

11216



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

4

SUBDIRECCION  
DIVISION  
TASAS

ESTUDIO CLINICO Y MOLECULAR EN 2  
FAMILIAS CON ENFERMEDAD DE NORRIE

SECRETARIA DE SALUD  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO  
ORGANISMO DESCENTRALIZADO

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO GENETISTA:

R E S E N T A :

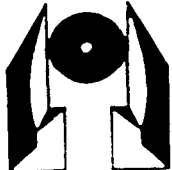
ELVIRA SILVET CHIÑAS LOPEZ



DIRECCION DE ENFERMERIA

*[Handwritten signature]*

TUTOR: MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA  
ASESOR: SERGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres y hermanas por su apoyo y confianza.**

**A mi pequeña Lluvia que me ayuda a darme cuenta de lo que es realmente importante.**

**A mi amado esposo por su paciencia.**

**A Patricia Fenton y Héctor Tenorio por creer siempre en mí.**

**A todo el servicio de Genética del Hospital General de México.**

## INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACION	18
4. OBJETIVO	18
5. PACIENTES Y METODOS	20
6. RESULTADOS	36
7. DISCUSION	39
8. ANEXO	42
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43

## RESUMEN

La enfermedad de Norrie (ND) es un padecimiento que se caracteriza principalmente por ceguera congénita bilateral debido a cambios proliferativos y degenerativos en retina y vítreo. La tercera parte de los pacientes presenta retraso mental y sordera neurosensorial. El padecimiento puede ser diagnosticado poco después del nacimiento debido a la presencia de leucocoria causada por anomalías en las estructuras retrolentales. La ND se transmite con un patrón de herencia recesivo ligado al X, aunque algunas mujeres portadoras pueden presentar anomalías oculares. El gen ND, formado por 3 exones, está localizado en Xp11.3-11.4, tiene 600kb y codifica para un polipéptido de 133 aminoácidos llamado norrina. Esta proteína tejido específica, ha sido implicada en la formación de la matriz extracelular, vasculogénesis y adhesión celular. La mayoría de los pacientes presentan mutaciones puntuales del gen ND, mientras que en el resto se observan deleciones o inserciones. El objetivo del presente estudio fue el análisis clínico y molecular de 2 familias con ND. Se realizó valoración oftalmológica y neurológica. Dentro de los resultados obtenidos se encontró que los dos hermanos afectados de la familia 1 presentaban alteraciones oculares, sin sordera ni retraso mental. El estudio molecular de los propósitos reveló la transición CgG>CcG en el codón 97 que produce un cambio de arginina por prolina. La misma alteración se encontró en la madre y en la hermana, ambas sin ninguna manifestación clínica de ND. 2 primos hermanos de la segunda familia presentaron las mismas alteraciones oculares típicas de ND. Una de las madres portadoras presentaba un ojo ambliope lo cual puede ser considerado como una manifestación leve de ND o bien una característica asociada.

En esta familia se refirieron a 2 individuos, que no fueron estudiados, con las mismas alteraciones oculares, uno de ellos con retraso mental e hipoacusia y el otro con alteraciones psiquiátricas. El estudio molecular mostró una detección parcial en la región 3' no traducida del gen ND. También se diagnosticó el estado de portadora a través de Genescan en la hermana de un afectado, este método resultó una herramienta útil para el diagnóstico de portadoras en ND. En esta última familia se pudo observar expresión variable del padecimiento, esta variabilidad ya ha sido reportada en otras familias, por lo que consideramos que es posible que interactúen factores epigenéticos o genes adicionales en la patogénesis de la enfermedad. Las alteraciones moleculares encontradas en el presente estudio no han sido reportadas en la literatura.

## ANTECEDENTES

En 1927 Gordon Norrie, describió varios casos de atrofia ocular congénita y enfatizó la ocurrencia familiar de este padecimiento, notó que sólo los hombres eran afectados y que el desorden se transmitía a través de mujeres no afectadas. En 1961 Warburg y Anderson, re-examinaron estas familias y propusieron el epónimo de enfermedad de Norrie <sup>1</sup> En 1966 Warburg estableció esta condición como una forma de ceguera congénita bilateral con un patrón de herencia recesivo ligada al X, caracterizada por malformación y degeneración de la retina, sordera y retraso mental.<sup>2</sup>

La enfermedad de Norrie (ND) (OMIMN 310600) es una forma severa de ceguera congénita con un patrón de herencia recesivo ligada al cromosoma X, caracterizada por atrofia ocular y una variedad de otros síntomas oculares. Un tercio de los pacientes presenta retraso mental y desarrolla hipoacusia progresiva neurosensorial, sin embargo recientemente se ha informado que todos los individuos afectados llegan a desarrollar con la edad algún grado de hipoacusia.<sup>3-5</sup>

### **Características clínicas y hallazgos histológicos:**

La ND clásica puede ser diagnosticada al nacimiento por la presencia de leucocoria bilateral, causada por membranas retrolentales y desprendimiento de retina, en la infancia temprana se presenta la formación de cataratas y degeneración corneal. A medida que la enfermedad avanza, los ojos empiezan a atrofiarse (por lo que también se le denominó atrofia bulborum hereditaria). Otras manifestaciones oculares incluyen estrechamiento, sinequias anteriores y posteriores, tejido fibrovascular retrolental en cámara anterior y hemorragias vitreoretinianas, plegamiento, desprendimiento, pseudotumor bilateral congénito (pseudoglioma) e hiperplasia del epitelio pigmentario de retina<sup>1</sup> Las alteraciones en el vitreo representan remanentes de vasos hialoideos y en ocasiones vitreo primario persistente. En algunos casos, se ha observado una marcada dilatación de los vasos del iris.<sup>6</sup>

Se ha descrito que un tercio de los pacientes presenta retraso mental, desarrollando sordera neurosensorial desde la infancia o bien en la 4-5 década de la vida.<sup>5,7</sup> Muchos estudios han mostrado que el retraso mental y la pérdida auditiva neurosensorial progresiva son altamente variables aún dentro de la misma familia<sup>3,4</sup>

Estudios histológicos muestran desorganización de las capas nucleares de la retina con rosetes formados por células bipolares y fotorreceptoras, disminución importante de células ganglionares y paso de algunas de estas células a la capa interna plexiforme<sup>6</sup> También se ha descrito fibrovascularización retiniana anormal, grandes áreas de hemorragia y exudados subretinianos<sup>8,9</sup>



### **Variabilidad fenotípica de la ND:**

La vitreoretinopatía exudativa familiar ligada al X (EVRX), la retinopatía del prematuro, en sus estadios avanzados (ROP IV, V) y la enfermedad de Coats eran consideradas enfermedades diferentes hasta que se caracterizó el gen ND. Se reconoció que mutaciones idénticas de este gen pueden ocasionar cualquiera de estas patologías, y que mutaciones diferentes en el mismo gen pueden dar un cuadro clínico distinto.

La EVRX familiar es una distrofia vitreoretiniana que se caracteriza por la detención prematura de la vascularización de la retina periférica. Las características clínicas son muy variables, van desde una ectopia macular y disminución moderada de la agudeza visual hasta el desprendimiento de retina con hemorragia vítrea y ceguera total. Las alteraciones son lentamente progresivas y el desprendimiento de retina frecuentemente ocurre hasta la primera o segunda década de la vida, a diferencia de la ND en la cual las alteraciones son observadas al nacimiento o poco después <sup>10</sup>

La ROP se trata de una proliferación anormal de vasos sanguíneos retinianos que ocurre en recién nacidos prematuros. Entre los factores de riesgo se encuentran la inmadurez y el suplemento de oxígeno y se clasifica en 5 estadios. Los 3 primeros corresponden a la retinopatía aguda, el cuarto y el quinto corresponden a las secuelas como son desprendimiento de retina parcial o total. Otras características observadas en estos últimos estadios son espacio retrolenticular ocupado por tejido denso, cámara anterior estrecha, edema de córnea, atrofia de iris, sinequias posteriores y ectropión uveal. La ROP se desarrolla gradualmente. Los estadios más tempranos aparecen 6 a 8 semanas después del nacimiento. Se ha propuesto como

causa de esta anomalía la presencia de células fusiformes en la periferia de la retina inmadura que al ser expuestas a radicales libres de oxígeno secreten un factor angiogénico que promueve la proliferación vascular. Sin embargo, debido a que modelos animales de la enfermedad no progresan a los estadios 4 y 5, se ha pensado estos últimos estadios se deban a factores genéticos.<sup>11-13</sup>

