



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y  
de la Salud

Sede: Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana I.A.P.  
Campo Genética Médica

“Frecuencia de síndrome de Wolfram en un grupo de  
diabéticos tipo 1 y determinación de su espectro mutacional”

TESIS DOCTORAL QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DOCTOR EN  
CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

María Esther Blanco Aguirre

Tutor:

Dr. en C.M. Juan Carlos Zenteno Ruiz.

Instituto de Oftalmología “Fundación Conde Valenciana” IAP

Comité tutorial:

Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias. Hospital General de  
México, S.S.

Dr. Fiacro Jiménez Ponce. Hospital General de México, S.S.

Dr. Juan Garduño Espinosa. Hospital Infantil de México “Dr.  
Federico Gómez”, S.S.

México, D.F. Septiembre de 2015



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.

# Índice

RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
ANTECEDENTES.....	6
• <b>Diabetes Mellitus</b> .....	6
• <b>Clasificación de la Diabetes Mellitus</b> .....	6
• <b>Heterogeneidad clínica y genética de la Diabetes Mellitus</b> .....	7
• <b>Síndromes monogénicos asociados a Diabetes Mellitus</b> .....	8
SÍNDROME DE WOLFRAM .....	9
• <b>Diagnóstico diferencial</b> .....	12
• <b>Patrón de herencia</b> .....	13
• <b>Fisiopatogenia</b> .....	14
• <b>Expresión de <i>WFS1</i></b> .....	15
• <b>Genética molecular de <i>WFS1</i></b> .....	16
• <b>Espectro mutacional del gen <i>WFS1</i>:</b> .....	17
• <b>Clasificación genotípica</b> .....	18
• <b>Correlación genotipo-fenotipo:</b> .....	20
• <b>SW vs DMT1</b> .....	20
JUSTIFICACIÓN .....	23
OBJETIVOS .....	23
• <b>Objetivo general</b> .....	23
• <b>Objetivos particulares</b> .....	23
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	23
METODOLOGÍA .....	23
• <b>Diseño y tipo de estudio</b> .....	24
• <b>Universo de trabajo:</b> .....	24
• <b>Cálculo del tamaño de muestra</b> .....	24
• <b>Criterios de inclusión, exclusión y eliminación</b> .....	24
• Criterios de inclusión para diagnóstico clínico .....	24

• Criterios de inclusión para estudio molecular.....	24
• Criterios de exclusión para estudio molecular.....	24
<b>Desarrollo del proyecto (Figura 5): .....</b>	<b>25</b>
• <b>Fase I.....</b>	<b>25</b>
• <b>Fase II.....</b>	<b>25</b>
<b>Estudio genético molecular .....</b>	<b>27</b>
• <b>Aislamiento de DNA genómico: .....</b>	<b>28</b>
○ Extracción de DNA de células de mucosa oral: .....	28
○ Extracción de DNA de leucocitos de sangre periférica: .....	28
• <b>Amplificación por PCR: .....</b>	<b>28</b>
• <b>Secuenciación nucleotídica:.....</b>	<b>30</b>
<b>Consideraciones de Bioseguridad:.....</b>	<b>32</b>
<b>Consideraciones éticas .....</b>	<b>32</b>
a. Consentimiento .....	32
<b>Análisis de datos.....</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
• <b>Fase clínica.....</b>	<b>34</b>
• <b>Estudio fenotípico.....</b>	<b>36</b>
• <b>Descripción clínica de pacientes con diagnóstico clínico de SW y resultados del estudio genético.....</b>	<b>38</b>
• <b>Resumen del estudio genotípico.....</b>	<b>52</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
• <b>SW vs DMT1.....</b>	<b>53</b>
• <b>Hallazgos clínicos de nuestro estudio.....</b>	<b>54</b>
• <b>Hallazgos moleculares del Estudio .....</b>	<b>55</b>
b. <b>Segunda mutación .....</b>	<b>56</b>
f. <b>Mutación recurrente.....</b>	<b>58</b>
• <b>Limitaciones del estudio .....</b>	<b>59</b>
• <b>Propuesta de estudio más amplio y genotipificación.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>

REFERENCIAS .....	62
A N E X O S .....	75
• <b>Anexo I.</b> Instrumentos de Investigación .....	75
• <b>Anexo II.</b> Carta de consentimiento informado del protocolo .....	78

## RESUMEN

Antecedentes: El Síndrome de Wolfram (SW) es una rara entidad clínica autosómico recesiva de carácter pleiotrópico y progresivo caracterizada por Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) de inicio temprano, asociada a atrofia óptica y a otras manifestaciones clínicas de índole neurológico. En la literatura internacional se ha demostrado que el diagnóstico del SW puede retrasarse debido a un diagnóstico erróneo de DMT1 complicada.

Objetivo: Establecer la frecuencia de SW determinado clínicamente en un grupo de sujetos con DMT1 e identificar las mutaciones causales en el gen *WFS1*.

Método: Estudio observacional descriptivo, transversal y prolectivo. Se invitó a pacientes que acudían a "clínica de diabetes" a participar. Se realizó estudio clínico y/o de gabinete por datos sugestivos de SW. Se realizó estudio molecular del gen *WFS1* en los casos.

Resultados: Se reunió una población "diana" de 131 individuos no relacionados genéticamente. Se detectaron 6 pacientes con datos clínicos de SW (4.58%). Se identificaron mutaciones en el gen *WFS1*, en 4/5 pacientes (80%): dos de carácter homocigoto, un heterocigoto compuesto y un heterocigoto. Un sujeto no presentó mutaciones en *WFS1*.

Conclusiones: En nuestra muestra, se demostró que casi 5% de los casos diagnosticados como DMT1 eran realmente pacientes con SW y el 80% fueron debidos a mutaciones en *WFS1*.

El análisis clínico y genético de grandes cohortes de pacientes con DMT1, originarios de diferentes regiones del país, ayudaría a calcular la prevalencia de SW y contribuiría a un mejor manejo de dichos pacientes.

## **ABSTRACT**

Introduction: Wolfram syndrome (WS) is a rare severe autosomal recessive pleiotropic disease primarily characterized for its association of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and optic atrophy and other neurological features. Earlier reports have shown that a proportion of WS cases may remain unrecognized due to misdiagnosis as T1DM.

The objectives of this work were to estimate the prevalence of patients fulfilling clinical criteria for WS in a cohort of subjects diagnosed as T1DM and to identify causal *WFS1* gene mutations in them.

Methods: This was a cross sectional study design. Several groups of T1DM were included. Additional clinical anomalies suggesting WS were identified through clinical research. *WFS1* gene analysis was performed on genomic DNA from patients reaching WS clinical criteria,

Results: A sample of 131 unrelated T1DM patients was collected. Clinical criteria for WS diagnosis were reached in 6 probands, corresponding to a 4.58% frequency of the disease. *WFS1* mutations were identified in 4 out of 5 individuals fulfilling with WS clinical criteria, including two homozygous, one compound heterozygous, and one patient with a single allele mutation. No *WFS1* mutations were identified in the remaining subject.

Conclusions: In our cohort, approximately 5% of cases diagnosed as T1DM were in fact patients with WS. *WFS1* mutations were identified in 80% of the probands. Clinical and genetic analyses of large cohorts of T1DM patients from different regions of our country would help to better estimate the occurrence of WS and will lead to a better management of such patients.

## **ANTECEDENTES**

- **Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica de etiología múltiple caracterizada por hiperglicemia crónica asociada a alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas y que resulta de defectos en la secreción de insulina, de la acción de la insulina, o de ambos mecanismos. Los efectos incluyen disfunción y falla de varios órganos [ADA, 2010]. En su fase más severa los pacientes pueden desarrollar estupor, coma y en ausencia de tratamiento puede sobrevenir la muerte. Los efectos de la enfermedad a largo plazo incluyen desarrollo progresivo de complicaciones específicas como retinopatía con potencial ceguera, nefropatía que lleva a falla renal, neuropatía con riesgo de úlceras de pies o amputaciones y disfunción autonómica, incluyendo disfunción sexual. Los pacientes con DM tienen un riesgo incrementado de padecer enfermedades cardiovasculares, del sistema vascular periférico y cerebrovasculares [WHO/NCD/NCS/99.2].

