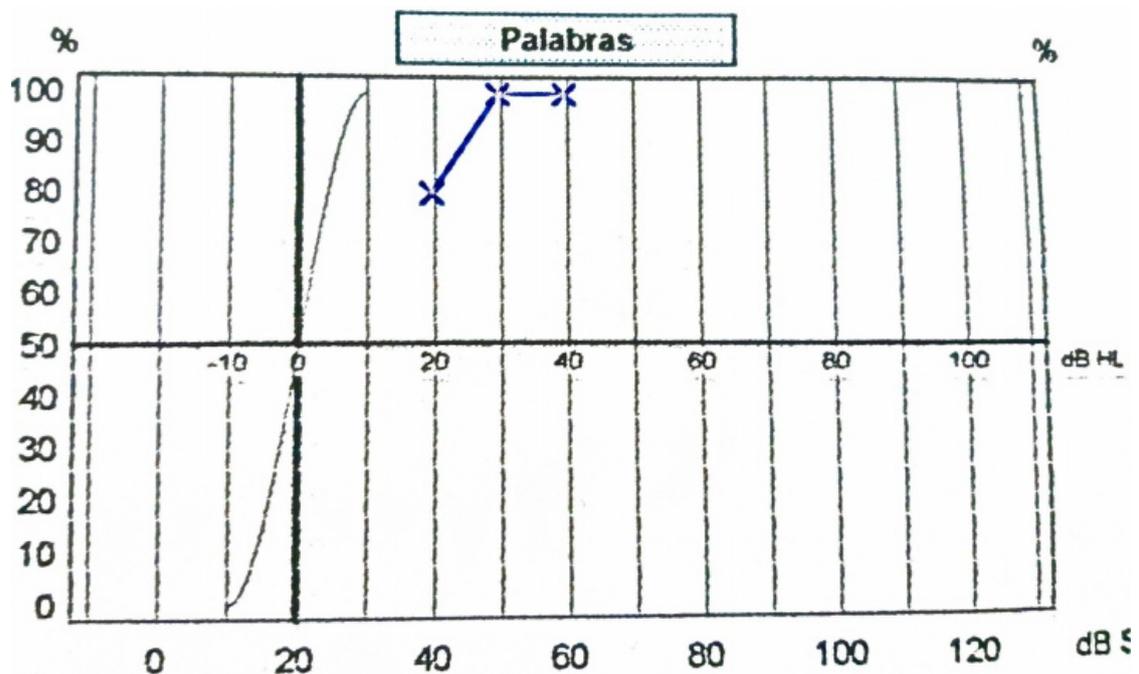
CASO 7. Papila pálida (moderada), vasos no se encuentran atenuados, dispersión del pigmento macular y drusas pequeñas en esa zona. Foto 2002 Servicio de Oftalmología del INCMNSZ