En ambas ROP y EVRX se han encontrado mutaciones en el gen ND.<sup>10, 11, 14, 15</sup>

Recientemente otra enfermedad llamada enfermedad de Coats se ha asociado con mutaciones en el gen ND. Se caracteriza por desarrollo anormal unilateral de la vasculatura retiniana (telangiectasias retinianas), se observa displasia retiniana exudativa, la cual frecuentemente contiene cristales de colesterol. El análisis molecular en 1 de 9 varones afectados con esta enfermedad mostró una mutación somática (Cys96Phe) en el gen ND. El mismo cambio fue identificado en una mujer con enfermedad de Coats unilateral la cual tuvo un hijo con enfermedad de Norrie. Se ha especulado que la enfermedad unilateral en la madre fue debida a la inactivación no al azar del cromosoma X en el ojo afectado o a una mutación somática que inactiva al alelo normal.<sup>16</sup>

## Formas sindromáticas y atípicas de ND

Se han descrito pacientes con ND con fenotipos complejos tales como microcefalia, criptorquidia, vello púbico y axilar ausente. Además algunos pacientes muestran falanges distales de los pulgares cortas e impotencia sexual. Otro paciente se describió con microcefalia, hipogonadismo, retraso en el crecimiento e inmunodeficiencia. Se han observado casos adicionales con un curso clínico atípico que incluyen retraso en el crecimiento y desarrollo, así como hipoplasia gonadal. Frecuentemente, se han encontrado deleciones intersticiales submicroscópicas de la región proximal del brazo corto del cromosoma X, sugiriendo que estos fenotipos complejos son debidos a la pérdida de genes adyacentes.<sup>17,26</sup>

Por otra parte, se demostró que en una familia con ND la insuficiencia venosa periférica cosegregó con la enfermedad, en 15 varones afectados. Esto puede indicar que la insuficiencia venosa periférica es otro efecto pleiotrópico de mutaciones en el gen ND o que exista un gen responsable muy cercano al gen ND.<sup>27</sup>

Es importante mencionar que se han reportado casos de mujeres portadoras con manifestaciones clínicas de la ND siendo el mecanismo más probable una inactivación no al azar o desfavorable.<sup>28-30</sup>

## Diagnósticos diferenciales

Existe un espectro de enfermedades que muestran una o más características similares a ND que incluye el retinoblastoma, la persistencia de vitreo primario hiperplásico(PHPV), displasia retiniana de Reese, y la retinosquisis juvenil ligada al X (XLR5) . En la gran mayoría de los pacientes, el diagnóstico diferencial es posible por campo clínico o en combinación con análisis de DNA.

Muchos niños con ND son mal diagnosticados como portadores de retinoblastoma bilateral ya que esta neoplasia intraocular es la más común en niños, sin embargo el retinoblastoma es debido a mutaciones en un gen tumor-supresor localizado en 13q14. El primer signo de presentación es la leucocoria que es el resultado del reemplazo de vitreo por el tumor o por un tumor creciendo en la mácula. Otro síntoma común es el estrabismo que ocurre cuando un tumor pequeño macular interfiere con la visión, o puede estar asociado con la leucocoria. Signos menos frecuentes de presentación son ojo rojo, dolor ocular con glaucoma secundario, celulitis orbital, midriasis unilateral y heterocromía. Debido a que muchos de los síntomas no son específicos se emplea una variedad de estudios tal como tomografía computarizada, resonancia magnética, ultrasonografía y biopsia por aspiración con aguja fina. El estudio molecular es importante para definir si el defecto genético es somático ó constitutivo <sup>17</sup>

En contraste con ND la leucocoria asociada con la PVPH es usualmente unilateral, tiene una apariencia clínica característica que consiste en una córnea pequeña y procesos ciliares prominentes. Por ecografía se observa un globo ocular más pequeño de lo normal. Los lentes de la cápsula posterior pueden ser irregulares, el cristalino puede ser delgado, o puede tener una membrana retrolenticular. En esta

enfermedad el espectro clínico es amplio, en los casos severos puede presentarse microftalmia, placas fibrovasculares retrolentales, desprendimiento de retina y puede ocurrir displasia retiniana que conduce a catarata, glaucoma secundario y finalmente a atrofia ocular. Los pacientes pueden presentar además microcefalia, retraso mental, paladar hendido y corta estatura.<sup>18</sup>

La displasia retiniana de Reese está frecuentemente asociada con malformaciones extraoculares severas de la cabeza, pulmón, corazón, sistema urogenital, o del esqueleto y lleva a la muerte en el primer año de vida.<sup>19</sup>

La retinosquisis ligada al X es una hendidura intraretiniana secundaria a degeneración que se manifiesta clínicamente en la primera o segunda década de la vida. La degeneración lleva a una hendidura en la retina, desprendimiento de la misma y finalmente a atrofia retiniana completa, con esclerosis de la coroides. El gen responsable de la RSLX ha sido aislado recientemente y se localiza en Xp22.2-p22.1. Se detectan mutaciones en más del 90% de los pacientes.<sup>20</sup>

### **Aspectos moleculares de ND**

La localización del gen ND fue establecida inicialmente mediante estudios de ligamiento ubicándolo en Xp11.3-11.4 (Fig 1) cercano a los genes de la monoaminooxidasa (MAOA y MAOB).<sup>21-28</sup>

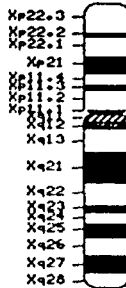


Fig. 1 Localización del gen ND.

El gen ND está formado por 3 exones de 209, 381 y 1245pb, respectivamente, interrumpidos por 2 intrones de 15 y 9 kb. La secuencia codificante es sólo de 399 pb, mientras que el codón de inicio de la traducción está en el exón 2 <sup>39, 40</sup>

Un gran número de mutaciones han sido descritas en el gen ND. Su espectro incluye una translocación, una inversión, varias deleciones y más de 70 mutaciones puntuales, (Tabla 1) la mayoría de las cuales son de sentido equivocado y sin sentido, una mutación corresponde al sitio de empalme <sup>3, 14, 37, 39, 41-45, 62</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Codon	Fenotipo	Cambio
1	ND clásica	Met, Arg
1	ND clásica	Met, Val
1	ND clásica	Met, Val
1	ND clásica	Met, Val
13	ND clásica	Leu, Arg
29	ND clásica	Ser, Stop
39	ND clásica	Cys, Arg
41	EVR esporádica	Arg, Lys
42	EVR familiar	His, Arg
44	ND clásica	Tyr, Cys
57	ND clásica	Ser, Stop
58	ND clásica	Lys, Asn
58	EVR esporádica	Lys, Asn
60	ND clásica	Val, Glu
61	ND clásica	Leu, Phe
61	ND clásica e insuficiencia venosa	Leu, Phe
61	ND clásica	Leu, Pro
63	ND clásica	Ala, Asp
65	ND clásica	Cys, Tyr
65	ND clásica	Cys, Trp
67	ND, mujer portadora	Cys, Ser
73	ND clásica	Ser, Stop
74	ND clásica	Arg, Cys
74	ND clásica	Arg, Cys
75	ND clásica	Ser, Cys
80	ND clásica	Arg, Pro
85	ND clásica	Cys, Arg
86	ND clásica	Cys, Tyr
86	ND clásica	Cys, Tyr
101	ND leve	Ser, Phe
104	ND leve	Lys, Gln
105	ND clásica	Ala, Thr
108	ROP	Leu, Pro
109	ND clásica	Arg, Stop
109	ND clásica	Arg, Stop
109	ND clásica	Arg, Stop
109	ND clásica	Arg, Stop
110	ND clásica	Cys, Stop
110	ND clásica	Cys, Stop
110	ND clásica	Cys, Arg
110	EVR familiar	Cys, Gly
120	EVR esporádica	Tyr, Cys
121	ND clásica	Arg, Gln
121	ND leve	Arg, Gln
121	EVR familiar	Arg, Leu
121	EVR familiar	Arg, Leu
121	ND leve	Arg, Trp
121	EVR familiar, ND leve	Arg, Trp
121	EVR familiar	Arg, Trp
121	ROP	Arg, Trp
121	ROP	Arg, Trp
121	ROP	Arg, Trp
123	ND clásica	Ile, Asn
123	ND clásica	Ile, Asn
124	EVR familiar	Leu, Phe
126	ND clásica	Cys, Stop
126	ND clásica	Cys, Stop
126	ND clásica	Cys, Ser
126	ND clásica	Cys, Stop

Tabla 1. Mutaciones de sentido equivocado y sin sentido en el gen ND (4).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Mutaciones en el gen ND han sido detectadas en pacientes con VREX y en la ROP en estadios avanzados.<sup>10,13,14,26,46,47</sup> Mutaciones en el codón 121 dan un amplio espectro fenotípico y la misma mutación puntual puede producir ND, VRE familiar o ROP. En cambio diferentes mutaciones en la misma posición pueden ocasionar fenotipos moderados o clásicos de ND.<sup>4,45,47</sup> Por otro lado, una misma mutación produce una gran variabilidad fenotípica intrafamiliar. El hecho de que las mismas mutaciones den diferentes fenotipos sugiere la participación de factores epigenéticos en la patogénesis de este desorden. Definiendo a estos factores como los mecanismos que pueden modificar o alterar la expresión de un producto génico, sin producir cambios en la secuencia del DNA.