- **Clasificación de la Diabetes Mellitus**

De manera general, la diabetes se clasifica en 4 tipos [ADA, 2011]:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1): Se origina por la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que generalmente lleva a deficiencia absoluta de insulina. La DMT1 constituye del 5 al 10% de todos los casos de diabetes y en menores de 15 años es responsable de 60% de los casos de diabetes [Springer SC et al, 2013]. En población menor a 19 años en Estados Unidos de Norteamérica, se estima una prevalencia de 1.82:1,000 [SEARCH, 2007], en Polonia de 1.38:1,000 [Fendler W et al, 2012] y en México de 1.5-6.7:1,000 [Atlas IDF, 2006]

2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2): Es resultado de una disminución progresiva de la secreción de insulina en un marco de resistencia a insulina. Constituye el 90-95% de los casos de DM en adultos [ADA, 2011] y se ha documentado que puede constituir hasta el 33% de los casos de DM en niños menores de 14 años [Pinhas-Hamiel O, et al, 1996]. Es la primera causa de morbilidad en México en adultos y la primera causa de muerte [INEGI, 2013].



3. Otros tipos específicos de diabetes: Originados por defectos genéticos que afectan la función de las células beta, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino (fibrosis quística) [Waugh N et al, 2012], endocrinopatías (acromegalia) [Soliman A et al, 2014], inducidas por drogas o fármacos (esteroides) [Hwang JL and Weiss RE, 2014], infecciones (rubéola), formas raras de diabetes autoinmune (síndrome de la persona rígida) [Kono S et al, 2001], otros síndromes genéticos tanto cromosomopatías (síndromes de Down, Klinefelter, Turner) [Bojesen A et al, 2002] como síndromes monogénicos (Wolfram, Alstrom) [Fendler W et al, 2012] y enfermedades mitocondriales (Ataxia de Friedrich) [Reddy PH, 2009]. Constituyen integralmente <5% de todos los casos de DM [ADA, 2010].

4. Diabetes mellitus gestacional (DMG): Es diagnosticada durante el embarazo y se caracteriza por intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante la gestación. Está caracterizada por función insuficiente de células pancreáticas a las necesidades corporales de insulina. Aparentemente resulta del mismo espectro de causas que han sido sustentadas en la hiperglucemia en general incluyendo enfermedad autoinmune, causas monogénicas o resistencia a la insulina, por ello representa una diabetes en evolución [Buchanan TA et al, 2007].

- **Heterogeneidad clínica y genética de la Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus presenta una amplia heterogeneidad clínica y genética. La DMT2, la cual tiene un tipo de herencia multifactorial, representa un problema de salud por su alta prevalencia [Villalpando S et al, 2010]. Una estrategia utilizada en el estudio de las enfermedades multifactoriales es la caracterización de enfermedades monogénicas clínicamente similares y de alta penetrancia, que pudieran relacionarse fisiopatológicamente, como en el caso de la diabetes [Kussman M et al, 2013].

- **Síndromes monogénicos asociados a Diabetes Mellitus**

La diabetes monogénica tiene una prevalencia estimada de entre 2 a 5% de todos los tipos de Diabetes y presenta amplia heterogeneidad clínica y genética [Schwitzgebel VM, 2014]. En general tiene una prevalencia muy baja, sin embargo, su importancia radica en que la identificación de su fisiopatogenia aporta conocimiento crítico para entender otras formas de diabetes y a que su diagnóstico correcto permite un manejo adecuado de los afectados. Muchos pacientes con diabetes monogénica comprobada por estudios de biología molecular, inicialmente fueron diagnosticados incorrectamente con complicaciones no esperadas que finalmente llevaron al diagnóstico preciso [Naderian G et al, 2010; Manaviat MR et al, 2009; Zmyslowska A et al 2014; Homa K et al, 2014.]. El reconocimiento correcto de la etiología de la diabetes permite la búsqueda intencionada de otras anomalías asociadas en casos síndromicos y la instauración del tratamiento más apropiado [Slingerland AS, 2006; Barrett TG, 2007].

Las enfermedades monogénicas que cursan con diabetes mellitus (grupo 3), se clasifican de acuerdo a la vía metabólica que afectan en: 1) aquellas que cursan con resistencia a insulina, (lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip, defectos de receptor de insulina y enfermedades asociadas a PPRG) [Van Maldergem L et al, 2002]; 2) las que se caracterizan por defectos en la secreción de la insulina (MODY tipo 2 y diabetes mellitus neonatal) [Johannson S et al, 2012]; 3) las que se deben a apoptosis de células pancreáticas (síndrome de Wolcott-Rallison, Ataxia de Friedrich y SW) [Porter JR and Barret TG, 2005; Julier C and Nicolino M, 2010; Reddy PH, 2009].

## SÍNDROME DE WOLFRAM

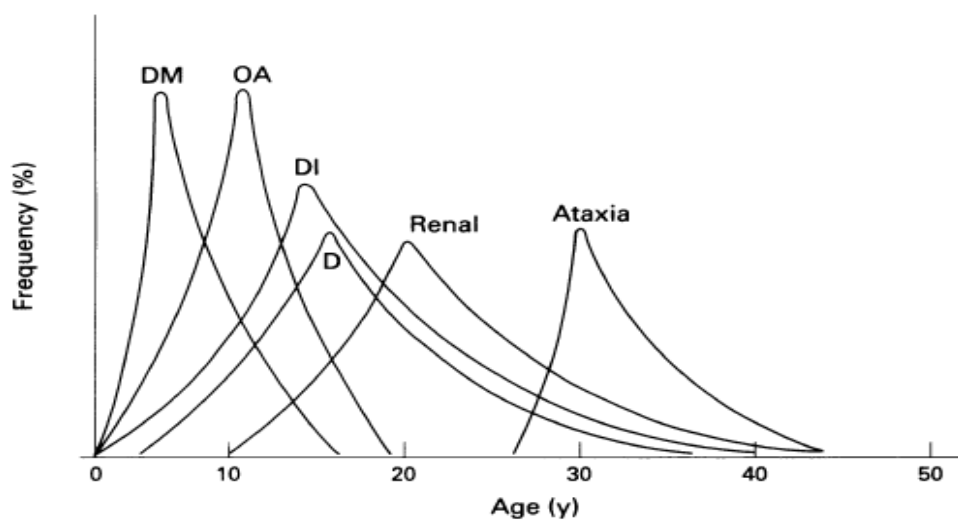
El síndrome de Wolfram (SW) es una enfermedad autosómica recesiva de expresión severa en niños y altamente incapacitante. Su prevalencia es variable en distintas poblaciones y se ha calculado en 1:770,000 en población caucásica de Inglaterra, por ejemplo, con una frecuencia de portadores de 1:354 [Barrett TG et al, 1995]. En población general de Norteamérica se ha estimado en 1:100,000 con una frecuencia de portadores de 1:100 [Fraser FC and Gunn T, 1977]. Sin embargo, en pacientes con DMT1 la frecuencia de SW se ha calculado en 1:175 en Canadá [Gunn T et al, 1976], de 1:31 en Polonia [Fendler W et al, 2012] y de 1:22 en Sicilia y en Líbano [Zalloua P et al, 2008; Lombardo F et al, 2014]. Esta enfermedad es conocida también como síndrome DIDMOAD, por el acrónimo de **d**iabete*s* **i**nsípida, **d**iabete*s* mellitus, **a**trofia **ó**ptica y **s**ordera [Pillely SFJ and Thompson H S, 1976].

El síndrome fue descrito por primera vez por Wolfram y Wagener en 1938, en una familia con 4 hermanos afectados con diabetes mellitus y atrofia óptica [Wolfram DJ and Wagener HP, 1938]. Barret et al definieron los criterios clínicos en 1995 y establecieron como criterios mayores la atrofia óptica y Diabetes Mellitus tipo 1 y como criterios menores la diabetes insípida, la sordera neurosensorial, los trastornos vesicales, el hipogonadismo, los trastornos psiquiátricos y la disfunción de tallo cerebral. De manera tradicional se recomendó considerar diagnóstico clínico del SW cuando se presentaran al menos dos criterios mayores o uno mayor y dos menores [Barrett T et al, 1995]. Aunque en múltiples reportes de casos se consideran únicamente los dos criterios mayores, recientemente se observó que si bien el 96% de casos presentan atrofia óptica a cualquier edad, no es una característica constante a temprana edad; por lo tanto, si se incluyeran dos o más características de DIDMOAD (sin ser indispensables los criterios mayores), se detectaría a 98.7% de los casos de la enfermedad [de Heredia ML et al, 2013].

La edad de inicio en promedio es a los 6 años, sin embargo ha habido reportes de inicio en el primer año de vida y casos excepcionales diagnosticados a los 61 años de edad [Lieber DS et al, 2012]. La esperanza de vida es hasta la 4ª década (23-49 años) en

60% de los casos [Kinsley BT et al, 1995; Casey J.A. and Smith BSC, 2004; Viswanathan V et al, 2008].