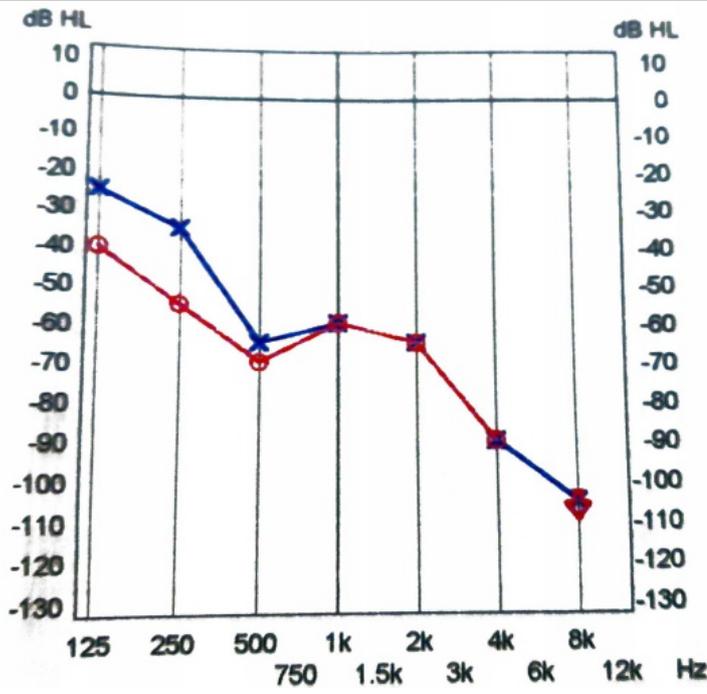


## Anexo III. Audiometrías

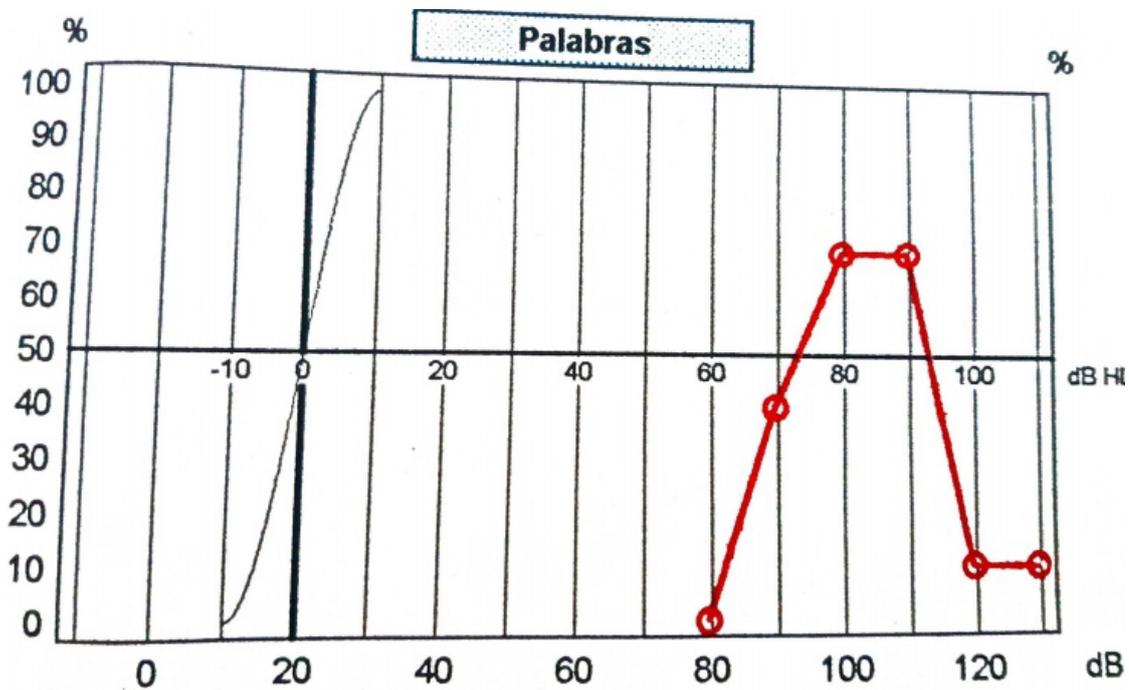
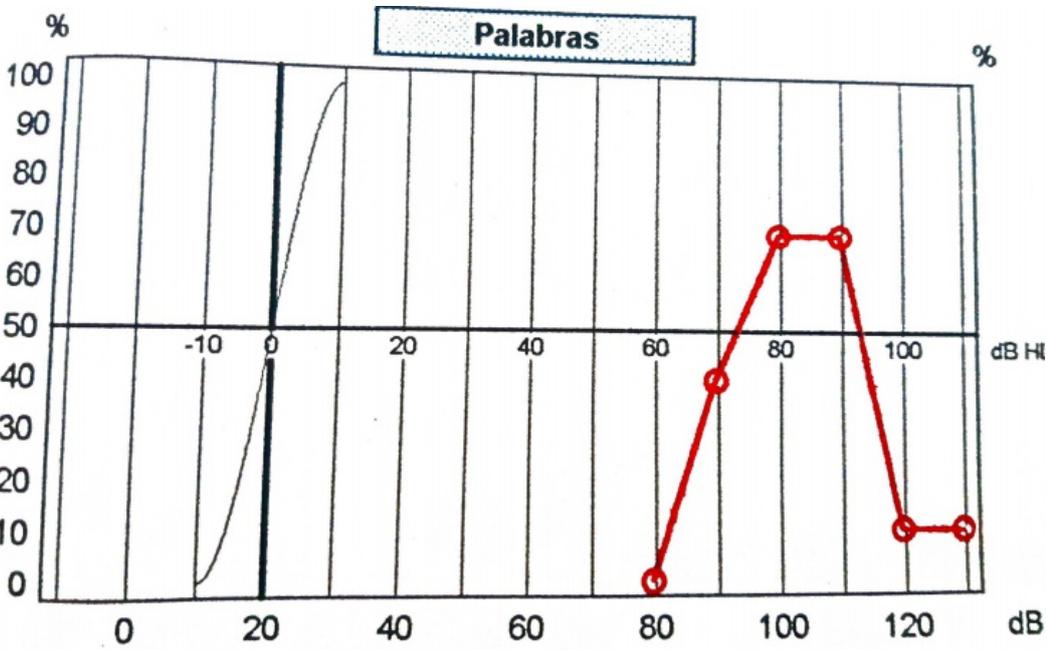