### **Aspectos moleculares de la proteína Norrina**

La proteína norrina consta de 2 dominios característicos, un péptido señal de 24 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, lo que sugiere que es secretada y un dominio C-terminal rico en cisteína que muestra homología con diversas proteínas modulares, como las mucinas, el factor de von Willebrand, la proteína slit de drosophila encargada del desarrollo de la glia de la línea media y proteínas de unión a factores de crecimiento como Cef-10 y Cyr61.<sup>40, 48, 49</sup>

La norrina forma parte del grupo de proteínas mucina-like, proteínas extracelulares altamente glucosiladas presentes en los fluidos mucosos y primariamente responsables de su carácter tipo gel. Las mucinas pueden agruparse en mucinas de membrana, formadoras de gel y solubles pequeñas. Cuatro mucinas humanas formando gel fueron identificadas como proteínas con un nudo de cisteína, con una alta similitud al factor de Von Willebrand (vWf), a la norrina, así como a los



antagonistas de las proteínas de la morfogénesis ósea (BMP).<sup>36,40,41,43,49-52</sup> Se ha propuesto que el nudo C-terminal de cisteína forma dímeros ligados covalentemente y geles insolubles multiméricos a través de enlaces de los dominios ricos en cisteína en ambos extremos C y N terminales. La homología entre la norrina y otras proteínas mucina-like indica que la norrina puede ser un componente de la matriz extracelular.<sup>4 52</sup> La tranfección de células COS 7 con diferentes estructuras han dado una pista para su función bioquímica. Estos estudios muestran que la norrina es secretada en forma de dímeros que subsecuentemente forman oligómeros que se asocian a la matriz extracelular.<sup>53</sup> La oligomerización, pero no la dimerización es abolida al reemplazar la cisteína de la posición 95 produciendo una disminución en la secreción de la norrina. La disminución extracelular y las alteraciones estructurales adicionales en esta proteína mutante pueden ser responsables del fenotipo de esta enfermedad. La ceguera, sordera y retraso mental reportadas en el humano pueden ser debidas a alteraciones en la composición de la matriz extracelular y al resultado de una disrupción en la interacción célula-célula.<sup>4 52</sup>

El modelo molecular del producto del gen ND predice una estructura muy similar al factor de crecimiento transformante beta.<sup>40</sup> El análisis por computadora también predice la formación de dímeros, lo cual concuerda con los datos experimentales obtenidos de la expresión de la proteína (Fig 2)

## **Mecanismos patogénicos posibles**

Al parecer la norrina tiene una función importante en la vascularización de la retina interna, sobre todo en la formación de los pequeños vasos de la mayoría de las ramas de la arteria retiniana. Esta hipótesis se apoya en: 1) los hallazgos histológicos de los pacientes con ND y sus variantes, 2) en las observaciones realizadas en ratones mutantes portadores de un gen ND inactivo, 3) en hallazgos angiográficos en los descendientes de portadoras y 4) en la homología del gen ND a Cyr61, una proteína de unión a factores de crecimiento asociada a la matriz extracelular que induce neovascularización corneal.

Los análisis bioquímicos que estudian la expresión de la norrina en células COS-7 sugieren que esta proteína forma dímeros u oligómeros que se asocian a la matriz extracelular cuando se liberan de las células de la retina interna.<sup>53</sup> La forma unida a la matriz puede entonces provocar la migración de las células endoteliales y participar en la formación de vasos sanguíneos, llevando a la vascularización normal de la retina. Cuando el gen ND no se expresa, la vascularización no ocurre y las células ganglionares así como otras neuronas inician su degeneración que lleva a la proliferación de células gliales, que se observa como una gliosis masiva en los pacientes con ND. Debido a estas alteraciones primarias en la neuroretina, el vítreo secundario se desarrolla de forma anormal, en cambio hay persistencia del vítreo primario, así como de los vasos hialóideos. Esto explica la patología vítrea observada en los pacientes. Los síntomas oculares adicionales que afectan al cristalino, iris y córnea pueden ser consecuencias terciarias. Se sugiere que en el oído la norrina puede facilitar la interacción entre las células marginales y los capilares. Sin norrina, las células de la estria vascularis pueden no funcionar.

adecuadamente debido a una disminución en la capacidad para adquirir nutrientes y gases del sistema vascular. Esto puede ser seguido por cambios en el umbral de audición a medida que declinan el potencial endococlear y las concentraciones de potasio<sup>5</sup> Posiblemente, las neuronas espirales ganglionares en la estria vascularis y el sistema vascular asociado a estas estructuras, sean el sitio de mayor disfunción coclear en la ND. Aunque la función exacta de la norrina no es totalmente conocida, su participación en ojos y oídos implica un papel importante en la biología vascular y en las conexiones íntimas entre tejidos, formando un soporte vascular.

### **Modelo animal para la enfermedad de Norrie**

El gen ND en el ratón fue aislado a partir de cDNA humano, se localiza en cromosoma al X y consta de 3 exones<sup>54</sup> Codifica para un polipéptido de 131 aminoácidos y tiene una homología de 94% con el gen ND humano. La expresión tejido específica fue analizada por hibridación in situ de RNAm encontrándose altos niveles de expresión en las tres capas de la retina (nuclear externa, nuclear interna y en células ganglionares), en células de Purkinje del cerebelo, en hipocampo, en el bulbo olfatorio, en células ganglionares espirales y en la estria vascularis de la cóclea<sup>5,54,56</sup>

Los ratones knock-out para el gen ND muestran masas fibrosas en el humor vítreo, así como una desorganización de las células ganglionares de la retina y una desorganización esporádica o degeneración de otras células de la retina (Fig 3)

El análisis histológico de la cóclea mostró desorganización de los vasos sanguíneos y un desarrollo anormal del lecho capilar, estos cambios fueron particularmente

pronunciados en la porción apical de la cóclea, la vasculatura de la región ganglionar espiral muestra también un pobre desarrollo del lecho capilar.(Fig. 3)

En este mismo estudio se demostró que la sordera neurosensorial lleva a una sordera profunda con el tiempo y aunque existe variabilidad en la edad de presentación, la penetrancia de ésta parece ser completa.<sup>5</sup> Estos ratones presentan un fenotipo ocular y auditivo muy similar al humano con ND.



Fig 2 Factor de crecimiento transformante Beta 2

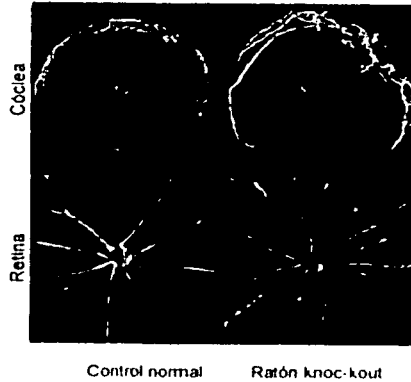


Fig. 3 Fluorangiografía de los pequeños vasos de la retina interna y la córnea. En la córnea se muestra una desorganización de los vasos sanguíneos y un desarrollo anormal del lecho capilar. En retina se observa el adelgazamiento importante de los vasos sanguíneos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **JUSTIFICACION**

La enfermedad de Norrie es una forma de ceguera congénita o de inicio en la infancia temprana, presenta un grado amplio de variabilidad inter e intrafamiliar y en aproximadamente un tercio de los pacientes se presenta retraso mental e hipoacusia neurosensorial progresiva

Actualmente no existen estudios moleculares del gen ND en la enfermedad de Norrie en nuestra población y dado que estudios moleculares en distintos padecimientos en población mexicana han dado resultados interesantes y diferentes a los referidos en la literatura internacional consideramos importante conocer si el comportamiento de la enfermedad es similar a lo ya reportado o si podemos identificar nuevas mutaciones que enriquezcan el conocimiento de la enfermedad.