La variabilidad fenotípica del síndrome es considerable y la edad de aparición de los síntomas también es variable (Figura 1). La Diabetes mellitus tipo 1 se encuentra en 100% a una edad mediana de 6 años (3 meses a 16 años); la atrofia óptica en 100% a los 11 años de edad (6-19 años); la diabetes insípida en 75% de los pacientes, con mediana de 14 años (3 meses a 40 años); la sordera en 66% de los casos, con edad mediana de 17 años (5-39 años); las alteraciones renales en 66%, con edad mediana a los 20 años (10-44 años de edad) y las anomalías neurológicas con una mediana de 30 años (5-44 años) [Barrett TG and Bunday SE, 1997].



**Figura 1.** Frecuencia y edad de aparición de las características fenotípicas en un grupo de pacientes con SW. (Tomado de Barrett TM and Bunday SE, 1997).

Es importante destacar las alteraciones neurológicas, psiquiátricas, gonadales y oftalmológicas que pueden ocurrir en el SW. Las alteraciones neurológicas descritas incluyen ataxia truncal, mioclonías, reflejos osteo-tendinosos disminuidos, nistagmo horizontal, disartrias, apneas centrales, pérdida del gusto y olfato, y hemiparesias [Chausseot A et al, 2011]. Las principales alteraciones psiquiátricas descritas son

depresión, psicosis y síndrome orgánico cerebral. Otras características son ansiedad generalizada, enfermedad depresiva mayor, déficit de atención e hiperactividad, enfermedad obsesivo-compulsiva, enfermedad bipolar, espectro de autismo, déficit de identificación de olores, ronquidos, respiración ruda, enuresis e hiper-somnolencia [Bischoff AN et al, 2015].

La resonancia magnética cerebral en pacientes con SW ha demostrado atrofia cerebral generalizada particularmente en cerebelo, médula oblongada y puente [Hershey T et al, 2012]. El hipogonadismo es del tipo hipergonadotrópico y en las mujeres se han descrito alteraciones menstruales y fertilidad reducida en ambos géneros [Medlej R et al, 2004; Esteban BG et al, 2006]. Otros síntomas neurológicos son la dismotilidad gastrointestinal (autonómico) y síntomas respiratorios que pueden llevar a insuficiencia respiratoria central. Se ha considerado que las enfermedades psiquiátricas son comunes en el SW y los pacientes tienen una mayor tendencia al suicidio [Swift M and Swift RG, 2005; Aluclu MU et al, 2006].

Las alteraciones oftalmológicas observadas en SW se han descrito en las siguientes proporciones: atrofia óptica (93.3%); defectos de percepción del color (92.9%), catarata (66.6%), retinopatía pigmentaria (30%) y retinopatía diabética (30%) [All-Till M et al, 2002]. Otros estudios describen anomalías adicionales que incluyen agudeza visual subnormal (89%), defectos de campo visual (100%), índice copa-disco del nervio óptico anormalmente grande (33%), nistagmus (39%) y estrabismo (39%) [Hoekel J et al, 2014]. También se han descrito defectos infrecuentes como la microesferofaquia [Chacón-Camacho O et al, 2013].

El SW puede cursar con defectos del desarrollo, dentro de los cuales destacan la reducción del volumen intracraneal, anormalidades desmielinizantes en tallo cerebral y cerebelo, y restricción del crecimiento intrauterino [Kök S et al, 2009; Hershey T, et al. 2012; Zmyslowska A et al 2014 (PLoS)].

En la tabla 1 se presentan las principales características fenotípicas identificadas en pacientes con SW (Tabla 1).

Criterios	Barret (1995)	TG	Hardy C (1999)	Chaussonot A (2011)	Medlej R [2004]	Gasparin MR (2009)	de Heredia (2013)	ML
Número de casos estudiados	45		19	59	17	19	412	
Diabetes mellitus + atrofia óptica (Criterios mínimos)	100		100	95	100	100	98.21 (DMT1) 82.14 (AO)	
Complicaciones neurológicas	6		62	53	70.9	31.2	17.09	
Diabetes insípida	56		73	29	75	40.7	37.76	
Sordera	42		62	46	64.5	30.4	48.21	
Hipogonadismo			**	25	22.2	33.3	*	
Anomalías urológicas	36		58	53	73.7	92.6	19.39	
Síntomas psiquiátricos	25		**	59	22.6	**	*	
Anomalías gastro-intestinales	**		**	12	¿?	**	*	
Catarata bilateral	**		**	5	¿?	**	¿?	
Muerte	**		25-49	**	35 a	**	27 +- 11.4	
Cardiopatía congénita	**		**	**	16.1	**	*	
Retinopatía	**		**	**	**	18.5	**	

**Tabla 1.** Proporción (porcentaje) de datos fenotípicos de SW. \* Anexado a otra categoría. \*\*: No descrito

- **Diagnóstico diferencial**

Aunque el cuadro clínico del SW es muy característico, existen algunas enfermedades similares que deben ser diferenciadas.

- Algunos casos de síndrome Laurence-Moon-Biedl, cuyo cuadro clínico se caracteriza por obesidad, retraso mental, diabetes mellitus y retinitis pigmentosa,

han presentado adicionalmente diabetes insípida y atrofia óptica [Fraccaro et al, 1952; Akinci A et al, 2010].

- La Ataxia de Friedrich es una causa de diabetes tipo 1 monogénica. sin embargo, la predominancia de la ataxia y de anomalías cardiovasculares permiten diferenciarla clínicamente del SW [Waschbisch A et al, 2010].
- Anemia con respuesta a tiamina: Inicialmente se describió el DIDMOAD asociado a anemia con respuesta a tiamina y se consideró una variante del SW, sin embargo el tratamiento con tiamina disminuyó las complicaciones diabéticas del paciente y también se observó una familia de 4 pacientes con DIDMOAD sin anemia, por lo que se concluyó en que eran entidades separadas [Borgna-Pignatti C et al, 1989].
- La neuropatía óptica de Leber es similar en algunos aspectos al SW, pero en aquella se presentan pérdida de la visión central no dolorosa aguda o subaguda que lleva a escotoma central, además de que se acompaña de telangiectasias peripilares, microangiopatía, pseudoedema del disco óptico y tortuosidad vascular y trastornos del movimiento, además de que no cursa con diabetes mellitus [Newmann NJ, 1993; Vilan A et al, 2009].

- **Patrón de herencia**

La gran mayoría de los casos de SW son de transmisión hereditaria autosómica recesiva y se deben a mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *WFS1* [Chausenott A et al, 2011]; Se han descrito algunos casos con patrón aparentemente autosómico dominante (aunque clínicamente incompletos) [Valéro R, et al, 2008; Rendtorff ND et al, 2011] y cuadros clínicos semejantes a SW probablemente de tipo mitocondrial [Rotig A et al, 1993; Hofmann S et al, 1997].

Existe un segundo tipo de SW que se manifiesta con DMT1 y AO. En esta forma sin embargo, los pacientes no desarrollan diabetes insípida y muestran susceptibilidad a sangrados y ulceraciones gastrointestinales, lo que no es común en el SW clásico. El

gen responsable de este segundo tipo se denomina *CISD2*, está situado en 4q22-q24 y codifica una proteína llamada ERIS (Endoplasmic Reticulum Intramembrane Small protein) que, al igual que la *wolframina*, se localiza en el retículo endoplásmico (RE) [Amr S et al, 2007; Mozillo E et al, 2014].

- **Fisiopatogenia**

El SW es originado por mutaciones bialélicas en el gen *WFS1*, localizado en 4p16.1. Este gen está conformado por 8 exones y su RNAm codifica para una proteína transmembranal, denominada *wolframina*, constituida por 890 aminoácidos, con 9 dominios que pertenecen a una novedosa familia génica [Strom TM et al, 1998; Inoue H et al, 1998; Hofmann S et al, 2003].