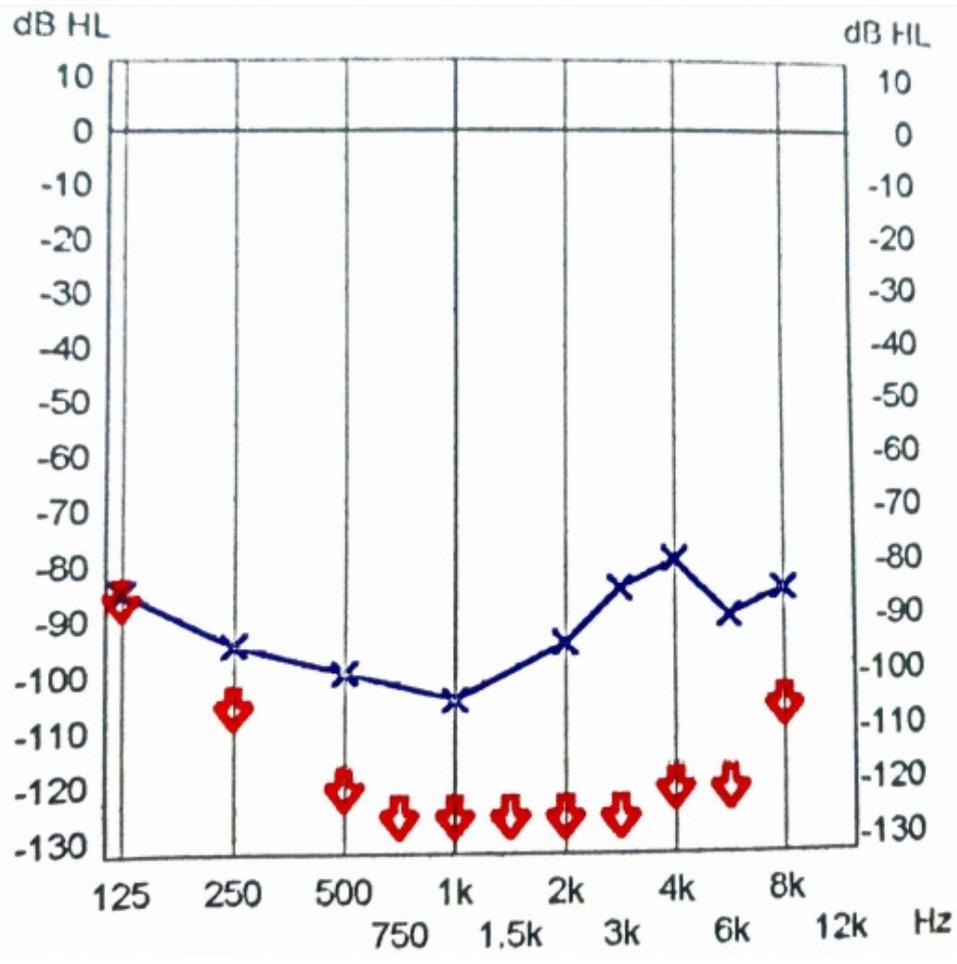
CASO 7. Papila pálida (moderada), vasos no se encuentran atenuados, dispersión del pigmento macular y drusas pequeñas en esa zona. Foto 2002 Servicio de Oftalmología del INCMNSZ





CASO 3. Hipoacusia de altas frecuencias. Patrón descendente.





CASO 19.