Por otro lado es importante la aplicación de técnicas de biología molecular para la identificación de posibles portadoras, tanto en los casos familiares como en los que sólo existe un afectado, para poder proporcionar a la familia un consejo genético preciso.

En el presente trabajo, se realizó el estudio molecular en 2 familias no relacionadas con el diagnóstico clínico de ND con el fin de identificar cambios moleculares no reportados y profundizar en el conocimiento de la enfermedad

## **OBJETIVO**

Identificar alteraciones moleculares del gen ND en dos familias con enfermedad de Norrie

## **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Reporte de casos

### **Criterios de inclusión**

Pacientes con enfermedad de Norrie y familiares que acepten participar en el estudio mediante carta de consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión**

Individuos que no deseen participar en el estudio.

### **Criterios de eliminación**

Cuando no sea posible realizar todos los procedimientos requeridos en la investigación

## **PACIENTES Y METODOS**

### **Pacientes**

El estudio incluyó dos familias con diagnóstico clínico inicial de enfermedad de Norrie.

#### **Familia 1 (Fig. 4)**

Los propósitos (II-2,II-3) de 6 y 4 años respectivamente, fueron productos a término sin complicaciones, embarazo normoevolutivo, hijos de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. No hay antecedentes heredofamiliares de importancia por parte del padre, de la madre se desconocen antecedentes por ser hija adoptiva. Período perinatal y desarrollo psicomotor normales

El paciente II 2 fue diagnosticado inicialmente con retinoblastoma bilateral a los 8 meses de edad. Al año los estudios oftalmológicos confirmaron el diagnóstico de ND. La audiometría y valoración neurológica a la edad de 4 años fueron normales

El paciente II-3 fue diagnosticado con ND a los 3 meses de edad mediante valoración oftalmológica. La audiometría y la valoración neurológica fueron normales.

Al momento de este estudio la valoración oftalmológica, llevada a cabo en el servicio de Oftalmología del Hospital General de México reportó lo siguiente

Ceguera bilateral, nistagmus, globos oculares pequeños, opacidad corneal importante, iris adosado a endotelio, pupila puntiforme no reactiva, sinequias posteriores y catarata. El ultrasonido ocular reportó globos oculares con diámetro



anteroposterior de 15 a 17mm, ausencia de cámara anterior, aumento de ecogenicidad en cristalino y vítreo anterior y retina aparentemente aplicada. (Fig. 5)

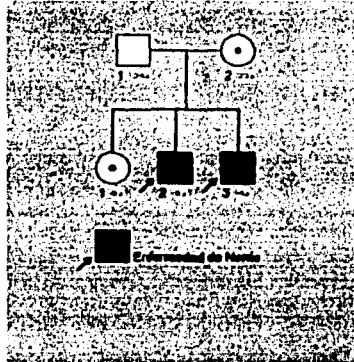


Fig. 4 Árbol genealógico de la familia 1



Fig. 5 Ultrasonido ocular del paciente II 2

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Familia 2 (Fig. 6)

Los primos hermanos (V5 y V7) de 6 y 10 años fueron productos a término sin complicaciones, embarazo normoevolutivo, hijos de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Entre sus antecedentes, heredofamiliares existen 9 familiares afectados por rama materna con ND

El paciente V 5 fue valorado oftalmológicamente en otra institución de donde es enviado a nuestro servicio con diagnóstico de ND, la valoración neurológica y capacidad auditiva se reportaron normales

El paciente V 7 a los 6 meses de edad sus padres notaron que no seguía objetos, no fijaba la mirada y presentaba nistagmus bilateral, sin embargo por estar presente esta enfermedad en otros miembros de la familia no acuden a consulta . A los 5 años es valorado por oftalmología diagnosticándose ND.

Al momento de este estudio la valoración oftalmológica, llevada a cabo en el servicio de Oftalmología del Hospital general de México reportó lo siguiente:

Ceguera bilateral, nistagmus horizontal OD No percibe la luz, globo ocular muy pequeño en vías de atrofia, córnea pequeña con opacidad central estromal y endotelial, resto de las estructuras no conservadas OI globo ocular de tamaño aparentemente normal, córnea con opacidad inferior discreta estromal y endotelial, cámara anterior estrecha, pupila puntiforme, sinequias posteriores, pigmento en cristaloides anterior, pupila no reactiva, opacidad en cristalino (Fig 7)

El ultrasonido ocular reportó OD con diámetro anteroposterior de 10-12mm, no es posible reconocer estructuras oculares OI con diámetro anteroposterior de 18mm,

aumento de la ecogenicidad en vítreo y cristalino. Retina aparentemente aplicada.  
(Fig. 8)

La valoración de la madre portadora IV-21 por el servicio de oftalmología reportó ambliopía de ojo derecho, visión cuenta dedos (CDISmt) que no mejora, ojo izquierdo 20/20 con corrección y endotropía monoocular de ojo derecho

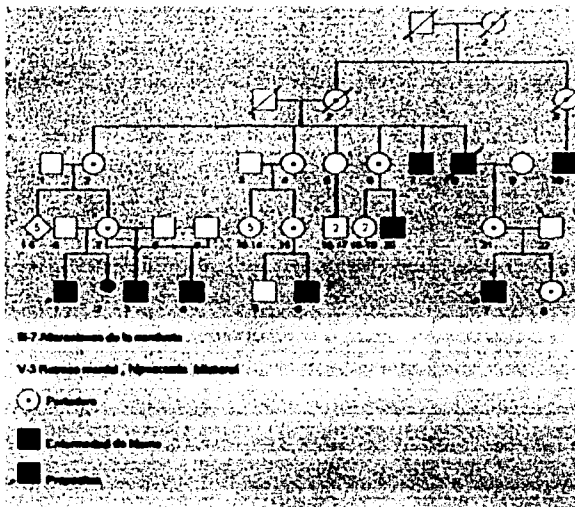
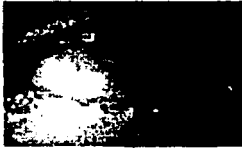


Fig. 6 Árbol genealógico de la familia 2

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

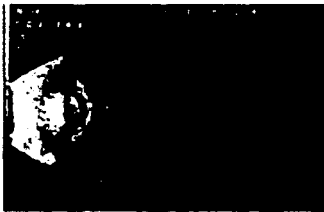


Ojo izquierdo

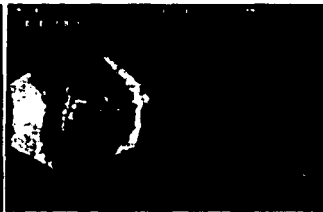


Ojo derecho

Fig. 7 Paciente V 7 (ver descripción en el texto)



Ojo Derecho



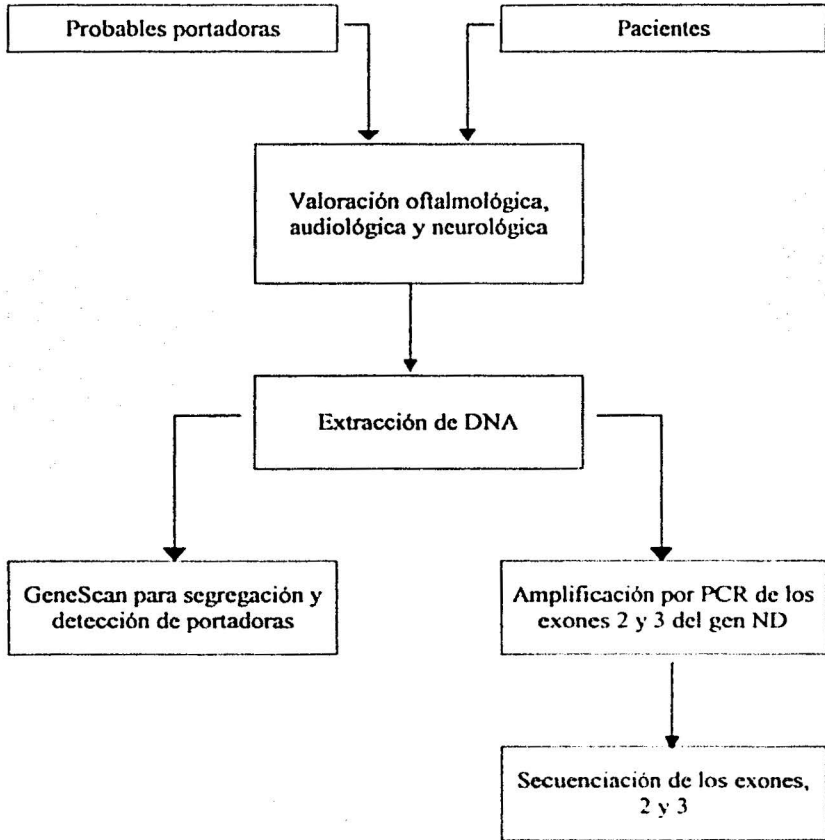
Ojo Izquierdo

Fig. 8 Ultrasonido ocular del paciente V 7

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**METODOS:**

**PROCEDIMIENTO GENERAL**



## **Extracción de DNA de sangre periférica <sup>64</sup>**

Extraer asépticamente 5 ml de sangre periférica.