Se ha reconocido que el mecanismo fisiopatogénico de la enfermedad incluye una pérdida del control de la progresión de síntesis de proteínas y de la regulación de la apoptosis en el RE, como respuesta al stress [Fonseca SG et al, 2005; Xu R et al, 2009]. Se han establecido 3 mecanismos implicados en esta respuesta: control traduccional (mediado por el gen *PERK*), degradación de una proteína anormalmente plegada (codificada por el gen *IRE1*) y re-plegamiento de la proteína ATF6 $\alpha$ . Esta última se asocia a *wolframina* y a otra proteína denominada HRD1 en la unión membrana endoplásmica-proteasoma que habitualmente induce la degradación de la proteína ATF6 $\alpha$  para liberar la proteína plegada adecuadamente [Fonseca SG et al, (JCI) 2010]. Se ha demostrado también que *WFS1* controla la liberación del calcio en el RE; una disminución del calcio en el RE causa plegamiento anormal de las proteínas residentes, cuya acumulación dispara la respuesta del RE al stress y lleva a apoptosis [Schroeder M et al, 2005]. Aparentemente, el mecanismo de acción de *WFS1* es a través de la recaptura de calcio [Takei D et al, 2006]. Se postula que la apoptosis en condiciones patológicas asociadas a muerte de células  $\beta$  (stress de RE, stress oxidativo, hiperglucemia, niveles disminuidos de calcio y expresión anómala de Ca-ATPasa de RE) es a través de la ruta de la calpaina y se denomina a *Wfs1*, un gen pro-



supervivencia. Sin embargo, este mecanismo no ha sido esclarecido del todo [Hara T et al, 2014].

Los estudios bioquímicos indican que la mutación de *WFS1* provoca una acumulación de proteínas mal plegadas en forma repetida. Se estimula el mecanismo de liberación de caspasas y se activa la apoptosis [Fonseca SG et al 2010 (JCI)]. *WFS1* protege a las células en contra del stress de RE e inversamente, el stress crónico es causado por pérdida de función de *WFS1* [Fonseca SG et al, 2005]. Además, la *wolframina* parece ser un componente importante del plegamiento de la proinsulina y su procesamiento en el RE de las células pancreáticas [Fonseca SG et al, 2005; Xu R et al, 2009].

- **Expresión de WFS1**

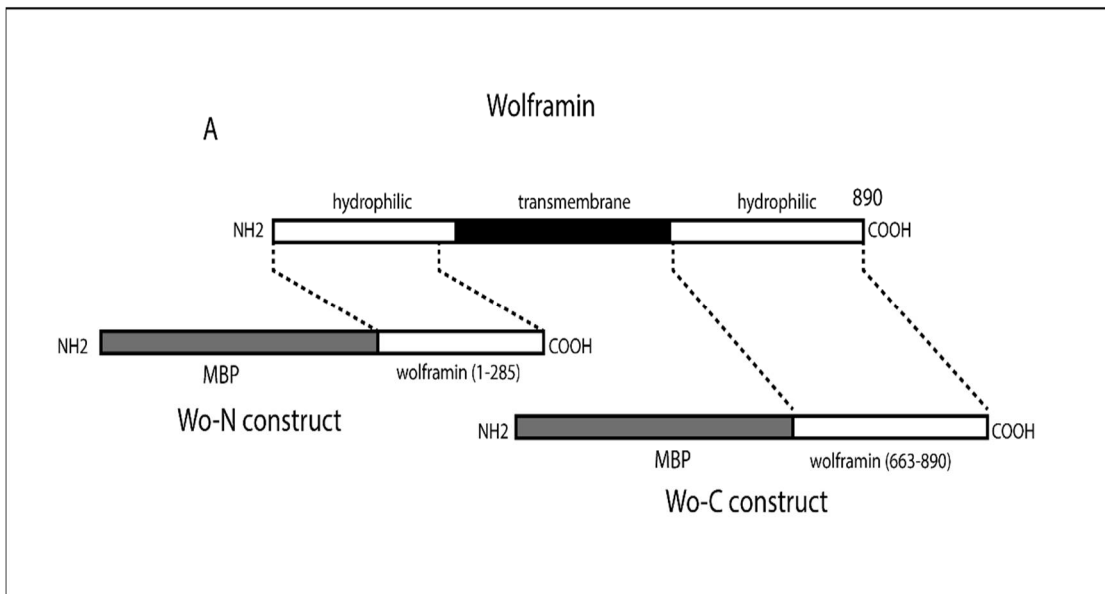
*Wfs1* se expresa ampliamente en embriones y adultos de especies como *Rattus norvegicus* [Xu 2009], *Xenopus laevis* [Osman 2003], cynomolgus monkey [Yamamoto H et al, 2006] y *Mus musculus* [Rigoli L et al, 2011], particularmente en el cerebro y en los islotes de Langerhans [Takeda K et al, 2001; Hofmann S et al, 2003; Yamada T et al, 2006; Schmidt-Kastner R et al, 2009; Köks S et al, 2010; Fonseca SG et al, 2010].

Por razones éticas, los estudios en humanos únicamente se han realizado a través de hallazgos post-mortem en pacientes fallecidos por SW. En estos casos, se ha estudiado la expresión de *WFS1* y se ha demostrado que la proteína está presente en estructuras cerebrales hipotróficas como el hipotálamo, las neuronas de núcleos paraventriculares y supraópticos y en tejido neurohipofisario. La base pontina y el núcleo olivar inferior mostraron condensación mientras que el cerebelo no presentó alteraciones. El sistema visual tenía pérdida de neuronas ganglionares retinianas de moderada a marcada, pérdida importante de axones mielinizados en nervio óptico, quiasma, tractos ópticos y núcleo geniculado lateral pero preservación de la corteza visual primaria. También se encontró pérdida del órgano de Corti en la vuelta basal de la cóclea y atrofia leve focal de *stría vascularis* [Hilson J et al, 2009]. En testículo de ratón también se ha observado la expresión de *Wfs1* [Noormets K et al, 2009].

- **Genética molecular de *WFS1***

El gen *WFS1* fue identificado en 1998, usando mapeo genético y abordaje de gen candidato mediante una colaboración norteamericana-japonesa [Strom TM et al, 1998; Inoue H et al, 1998]. La secuencia codificante del gen contiene 3628 pb distribuidos en 8 exones; el exón 1 no se traduce y el exón 8 es el de mayor tamaño (2609 pb) [Strom TM et al, 1998].

La estructura secundaria de la *wolframina* predice 3 dominios estructurales: un dominio central hidrofóbico que comprende 9 a 10 segmentos transmembranales flanqueados por un dominio hidrofílico en extremo amino terminal y una cola hidrofílica en el extremo carboxilo (Figura 2) [Strom TM et al, 1998; Hofmann S et al, 2003].



**Figura 2.** Esquema de la proteína wolframina. A la izquierda, se muestra el extremo amino, con característica hidrofílica, el cual se localiza en el citosol del retículo endoplásmico; en la parte intermedia se localiza la región transmembranal con 9 dominios y en el extremo derecho se observa el extremo carboxilo con su región hidrofílica correspondiente ubicada en la membrana citosólica del retículo endoplásmico (RE) (Figura tomada de Hofmann S et al, 2003)

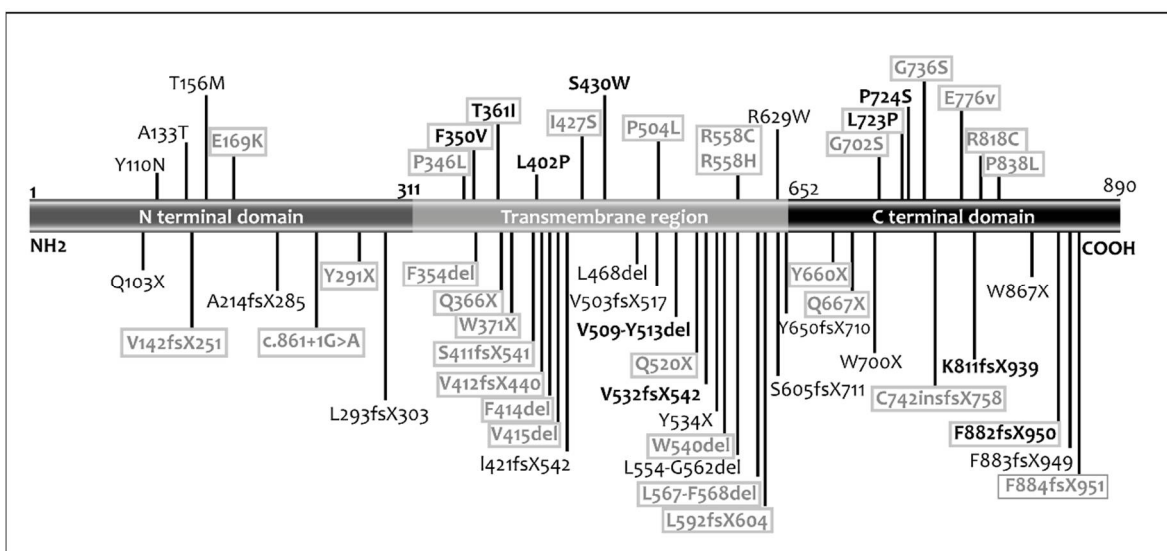
La *wolframina* es una glicoproteína de la membrana de RE con un número impar de hélices transmembranales con orientación Ncyt/Clum (9 dominios). La N- glicosilación juega un papel importante para la síntesis y/o estabilidad de las proteínas. Los análisis estructurales indican que la *wolframina* se organiza en complejos de alto peso molecular. La proteína se expresa ampliamente en páncreas, cerebro, corazón y musculo y en menor proporción en hígado, riñones y bazo. La expresión más alta del RNAm se ha encontrado en páncreas [Hofmann S, et al, 2003].