Colocar la sangre en un tubo de ensaye con EDTA .

### **Identificación de la muestra**

- Nombre completo, Institución de procedencia, Médico que solicita el estudio, Datos clínicos

### **Procedimiento:**

Siguiendo la técnica de Cuevas Covarrubias modificada de Buffone y Darlington (1985)<sup>57</sup> y de Kempter y Grossbadern (1992)<sup>58</sup>

- 1.- Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris-Tritón-Sacarosa), el Tris con pH 7.6. Invertir el tubo varias veces.
- 2.- Centrifugar a 3000 rpm/ 6 minutos; decantar con cuidado
- 3.- Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS Agitar resuspendiendo el botón y pasar a un microtubo de 1.5 ml Agitar hasta homogeneizar.
- 4.- Centrifugar a 10,000 rpm / 2 minutos en microcentrifuga Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS, resuspender
- 5.- Centrifugar a 10,000 rpm / 2 minutos en microcentrifuga (repetir de dos a tres veces el paso anterior)
- 6.- Al botón limpio agregar 570 µl de NaCl 5mM Agitar 2 minutos y colocar 30 µl de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10 % Agitar 5 minutos  
Observar si hay consistencia viscosa y agregar 200 µl de NaCl saturado.  
Agitar 10 minutos
- 7.- Centrifugar a 11500 rpm / 30 minutos a 4 °C  
Decantar el sobrenadante a un tubo de 13 x 100 mm estéril
- 8.- Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20 °C para precipitar el DNA.
- 9.- Tomar el DNA con una varilla de vidrio, enjuagar el DNA con etanol al 70 %, dejar evaporar el etanol en condiciones estériles y posteriormente resuspender

el DNA en un microtubo con 250  $\mu$ l de agua estéril, colocar en baño maría a 60° C durante 2 hrs.

## ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO, PARA CUANTIFICACIÓN DE DNA <sup>64</sup>

En cuanto al análisis espectrofotométrico, éste consiste en determinar la absorbancia de una dilución 1:500 de la muestra a dos longitudes de onda (260 nm y 280nm). A partir de la lectura a 260 nm. (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calcula la concentración de la muestra

$$\text{concentración de DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

$$1 \text{ D.O. }_{260} = 50 \mu\text{g de DNA/ml} = 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

La cantidad total de DNA (en  $\mu\text{g}$ ) se calcula

$$\mu\text{g totales de DNA} = \text{conc. } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volumen total } (\mu\text{l})$$

Además la relación 260/280 permite conocer si la muestra está contaminada con proteínas, considerando que la lectura a 280 nm, corresponde a la fracción proteica. Una relación menor a 1.5 indica la presencia de proteína.

## CONDICIONES GENERALES DE LA REACCIÓN DE PCR <sup>64, 67</sup>

Volumen total de la reacción 25  $\mu\text{l}$  contenidos en un microtubo de 200  $\mu\text{l}$ .

	DNA (250 ng)	Agua	Amortiguador 10X (Cl <sub>2</sub> Mg <sup>+</sup> )	dNTPs (1mM)	Oligo F (100 $\mu\text{M}$ )	Oligo R (100 $\mu\text{M}$ )	Taq
Pac.	1 $\mu\text{l}$	18.05 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	0.15 $\mu\text{l}$	0.15 $\mu\text{l}$	0.15 $\mu\text{l}$
C +	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C -	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Bco.	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	M Mix	72.2 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	0.6 $\mu\text{l}$	0.6 $\mu\text{l}$	0.6 $\mu\text{l}$

**Nota :** Pac = Paciente, C+ = Control normal, C - = Control con delección, Bco = No contiene DNA. En cada tubo colocar 24  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción más 1  $\mu\text{l}$  de DNA. Se utilizó un estuche comercial para PCR de Applied Biosystems



**OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA ANÁLISIS DEL GEN ND <sup>47</sup>**

LOCUS		Temperatura de alineación (°C)	(pb)
Exón 2 *	F ACA TCA CTT AAG TTT GGG CTA TGA T	64	632
	R ACA GCC TTT GCT AAT GAC GCT CT		
Exón 3 **	F1 ATT ACT AGA ATA TGC AGA GTC CCG GG	64	557
	R 1 TCT CCA AGG ATT TTA ATT CAA TCG ATC		
	F2 AAC ACT GAC AGC CTG ACA CGC	64	766
	R 1 TCT CCA AGG ATT TTA ATT CAA TCG ATC		
F3 CAG AGT CAG TGC AGG ATC CGT ATT	64	643	
R2 CCC GGG ACT CTG CAT ATT CTA GTA AT			

Con las siguientes condiciones:

5 min a 94°C; 30 ciclos : 1 min. 30 seg de desnaturalización a 94°C ; 1 minuto de temperatura de alineamiento 64 ; 2 minutos de extensión a 72°C

7 minutos de extensión final, guardar a 4°C ∞.<sup>59</sup>

**TÉCNICA DE ELECTROFORESIS <sup>64</sup>**

La electroforesis del DNA es la migración de éste, en base a su carga y peso al aplicarse un campo eléctrico. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite visualizar la calidad de la muestra, así como la presencia o ausencia de RNA contaminante y para el análisis de productos de PCR por visualización de la banda deseada

**Procedimiento:**

Volumen 50 ml

Para Calidad de DNA –gel al 0.8 % con 0.4 g de agarosa,

Para productos de PCR – gel al 1.5 % con 0.75 g de agarosa,

- 1.- En un matraz Erlenmeyer se disuelve la agarosa en 50 ml de TAE 1 X (Tris, Ácido acético glacial y EDTA), calentando la mezcla en un horno de

microondas (restituir el agua que se pierde por evaporación), dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50 °C, colocar 1 gota de bromuro de etidio (0.625 mg/ml) y vaciar en el porta gel.

- 2.- Dejar solidificar en el portagel colocando el peine
- 3.- Preparar TAE 1X para llenar la cámara
- 4.- Retirar el peine cuidadosamente para evitar romper los pozos.
- 5.- Colocar el portagel en la cámara de electroforesis y añadir TAE 1X hasta cubrir el gel aproximadamente un milímetro por encima
- 6.- Mezclar 10 µl de producto de PCR con 3 µl de amortiguador de carga.
- 7.- Colocar la muestra en el pozo y utilizar una escalera de 100 pb como referencia
- 8.- Conectar los electrodos a la cámara y encender la fuente de poder a 70 volts.
- 9.- Dejar correr la muestra durante 1hr (aproximadamente 2/3 del largo del gel de agarosa).
- 10.- Observar en el transiluminador de luz ultra violeta

#### **PURIFICACIÓN DE TEMPLADOS PARA SECUENCIAR (POR ELUSIÓN) KIT QIAEX II (QUÍMICA VALANER CAT. No. 20051) <sup>66</sup>**

Los fragmentos de PCR deben ser purificados antes de la reacción de secuenciación para remover dNTPs, oligonucleótidos, enzima, DNA, etc

#### **Procedimiento:**

- 1.- Cortar la banda del gel y pesarla
- 2.- Colocar amortiguador QX1(3 veces en vol. de acuerdo al peso) y QIAEX II 5 µl (resina), mezclar con vortex
- 3.- Incubar por 6 minutos a 50 °C (mezclando la muestra por vortex cada 3 min.).
- 4.- Centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm, decantar
- 5.- Colocar 500 µl de amortiguador QX1 mezclar por vortex

- 6.- Centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm, decantar y eliminar los residuos de este buffer.
- 7.- Agregar 500  $\mu$ l de amortiguador PE , mezclar por vortex, centrifugar a 10,000 rpm/1 min (este paso se realiza 2 veces), decantar y eliminar los residuos del amortiguador PE
- 8.- Secar la muestra por efecto de temperatura a 50 °C
- 9.- Colocar 20  $\mu$ l de agua inyectable y mezclar
- 10.- Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm y pasar el agua a un microtubo limpio.  
Cuantificar la cantidad del producto de PCR purificado, midiendo la absorbancia a 260 nm o por algún otro método.

## REACCION DE SECUENCIACION (Applied Biosystems) <sup>66</sup>

1.- Por cada reacción, mezcle los siguientes reactivos en un microtubo de 200 µl previamente etiquetado:

Reactivo	Cantidad
Mezcla de reacción "BigDye Terminator"	2.0 µL
Templado 100 ng/ µL	1 µL
Oligonucleótido (10 µM)	1 µl
Agua destilada	16 µL
Volumen final de la reacción.	20 µL

Mezcla de reacción BigDye Terminator (Parte No. 4303152) :

- ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP marcados por fluorescencia
- Los cuatro desoxiribonucleotidos trifosfatados (dNTPs)
- Tris-HCl (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub>
- AmpliTaq DNA polimerasa

### Ciclos de temperatura

25 ciclos: 96°C 5 minuto; 96°C 35 segundos; 50°C 25 segundos; 50°C 4 minutos; enfriar a 4 °C

### Purificación de los productos de extensión

Eliminar los ddNTPs marcados por fluorescencia presentes en exceso, para permitir una secuenciación limpia y evitar errores en la interpretación de resultados

**Método por columnas Centri Sep** ( Parte No 401262 Applied Biosystems)

Secar la muestra en un concentrador de vacío (no aplicar calor y no secar en exceso)

## **MONTAJE DE LA MUESTRA**

Añadir 16  $\mu$ l de Amortiguador de carga TSR (Template supression reagent), Applied Biosystems.

Transferir a un tubo de secuenciación y colocar una septa, desnaturalizar a 95 °C durante 3 minutos, colocarlas inmediatamente en hielo.

Colocar las muestras en el secuenciador Automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo

## REACCION DE GENESCAN (Applied Biosystems).

### 1.- Premix para PCR (9 reacciones)

Reactivo	Cantidad
10X Buffer II	4.5 µL
dNTP's (2.5 mM)	4.5 µL
Amplitaq Gold (5u / µl)	0.36 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4.5 µl
Agua Inyectable	31.14 µL
Volumen final de la reacción	45.0 µL

### 2.- Mezcla de reacción de la PCR

Reactivo	Cantidad
Primer (5 µM)	0.5 µL
DNA (50 ng/ µl)	0.6 µL
Premix para PCR	4.5 µl
Agua inyectable	1.9 µL
Volumen final de la reacción	7.5 µL

### Condiciones de la reacción de PCR

	10 ciclos			20 ciclos				
	94°C	55°C	72°C	89°C	55°C	72°C	72 °C	
95 °C								4 °C
12:00	0:15	0:15	0:30	0:15	0:15	0:30	10:00	∞

### 3. Preparación de Marcador / Formamida (Vol 50 µl) = 4 reacciones

2 µl de escalera GS400 + 48 µl de Formamida desionizada

### 4. Pooled de PCR para cada paciente

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
NED (amarillo)	5.0 $\mu$ l
HEX (verde)	5.0 $\mu$ l
FAM (azul)	2.5 $\mu$ l
Agua inyectable	37.5 $\mu$ L
Volumen final de la reacción:	50.0 $\mu$ L

5. Del Pooled de PCR Mezclar 1  $\mu$ l + 12  $\mu$ l de marcador / Formamida

6. Desnaturalizar a 95 °C / 5 min.

## RESULTADOS

### Familia 1

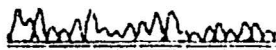
Se identificó una mutación de sentido equivocado en el exón 3 en el codón 97 que corresponde a una transición C>G. Esta mutación produce la sustitución del aminoácido arginina por prolina. La madre y la hermana de los propósitos fueron heterocigotas para esta mutación, confirmándose así en ambas el estado de portadoras (Fig 9).

### Familia 2

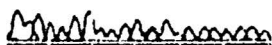
Se identificó una delección parcial de la región 3' no traducida del gen ND. El análisis por PCR mostró amplificación del exón 2 y del primer fragmento del exón 3 que incluye la región codificante (Fig 10). No se amplificó la región distal 3' no traducida del gen ND. El análisis con GeneScan de 5 marcadores del X indicó que la hermana era portadora del mismo defecto molecular. El estudio fue informativo para los alelos DXS1226 y DXS986 (Fig 11 y 12).



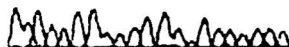
Control Normal  
 AAGTCTGGGGCCGGCAGCAGT  
 210 276



Portadoras I 2, II 1  
 AAGTCTGGGGCSGGCAGCAGT  
 210 276



Paciente II 2  
 AAGTCTGGGGCGGGCAGCAGT  
 210 220 2



Paciente II 3  
 AAGTCTGGGGCGGGCAGCAGT  
 220 276

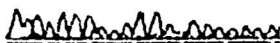


Fig. 9 Análisis de la secuencia de DNA de la familia 1 mostrando la mutación C>G. El análisis de las portadoras muestra las dos bases C+G.

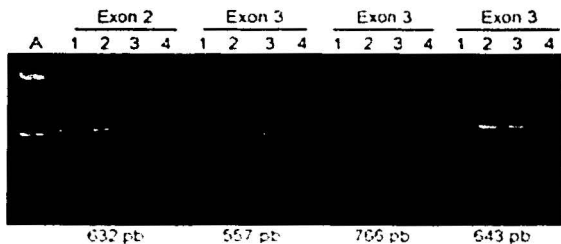


Fig. 10 PCR de los exones 2 y 3 del gen NF1 en la familia 2. A: Marcador molecular (escala 100pb); carril 1: paciente V-7; carril 2: portadora IV-21; carril 3: control positivo; carril 4: control negativo. Se observa la falta de amplificación de los últimos 2 segmentos del exón 3 del gen NF1 en el carril 4 que corresponde al paciente V-7 (766 y 643pb).

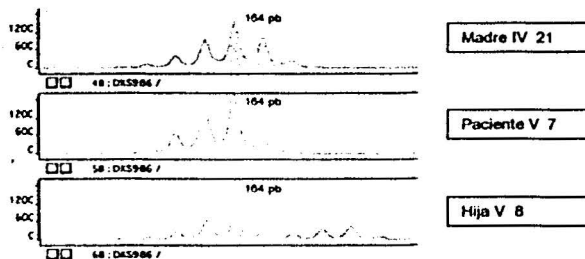


Fig. 11 Gene scan del alelo DXS986 en la familia 2. El alelo de 164 pares de bases de longitud está presente en el paciente V 7, en la madre IV 21 y en la hija V 8.

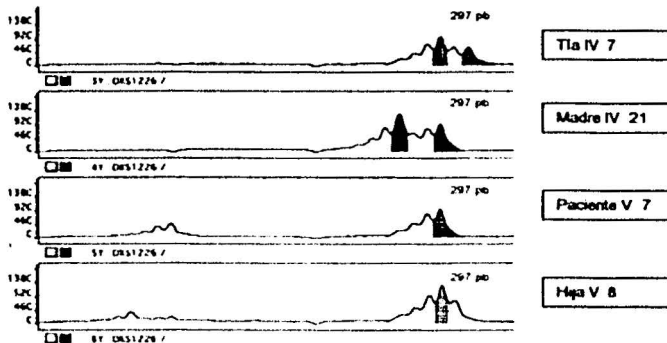


Fig. 12 Gene scan del alelo DXS1226 en la familia 2. El alelo de 297 pares de bases de longitud está presente en la tía IV 7, en la madre IV 21, en el paciente V 7 y en la hija V 8.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSION

La ND es una entidad compleja con ceguera congénita bilateral, un tercio de los pacientes presentan sordera neurosensorial y retraso mental. La mayoría de los pacientes con ND tiene mutaciones puntuales (>60%) y cerca de 20% presenta delecciones del gen ND, un mínimo porcentaje tiene otro tipo de alteraciones como translocaciones o inversiones<sup>3,4,39,60,62</sup>. Algunos sujetos muestran además hipogonadismo y microcefalia posiblemente debido a la pérdida de genes contiguos. También se han reportado mutaciones en el gen ND en la EVRX, EVR esporádica, en ROP y en la enfermedad de Coats. Aún cuando estas entidades se han considerado como variantes alélicas, la presencia de la misma mutación (v gr. Arg121Trp) produciendo distintos espectros fenotípicos, nos indica más bien que pueden tratarse de variantes clínicas de la misma enfermedad<sup>4,46,47</sup>. Esta variabilidad clínica implica la participación de factores epigenéticos o productos génicos adicionales interactuando en la patogénesis de ND. Son necesarios estudios más precisos para esclarecer la función que pueden jugar estos mecanismos en ND.