- **Espectro mutacional del gen *WFS1*:**

Existe un amplio espectro de mutaciones por pérdida de función en *WFS1*, en pacientes con SW, sin evidencia de una relación genotipo-fenotipo [Hardy C, et al, 1999]. La frecuencia de mutaciones en el gen *WFS1* en pacientes con SW de diferentes poblaciones es variable. Por ejemplo, 75% de los casos de SW en población española presentan mutaciones en *WFS1* [Gómez-Zaera M et al, 2001]; 78.6% de casos de población danesa [Hansen L, et al, 2005]; 90% en población francesa [Chausseot A, et al, 2011] y 90% de pacientes en población inglesa [Khanim F et al, 2001; Chausseot A, et al, 2014].

El espectro mutacional de *WFS1* es complejo ya que se han identificado todo tipo de mutaciones en este gen, incluyendo mutaciones sin sentido, por alteración del marco de lectura, duplicaciones, en sentido equivocado. En general, estas mutaciones se asocian a pérdida de función (sin sentido o por corrimiento en el marco de lectura), especialmente las que determinan proteínas truncadas [Hardy C et al, 1999]. Las mutaciones son homocigotas o de tipo heterocigoto compuesto como se ha reportado en población Latinoamericana (Zenteno JC et al, 2008). La mayor parte (75-95%) de las mutaciones se han localizado en el exón 8 [Hardy C et al 1999; Khanim F et al, 2001; Chausseot A et al, 2011], aunque en población mexicana también se han observado en el exón 5 [Zenteno JC et al. 2008].

Un estudio que analizó la distribución del tipo de mutación en un grupo de 59 casos de SW identificó mutaciones de sentido equivocado (38%), con cambio en marco de lectura (32%), sin sentido (15%), deleciones pequeñas (13%) y mutaciones en sitios de splicing (2%). En la figura 3 se muestra un esquema de la proteína *WFS1* con la localización de las mutaciones identificadas [Chaussetot A et al, 2011].



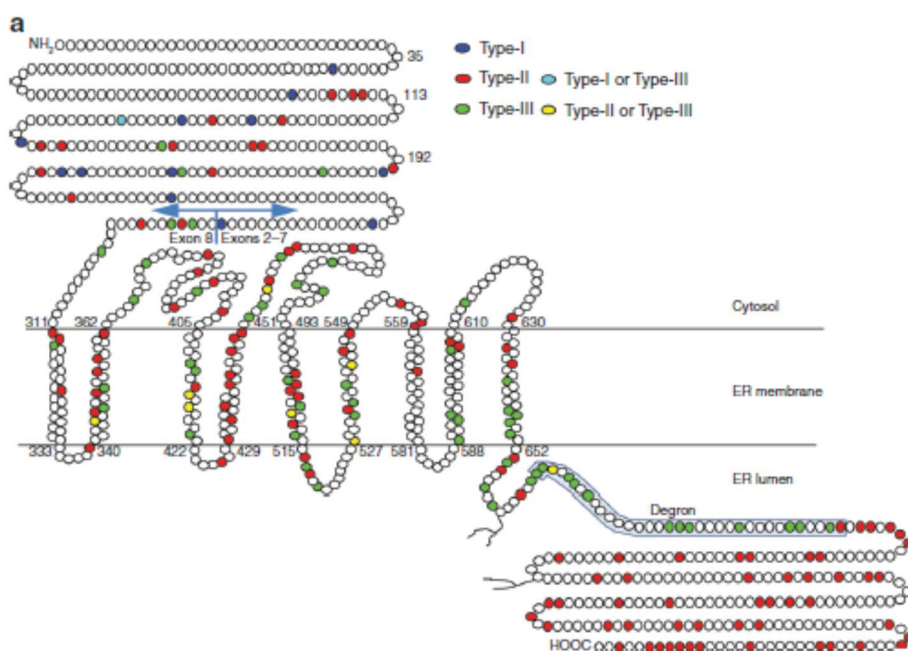
**Figura 3.** Mutaciones identificadas en la proteína *WFS1* en pacientes con SW. Las mutaciones de sentido equivocado se muestran en la parte superior de los dominios de la proteína mientras que en la parte inferior se indican las mutaciones sin sentido, inserciones, deleciones y mutaciones en sitio de "splicing" [Tomado de Chaussetot, et al, 2011].

- **Clasificación genotípica**

Chaussetot (2011), clasificó las mutaciones de *WFS1* en 3 grupos: genotipo A, pacientes con dos mutaciones en sentido equivocado; genotipo B, pacientes con una mutación en sentido equivocado y genotipo C, pacientes sin mutaciones en sentido equivocado. Por su parte, Rohayem consideró 3 categorías de acuerdo al efecto predicho en la función de la *wolframina* (por genotipo): 1) mutaciones con una pérdida completa de función; 2) mutaciones con una pérdida parcial de función y 3)

mutaciones con pérdida de la función presuntamente menor. Este investigador apoyado en otros estudios, correlacionó el efecto predicho de la mutación sobre la proteína con la edad de presentación de la enfermedad [Cano A et al, 2007; Rohayem J et al, 2011].

Más recientemente, López de Heredia (2013), clasificó a los genotipos en 3 clases: en el tipo I, las mutaciones resultan en la ausencia de *wolframina* debido a degradación del RNAm (codón de paro antes del exón 8); por su parte, los tipos II y III se basan en el concepto de **degrón**, término utilizado para denominar una secuencia blanco de la proteína *wolframina* que detecta error en el plegamiento de la proteína e inicia el mecanismo de degradación de la misma. Esta secuencia se encuentra entre los aminoácidos 671 a 700. La mutación tipo II conserva el degrón mientras que la tipo III no lo conserva, dando como resultado mayor severidad clínica en el tipo II y expresión muy leve en el tipo III (Figura 4) [de Heredia ML et al, 2013].



**Figura 4.** Esquema de la proteína *wolframina*. Se señalan la localización y tipo de mutación, Tomado de López de Heredia M, et al, 2013]

Es importante señalar, que ciertas mutaciones heterocigotas de *WFS1* pueden originar sordera neurosensorial no sindrómica de baja frecuencia [Besvalopa IN et al, 2001] y también se han asociado a un riesgo aumentado de enfermedad depresiva y de intento suicida en portadores heterocigotos [Swift M and Swift RG, 2005], [Aluclu MU et al, 2006]. Además, recientemente se ha sugerido que algunas variantes comunes de *WFS1* pudieran conferir riesgo para el desarrollo de DMT2 [Fawcett KA et al, 2010].

- **Correlación genotipo-fenotipo:**

Se ha intentado establecer un diagnóstico predictivo de la severidad y las complicaciones de la enfermedad de acuerdo al tipo de mutación en *WFS1*. En un estudio reciente se analizó este gen en 59 pacientes con SW y se identificaron 109 alelos mutados correspondientes a 56 diferentes mutaciones. Se caracterizaron dos alelos mutantes en 90% de los pacientes [Chausseot A et al, 2011]. De acuerdo a este estudio, la edad de inicio de diabetes mellitus y atrofia óptica se retarda significativamente cuando los pacientes son portadores de 1 o 2 mutaciones de sentido equivocado, mientras que el desarrollo o edad de inicio de síntomas neurológicos no correlacionó con el genotipo. Se considera que puede haber un fenotipo muy severo en caso de mutaciones en el exón 4 o de deleciones extensas del exón 8 [Casey JA et al, 2004].