El fenotipo clásico de la ND se ha asociado con mayor frecuencia a defectos moleculares encontrados en los 100 primeros codones de la proteína norrina<sup>3,4</sup>, tal es el caso de nuestra familia 1 en la cual se presentó una mutación de sentido equivocado, en el codón 97 (Arg97Pro), no reportada previamente. Esta mutación produce la sustitución del aminoácido arginina por el aminoácido prolina en una región muy conservada evolutivamente que es una zona rica en cisteínas conformando un nudo que permite la formación de oligómeros con otros dímeros de proteínas norrininas<sup>40,52</sup>. Por otro lado, la arginina es un aminoácido básico polar que

tiene una conformación diferente al aminoácido prolina el cual es no polar y cíclico. Este hecho modifica potencialmente y de manera importante las estructuras secundaria y terciaria de la proteína alterando su función. En esta familia, la mutación produjo un fenotipo similar en todos los afectados.

La familia 2 presentó una delección parcial de la región 3' no traducida del gen ND que incluye la región consenso para la formación de la cola de poli A necesaria para la estabilidad del RNA mensajero. Nosotros sugerimos que la falta de la cola de poli A condiciona la degradación del RNAm en el citoplasma, sin embargo son necesarios más estudios para descartar o confirmar esta posibilidad. En esta familia el análisis con Genescan resultó una herramienta útil para el diagnóstico de portadora en la hija V-8. Esta es la primera delección parcial en ND en una región no traducida. Esta familia presentó variabilidad fenotípica importante ya que existe el antecedente de dos miembros afectados con ND, uno con retraso mental e hipoacusia y otro con alteraciones psiquiátricas. La madre portadora presentaba un ojo ambliope, aunque no tenía alteraciones anatómicas, lo que puede considerarse parte del espectro de ND en portadoras o bien simplemente una manifestación asociada. Es importante mencionar que el paciente V 7 presentaba un cuadro más severo en el ojo derecho, enfatizando la variabilidad clínica del padecimiento. A pesar de que en ND la heterogeneidad alélica puede ocurrir, es claro que la variabilidad clínica es compleja e involucra muchos otros mecanismos además de mutaciones en el gen ND. La caracterización bioquímica de la proteína norrina es necesaria para comprender la patogénesis de la enfermedad.

La función asignada a la proteína norrina implica la interacción célula-célula para la vasculogénesis o soporte de la matriz extracelular<sup>42,52,53</sup> Existen reportes asociando la insuficiencia venosa periférica como parte de este padecimiento.<sup>31</sup> Sin embargo consideramos que el hecho de que la expresión del gen ND es tejido específica descarta esta posibilidad. Además, estudios en ratones transgénicos no reportan alteraciones a otro nivel que no sean retina, cóclea y sistema nervioso central. La vasculogénesis estaría asociado al soporte de la matriz y dirección del tejido vascular en formación<sup>40,52</sup> Este soporte se conforma mediante la creación de oligómeros entre dímeros de norrina que formarían una malla en los tejidos adyacentes. Cualquier alteración que bloquee la formación de dímeros y subsecuentemente de oligómeros resultaría perjudicial para la generación de este soporte. Esta observación fortalece la hipótesis de la participación de factores epigenéticos u otros productos proteicos génicos interactuando en la patogénesis de ND

## ANEXO

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo \_\_\_\_\_ otorgo mi consentimiento para que a mi hijo y a mí nos sean practicados los estudios genéticos considerados en el proyecto de investigación "Estudio clínico y molecular en 2 familia con enfermedad de Norrie". Se me ha explicado que la enfermedad, llamada enfermedad de Norrie, es causada por una alteración genética que ocasiona un desarrollo anormal de los ojos, oídos y sistema nervioso central y que por medio de estudios de nuestro material genético se pueden conocer las alteraciones que dieron origen al padecimiento. Además, estos estudios pueden reconocer personas en mi familia con riesgo de heredar la enfermedad a sus hijos. Se me ha explicado con detenimiento que nuestra participación consiste en que nos sean extraídos con jeringa 3ml de sangre venosa, procedimiento que no ocasionará molestias mayores, solo pudiera presentarse la formación de un pequeño moretón en el área puncionada. Además se nos ha asegurado que la información obtenida en este estudio y relacionada con nuestro patrimonio genético no será divulgada ni usada para otros fines que no sean los establecidos en el proyecto de investigación mencionado y si por alguna razón decidieramos retirarnos del estudio, esto no cambiaría la calidad de nuestra atención.

#### ATENTAMENTE

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Médico responsable \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Testigo 1 \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Testigo 2 \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

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

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warburg M: Norrie's disease: A new hereditary bilateral pseudotumor of the retina. *Acta Ophthalmol* 39:752-772, 1961
2. Warburg M. Norrie's disease: A congenital progressive oculo-acustico-cerebral degeneration. *Acta Ophthalmol* 89(suppl.):1-147, 1966
3. Berger W. Molecular dissection of Norrie disease. *Acta Anatomica* 162(2-3):95-100, 1998
4. Berger W, Ropers H-H Norrie disease. *The Metabolic and Molecular bases of inherited disease*. 4(239):5977-5985, 2001.
5. Rehm HL, Zhang D-S, Brown MC, Bruges B, Halpin C, Berger W, Morton C, Corey DP, Chen Z-Y Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neuroscience* 22(11):4286-4292, 2002.
6. Apple DJ, Fishman GA, Goldberg MF: Ocular histopathology of Norrie's disease. *Am J Ophthalmol* 78:196-203, 1974
7. Warburg M. Norrie's disease. *J ment Defic Res* 12:247-251, 1968
8. Enyedi LB, de Juan E, Gaitan A: Ultrastructural study of Norrie's disease. *Am J Ophthalmol* 111: 439-445, 1991
9. Chynn EW, Walton DS, Hahn LB, Maun B, Thaddeus P. Norrie Disease: Diagnosis of a simplex case by DNA analysis. *Arch Ophthalmol* 114(9): 1136-1138, 1996.
10. Johnson K, Mintz-Histtner HA, Conley YP, Ferrel RE: X-linked exudative vitreoretinopathy caused by an arginine to leucine substitution (R121L) in the Norrie disease protein. *Clin Genet* 50: 113-115, 1996
11. Della, Fraco N. Molecular Biology in ophthalmology: A review of principles and recent advances. *Arch Ophthalmol* 114(4): 457-463, 1996.

12. Pérez-Pérez JF. Retinopatía del prematuro. *Rev Mex Oftalmol.* Enero-Febrero 73(1):33-40. 1998.
13. Wheatley CM, Dickinson JL, Mackey DA, Craig JE, Sale MM. Retiopathy of prematurity; recent advances in our understanding. *Br J Ophthalmol.* 86:696-700, 2002.
14. Talks SJ, Ebenezer N, Hykin P, Adams G, Yang F, Schulenberg E, Gregory-Evans K, Gregory-Evans CY. De novo mutations in the 5' regulatory region of the Norme disease gene in retinopathy of prematurity. *J Med Genet* 38(12): 46-52, 2001.
15. Haider MZ, Devarajan L, Al-Essa M, Srivastva B, Kumar H, Azad R, Rashwan N. Retinopathy of prematurity: Mutations in the Norme disease gene and the risk of progresión to advanced stages. *Pediatr Inter* 43(2) 120-123, 2001
16. Black GCM, Perveen R, Bonshek R, Cahill M, Clayton-Smith J, Lloyd C, McLeod D. Coat's disease of the retina (unilateral retinal telangiectasis) caused by somatic mutation in the NDP gene a role for normn in retinal angiogenesis. *Hum Mol Genet* 8 (11):2031-2035, 1999
17. Nance WE, Hara S, Hansen A, Elliot J, Lewis M, Chown B. Genetic linkage studies in a Negro Kindred with Norme's disease. *Am J Hum Genet* 21:423-429, 1969.
18. Moreira-Filho CA, Neustein I. A presumptive new variante of Norme's disease. *J Med Genet* 16 125-128, 1979
19. Ohba N, Yamashita T. Pnmary vitreoretinal dysplasia resembling Norme disease in a female: Asociation with X/autosome chromosomal translocation. *Br J Ophthalmol* 70:64-71, 1986
20. Hafez M, El-Tahhan H, Abdala A, Ibnhim Z, Tawfik A, El-Desoky MA. presumptive new presentation of Norme's disease. *Egypt J Genet Cytol* 11 213-225, 1982.



21. Gal A, Wieringa B, Emeets DFCM, Bleeker L, Ropers HH: Submicroscopic interstitial deletion of the X chromosome explains genetic syndrome dominated by Norrie disease. *Cytogenet Cell Genet* 42:219-224, 1986
22. Torrente I, Mangino M, Gennarelli M, Novelli G, Giannotti A, Vadalà P, Dallapiccola B. Two new missense mutations (A105T and C110G) in the norrin gene in two families with Norrie disease and familial Exudative Vitreoretinopathy. *Am J Med Genet* 72:242-244,1997.
23. Donnai D, Maunford RC, Read AP: Norrie disease resulting from a gene deletion: Clinical features and DNA studies. *J Med Genet* 25:73-78, 1989
24. Zhu D, Antonarakis SE, Schmeckpeper BJ, Diergaarde PJ, Greb AE, Maumenee IH: Microdeletion in the X chromosome and prenatal diagnosis in a family with Norrie disease. *Am J Med Genet* 33:485-488, 1989
25. Chapelle A, Sankila EM, Lindlof M, Aula P, Nonio R: Norrie disease caused by a gene deletion allowing carrier detection and prenatal diagnosis. *Clin Genet* 28:317-320 1985
26. Warburg M: Norrie's disease (atrofia bulborum hereditaria). *Acta Ophthalmol* 41:134-146,1993.
27. Rehm HL, Gutierrez GA, Garcia R, Jiménez G, Khetarpal U, Priest JM, Sims KB, Keats B, Morton CC: Norrie disease gene mutations in a large Costa Rica Kindred with a novel phenotype including venous insufficiency. *Hum Mutat.* 9:402-408, 1997.
28. Woodruff G, Newbury R, Plaha DS, Young ID: Manifesting heterozygosity in Norrie's disease?. *Br J Ophthalmol* 77:813-814, 1993
29. Sims K, Irvine A, Good W: Norrie disease in a family with a manifesting female carrier. *Arch Ophthalmol* 115(4):517-519,1997
30. Brown CJ, Robinson WP: The causes and consequences of random and no random X chromosome inactivation in humans. *Clin Genet* 58:353-363,2000

31. Scriver, Beaudet, Valle, Sly . Retinoblastoma. The Metabolic and Molecular bases of inherited disease. 8a Vol. 1 (36):819-848, 2001.
32. Pendregast S, Trese MT, Liu X, Shastry B Study of the Nornie disease gene in 2 patient with bilateral persistent hyperplastic primary vitreous. Arch Ophthalmol 116(3):381-382, 1998
33. Saracceanul FO, The Reese syndrome anatomicoclinical and therapeutic considerations. Oftalmologia. Jun-Mar, 34(1) 71-2, 1990.
34. The retinoschisis Consortium Functional implications of the spectrum of mutations found in 2234 cases with X-linked juvenile retinoschisis (XLRs). Hum Mol Genet 7:1185-1192, 1998
35. Koch H, Craig I, Dahlitz M, Denney R, Parkes D. Analysis of the monoamine oxidase genes and the Nornie disease gene locus in narcolepsy. The Lancet 353:645-646, 1999
36. Chen Z-Y, Denney RM, Breakefield XO. Nornie disease and MAO genes: nearest neighbors Hum Mol Genet 4 1729-1737, 1995
37. Berger W, Meindl A, van de Pol TJR, Cremers FPM, Ropers HH, Dörner C, Monaco A, et al: Isolation of a candidate gene for Nornie's disease. By positional cloning. Nature genet 1:99-203, 1992.
38. Sims KB, Lebo RV, Benson G, Shalish C, Schuback D, Chen Z-Y, Bruns G, et al: The Nornie disease gene maps to a 150kb region on chromosome Xp11.3 Hum Mol Genet 1:204-208, 1992
39. Berger W, van de Pol D, Warburg M, Gal A, Bleeker-Wagemakers L, de Silva H, Meindl A, et al Mutations in the candidate gene for Nornie disease. Hum Mol Genet 1:481-485, 1992

40. Meitinger T, Meindl A, Bork P, Rost B, Sander C, Haasemann N, Murken J: Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nature Genet* 5 376-380,1993
41. Seller MJ, Oal K, Horsley S, Davies A, Berry A Meredith R, Mc Cartney A. A fetus with an X;1 balanced reciprocal translocation and eye disease. *J Med Genet* 32(7):557-560,1995.
42. Chen Z-Y, Hendrinks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB, Craig IW: Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nature Genet* 1:204-208,1992.
43. Chen Z-Y, Battinelli EM, Hendrinks RW, Powell JF, Middleton-Price H, Sims KB, Breakefield XO, et al. Norrie disease Gene characterization of deletions and possible function. *Genomics* 16 533-535,1993
44. Voorberg J, Fontijn R, Calafat J, Janssen H, van Mounk JA, Pannekoek H: Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulphide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids. *J Cell Biol* 113:195-205,1991
45. Meindl A, Lorenz B, Achatz H, Hellebrand H, Schmitzvalckenberg P, Meitinger T: Missense mutations in the NDP gene in patients with a less severe course of Norrie disease. *Hum Mol Genet* 4 489-490 1995
46. Kalamangalam GP, Ellis SJ: Migratory brain stem disturbance in Norrie disease: case report. *J Neurol, Neurosurg and Psych* 70(6) 815-816,2001
47. Shastri BS, Pendergast SD, Hartzler MK, Liu X, Trese M: Identification of missense mutations in the Norrie disease gene associated with Retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 115(5) 651-655,1997

48. Bolos C, Garrido M, Real FX MUC6 Apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* 109 723-734. 1995
49. Meindl A, Berger W, Meintinger T, van de Pol D, Achatz H, Dörner C, Hassemann M, et al Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins *Nature Genet* 2 139-143, 1992.
50. Shimizu Y, Shaw S Mucins in the mainstream *Nature* 366 630-631, 1993
51. Kim YS, Gum JR Diversity of mucin genes: structure, function, and expression. *Gastroenterology* 109 999-1013. 1995
52. Vilt UA, Hsu SY, Hsueh AJW Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules *Mol Endocrinology* 15(5) 681-694, 2001
53. Perez-Vilar J, Hill RL Norrie disease protein (Norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix. *J Biol Chem* 272(52) 33410-33415, 1997.
54. Berger W, van de Pol D, Bachner D, Oerlemans F, Winkens H, Hameister H, Wiernga B, et al An animal model for Norrie disease (ND) Gene targeting of the mouse ND gene *Hum Mol Genet* 5(1) 51-59 1996
55. Hartzler MK, Cheng M, Liu X, Shastri BS Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization *Brain Research Bulletin* 49 355-358, 1999
56. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989 *Molecular cloning 2a ed* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory press
57. Buffone, G G and Darlington, G J Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 31 164-165 1985
58. Kemper, B and K Grossbadem Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing *TIG* 8 2, 1992

59. *Methods in Molecular Biology, Protocols for Nucleic Acid Analysis by No radioactive Probes*, Isacc Copyright Human Press Inc Totowa, NJ, 1994
60. Zhu D, Antonarakis SE, Schmeckpeper BJ, Diergaarde PJ, Greb A, Maumenee IH. Microdeletion in the X-Chromosome and Prenatal Diagnosis in a Family with Norrie Disease. *Am J Med Genet* 33:485-488, 1989
61. Collins FE, Murphy DI, Reiss AL, Sims KB, Lewis JG, Freud L, Karoum F, Zhu D, Maumenee IH, Antonarakis SE. Clinical, Biochemical, and Neuropsychiatric Evaluation of a Patient With a Contiguous Gene Syndrome due to a Microdeletion Xp11.3 Including The Norrie Disease Locus and Monoamine Oxidase (MAOA and MAOB) Genes. *Am J Med Genet* 42:127-134, 1992
62. Pettenati MJ, Rao PN, Weaver RG, Thomas IT, McMahan MR. Inversion (X)(p11.4q22) associated with Norrie disease in a four generation family. *Am J Med Genet* 45:577-580, 1993
63. Mintz-Hittner HA, Ferrel RE, Sims KB, Fernandez KM, Gemmell BS, Satriano R, Caster J, et al. Peripheral retinopathy in offspring of carriers of Norrie disease gene mutations. Possible transplacental effect on abnormal norrin. *Ophthalmology* 103:2128-2134, 1996