- **SW vs DMT1**

La diabetes mellitus tipo 1 es una de las enfermedades con mayor morbi-mortalidad en población mexicana y dentro de los grupos de alto riesgo se encuentran los individuos jóvenes, los cuales debutan con alteraciones metabólicas severas y con dependencia a la insulina [Cizza G et al, 2012]. En los últimos años, se ha reconocido que un porcentaje de pacientes con DMT1 realmente presenta el SW pero su

diagnóstico se retrasa por no considerar esta posibilidad [Esteban BG et al, 2006; Homa K et al, 2014]. Los pacientes con este síndrome presentan complicaciones multisistémicas muy severas y diferentes del cuadro clásico de DMT1, cuyo pronóstico es diferente [Pilley SFJ et al, 1997]. A nivel ocular, se presenta atrofia óptica y en menor proporción retinopatía [Hoekel J et al, 2014]; la diabetes insípida es una característica de la enfermedad y está relacionada con alteraciones hipotalámicas de tipo degenerativo lo cual caracteriza al SW [Zmyslowska A et al, 2014] y no son comunes en la diabetes mellitus; la hipoacusia neurosensorial, generalmente de bajas frecuencias, es un criterio para SW y en su forma dominante (altas frecuencias) puede estar relacionada con mutaciones en *WFS1* [Häkli S et al, 2014] y no se observa en la diabetes mellitus clásica; otras manifestaciones parte del DIDMOAD, son alteraciones genitourinarias tales como dilatación de vejiga que puede originar un cuadro de hidronefrosis, distinto a nefropatía diabética; otras características son hipogonadismo y alteraciones neurológicas en particular de tallo cerebral y psiquiátricos de diversa índole [Rohayem J et al, 2011]. En particular se ha observado conducta con tendencia al suicidio [Aluclu MU et al, 2006] lo que implica elevación de la morbimortalidad asociada [Philip R et al, 2013].

Esta información ha llevado a la necesidad de realizar estudios que identifiquen casos de SW con diagnóstico erróneo de DM tipo 1 aislada. Así, la prevalencia relativa de SW en pacientes con DMT1 en Polonia es de 0.12% [Zmyslowska A et al, 2014 (Exp CI End Diab)], de 0.13% en Alemania [Rohayem, 2011], de 0.6% en Inglaterra [Barrett T et al, 1995], de 4.48% en Sicilia [Lombardo F et al, 2014] y de hasta 4.58% en Líbano [Zalloua PA, et al, 2008], dependiendo del método de detección. En población mexicana, no se conoce la frecuencia en población general del SW y existen pocos reportes de pacientes con esta enfermedad [Zenteno JC et al, 2008; Chacón-Camacho O et al, 2013]. Dada la disparidad en las frecuencias entre diversas poblaciones y la gran heterogeneidad clínica de la enfermedad, se considera que el SW pudiera estar subdiagnosticado en algunos grupos étnicos y que un porcentaje de estos casos tienen

un diagnóstico erróneo de DM tipo I no sintromica [de Heredia ML et al, 2013; Homa K, et al, 2014].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El SW es una entidad monogénica que cursa con diabetes mellitus tipo 1 y con diversas alteraciones sistémicas, de difícil diagnóstico temprano. Generalmente éste se realiza cuando el cuadro clínico es completo y existen pocas oportunidades de prevención secundaria, con lo que la calidad de vida del paciente se deteriora en forma importante, dado que no se conoce un tratamiento curativo. La prevalencia del síndrome en población general a nivel internacional es muy baja, y el diagnóstico se basa primordialmente en los datos clínicos con los criterios mayores (DMT1+AO). Sin embargo, la prevalencia relativa en grupos de pacientes diabéticos tipo 1 es significativamente más alta y puede llegar a casi el 5% en algunos grupos étnicos. Recientemente los criterios clínicos diagnósticos se han ampliado y con ello se ha incrementado la tasa de detección en otros países. Por otro lado, se ha reconocido que un porcentaje de pacientes con DMT1 realmente presenta el SW; los pacientes con SW tienen complicaciones en diversos órganos y sistemas cuyas características, evolución y pronóstico son diferentes de los observados en una DMT1 clásica; esta es una entidad monogénica que fácilmente es confundida con DMT1. Por lo anterior, se considera que el SW puede estar sub-diagnosticado dentro de la población de diabéticos tipo 1, con importante repercusión en su atención médica.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la frecuencia del SW en una muestra de pacientes con DMT1 y cuál es el espectro de mutaciones causales en el gen *WFS1* en esos pacientes?



## JUSTIFICACIÓN

En México no existen estudios que hayan investigado la proporción de casos con SW en pacientes que tienen diagnóstico de DMT1 aislada. El diagnóstico diferencial entre DMT1 y SW puede mejorar la calidad de vida de estos pacientes e incrementar su supervivencia, especialmente si son detectados a temprana edad. La realización de este estudio contribuirá a la caracterización tanto de la epidemiología genética de la enfermedad como del espectro mutacional de *WFS1* en población mexicana.

## OBJETIVOS

- **Objetivo general:** Establecer la frecuencia de SW en un grupo de sujetos con DMT1 y caracterizar las mutaciones causales en el gen *WFS1* en tales pacientes
- **Objetivos particulares:**
  1. Identificar la proporción de casos con SW en una muestra amplia de pacientes con DMT1.
  2. Describir el fenotipo de los casos con criterios clínicos para SW.
  3. Establecer la frecuencia, tipo y localización de mutaciones del gen *WFS1* en pacientes con criterios clínicos para SW.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

**Si** en el grupo de DMT1, 5% puede padecer SW (de acuerdo a la literatura internacional); **entonces** al estudiar fenotípica y genéticamente a grupos mexicanos de DMT1 se podría encontrar una tasa similar de SW.

## METODOLOGÍA

- **Diseño y tipo de estudio:** Descriptivo, transversal, observacional y prolectivo
- **Universo de trabajo:** Pacientes de cualquier edad cauticos en clínicas de diabéticos tipo 1.
- **Cálculo del tamaño de muestra:** muestra consecutiva total a conveniencia de 102 casos de DMT1. Al tratarse de un estudio descriptivo y de una variable dicotómica, se realizó un cálculo de tamaño de muestra para proporciones con un intervalo de confianza del 95%. Considerando una población de 400 individuos con DMT1 y una frecuencia de 5% de SW en esta población, alfa 5% y beta de 80%. Se ajustó por margen de error y efecto de diseño de 1.5 más 10% por pérdidas, con lo cual se obtuvo un número ideal de 102 sujetos.
- **Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**
  - Criterios de inclusión para diagnóstico clínico
    - 1) Paciente con DMT1 de cualquier edad que contara con expediente clínico
  - Criterios de inclusión para estudio molecular
    - 1) Paciente con diagnóstico clínico de SW
  - Criterios de exclusión para estudio molecular
    - 1) Paciente no disponible para muestra de DNA

## **Desarrollo del proyecto** (Figura 5):

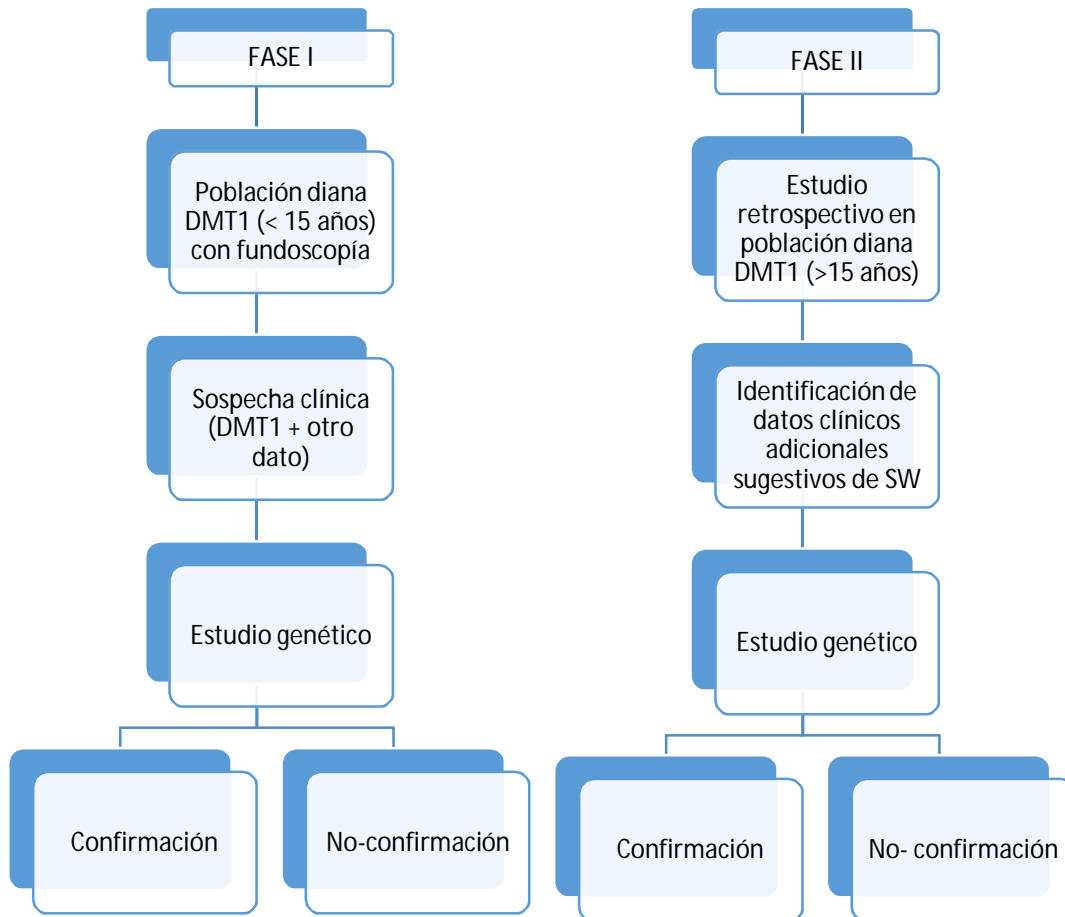
Se consideraron dos fases para la selección de pacientes:

- **Fase I**

Pacientes menores de 15 años de edad con DMT1, en búsqueda de un signo adicional de DIDMOAD como criterio diagnóstico de SW. Se realizó estudio molecular a los pacientes con diagnóstico clínico de SW, previo consentimiento y/o asentimiento informado y aprobación del protocolo en el IOCV y el hospital colaborador.

- **Fase II**

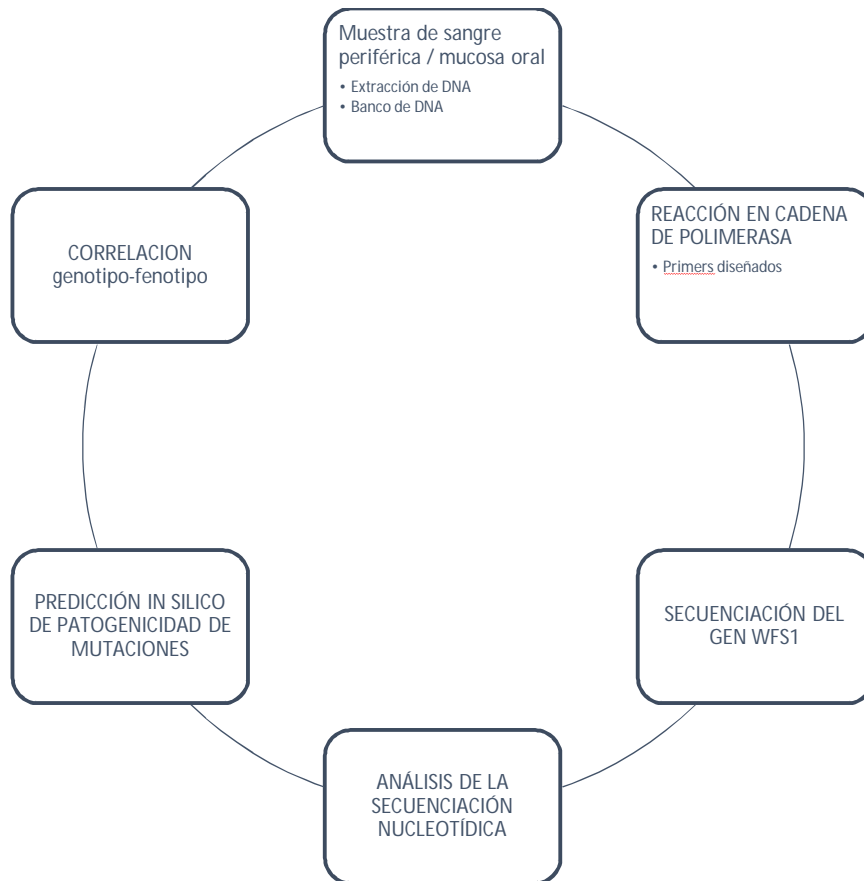
Expedientes de pacientes mayores de 15 años de edad con DMT1, en búsqueda de datos clínicos adicionales que fueran criterios para SW. Se realizó estudio molecular a los pacientes seleccionados, previo consentimiento y/o asentimiento informado y aprobación del protocolo en el IOCV y el hospital colaborador.



**Figura 5.** Esquema del desarrollo del proyecto.

## Estudio genético molecular

Las Técnicas de biología molecular empleadas consistieron en extracción de DNA, amplificación del gen *WFS1* por PCR, electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa, purificación de los productos de PCR y secuenciación automatizada de la secuencia codificante del gen *WFS1*.



**Figura 6.** Esquema general del estudio genético molecular en pacientes con diagnóstico clínico de SW

- **Aislamiento de DNA genómico:**

- Extracción de DNA de células de mucosa oral:

Se realizó la toma de muestra de mucosa oral con cepillo estéril y se conservó en solución de lisis celular. Se transportó al laboratorio de genética Molecular. Se utilizó el kit "Gentra Puregene Buccal Cell Kit". Siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se cuantificó la concentración con el equipo de espectrofotometría Nano-drop, se etiquetó cada muestra y se registró en el archivo del laboratorio.

- Extracción de DNA de leucocitos de sangre periférica:

Se utilizó el kit de QuickGene DNA whole blood kit S. Se realizó la extracción de tipo manual. Inicialmente se extrajeron los leucocitos de sangre total por decantación. Se conservaron en PBS al 1% y se registraron en la bitácora del laboratorio. A continuación se obtuvo el DNA de los leucocitos mediante el kit de extracción de DNA Autogen QuickGene DNA whole blood kit S, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración con el espectrofotómetro Nano-drop 2000, se etiquetó cada muestra y se registró en el archivo del laboratorio.

- **Amplificación por PCR:**

Se efectuó la amplificación por PCR de cada uno de los exones codificantes del gen *WFS1* a partir del DNA de los sujetos afectados, utilizando pares de oligonucleótidos (primers) derivados de la secuencia normal de cada exón. Se utilizó un juego de primers reportado previamente [Zenteno JC et al., 2008], con las Tm descritas en la Tabla 3. El exón 8 (2609 pb) se amplificó en 4 segmentos. Se utilizó el kit KAPA Taq ReadyMix (Kapa Biosystems, Boston, MA, USA), el cual es una mezcla que contiene todos los componentes para PCR, excepto primers y templado. La mezcla contiene Taq DNA Polimerasa (1 U por 50 µl de reacción), Taq Buffer, dNTPs (0.2 mM de cada dNTP

al 1X), and MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM al 1X). Se añadieron a la mezcla 100 ng de DNA genómico, 10mM primers sentido y antisentido (Tabla 3) y agua bidestilada hasta 25 µl.

Exón	Primers (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
2	F: GCAGACACTAAGTGCCAGA R: CTGAACTGCAGAGGACCTG	56
3	F: GCAGCAGCAGATCTGAAGA R: TCTCAGGCACCGACACTTCT	56.6
4	F: GAAGTGGGTGAAAGGAGGT R: CAGTTAGCAAGCAGCATTAC	53.9
5-6	F: GTCAGAGTGGCACCGAAAGC R: TCGCCCTGCAGGTGCAGGCTGGGA	65.1
7	F: ATTGCTCTGTGTGAGGGTG R: CCTGCCTGAGGTGCGCGAGT	62.8
8-1	F: TTGCCAGAGGCAGGGTGGT R: ATGGAGGGCAGCAGCGATAGCA	61.3
8-2	F: ATCCCCTGCTCGGAGCTGGCT R: AGTTGTAGACCTTCATGCC	63
8-3	F: CAAGGCCAGCTTCTCTGTGGT R: ATGGCCTTGAGCTCGAAGACA	59.1
8-4	F: CAAGGACATCGTGCTGCGGGC R: AGTCTGCACACGTGGGCACA	63

**Tabla 2.** Secuencia de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento utilizados para la amplificación de la región codificante del gen *WFS1* [Tomado de Zenteno JC et al, 2008].

Se utilizó un termociclador Biorad, con un programa de temperaturas que incluyó 1 ciclo de 15 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos y 1 minuto a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para la extensión final.

Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pares de bases. Se reconocieron las bandas de

interés con la ayuda de un transiluminador Kodak y se escindieron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna con el kit de extracción QIAquick-Gel (Qiagen, Hilden Germany) o en forma automatizada mediante el equipo Qiacube (Qiagen).

- **Secuenciación nucleotídica:**

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de cada uno de los exones del gen *WFS1*. Cada reacción de 10 µl contenía 2 µl del reactivo BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) con los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl<sub>2</sub> y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 1 µl del oligonucleótido correspondiente (sentido o antisentido) a una concentración de 10 mM, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 20 µl. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluía 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 segundos a 50°C para el alineamiento y 4 minutos a 60°C para la extensión. Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 microlitros de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático 3130 (Applied Biosystems) y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararon en forma manual con las secuencias silvestres del gen *WFS1* para identificar posibles mutaciones.



Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Nivel de medición	Escala
Diabetes mellitus tipo 1	Tipo de diabetes en la que existe destrucción de células beta del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina	Diabetes mellitus tipo 1, diagnosticada en clínica de Diabetes, utilizando al menos la determinación de péptido C.	Cualitativa, nominal, dicotómica, discreta	Si. 1 No: 0
Síndrome de wólfram	DMT1 asociado a AO progresiva. La diabetes es insulino dependiente y puede asociarse a sordera neurosensorial, diabetes insípida, alteraciones del tallo cerebral, trastornos psiquiátricos, trastornos del desarrollo e hipogonadismo	1) DMT1 + AO 2) Dos criterios clínicos de SW	Cualitativa, nominal, dicotómica, discreta	Si. 1 No: 0
Mutación	Cambio heredable en la secuencia de DNA	Cambio heredable en la secuencia de DNA, demostrable por técnicas moleculares (secuenciación directa)	Cualitativa, nominal, dicotómica, discreta	Si. 1 No: 0
Tipo de mutación	<b>Mutación puntual:</b> Cambio de un solo nucleótido. <b>-Mutación de sentido equivocado:</b> Cambio en un nucleótido que causa el reemplazo de un aminoácido por otro. <b>-Mutación sin sentido:</b> Cambio en un nucleótido que origina un codón de paro prematuro. <b>Mutación por delección:</b> Pérdida de uno o más nucleótidos. <b>Mutación por inserción:</b> Ganancia de uno o más nucleótidos. <b>Mutación en sitio de splicing:</b> mutación que afecta las bases requeridas para el "corte y empalme" de los exones, o bien que al afectar la región de intrón, crea sitios alternativos de splicing.	Rango de mutaciones caracterizadas durante la investigación por los métodos clásicos de secuenciación génica y confirmadas mediante comparación con las bases internacionales de mutaciones en genes específicos, así como modelos de simulación (Anexos). De acuerdo a su descripción teórica (conceptual)	Cualitativa, nominal, polidicotómica	Si. 1 No: 0

**Tabla 3.** Operacionalización de variables. Definiciones tomadas de Dains JE, Baumann LC and Scheibel, ebook

### **Consideraciones de Bioseguridad:**

El estudio contó con la aprobación del Comité de Bioseguridad del IOCV con registro 13-CB-31-050-269 del IAP, tomando en cuenta la norma NOM-007-SSA3-2011.

### **Consideraciones éticas**

- a. Consentimiento y/o asentimiento informado para fase clínica y fase molecular (Anexo II)
- b. El proyecto fue sometido y aprobado en el Instituto de Oftalmología Fundación "Conde de Valenciana", por los Comités de Investigación (CI-005-2014) Registro 13-CI-09-015-261- COFEPRIS; de Bioética (CEI-2014/03/03) con registro 13-CEI-09-015-095. Asimismo a los comités correspondientes a cada hospital participante. Hospital Materno Perinatal "Mónica Pretelini Saínz", Instituto de Salud del Estado de México: Registro 2012-06-252. Hospital para el Niño, Instituto Materno Infantil del Estado de México, con oficio EI//2012, del 9 de agosto de 2012. Hospital General "Dr. Nicolás San Juan", Instituto de Salud del Estado de México. Registro SINARIS 217-B.51-000-201-4007. Hospital Infantil de México "Dr. Federico Gómez", Secretaría de Salud con registro: HIM-2014-080.

### **Análisis de datos**

- a. Cálculo de frecuencia de SW en individuos con DMT1 en la población
- b. Cálculo de frecuencias de alteraciones sistémicas por grupo.
- c. Cálculo de frecuencias de tipo de mutaciones

- d. Gráficas correspondientes a: Estadística descriptiva, Frecuencia (proporción), Secuenciación nucleotídica de los productos de PCR, Identificación de variantes deletéreas.

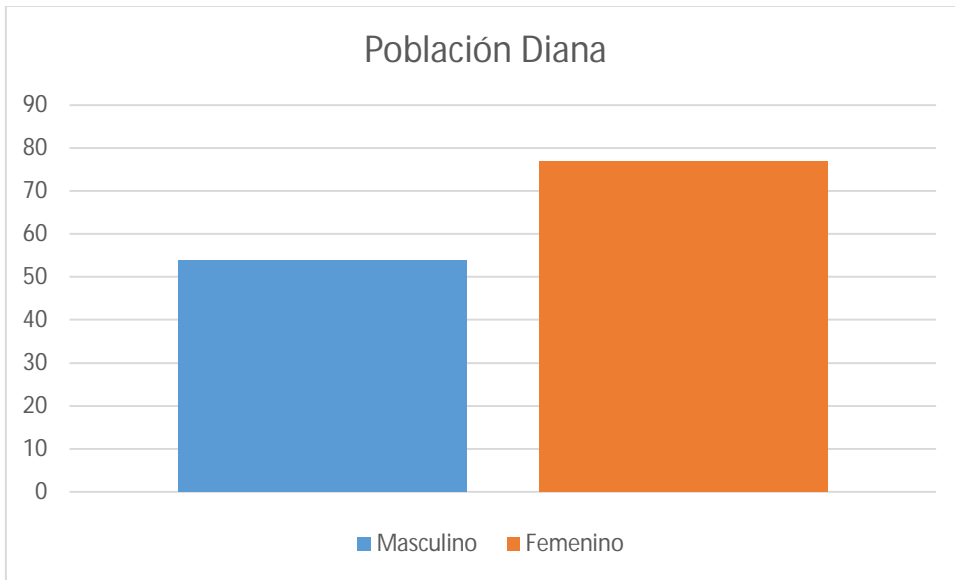
## RESULTADOS

- **Fase clínica:**

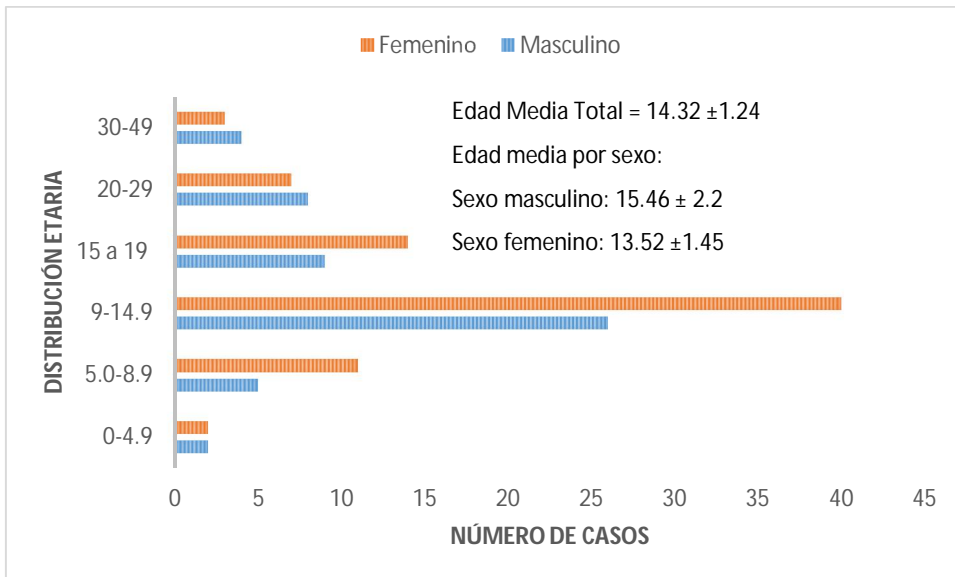
Se obtuvo una muestra de 137 sujetos con DMT1, provenientes de 131 familias no relacionadas. Los casos- índice de DMT1 correspondieron a 77 individuos femeninos y 54 masculinos (Gráfica 1). Hubo 5 familias con más de un sujeto con DMT1. En la tabla 3 se indica el origen de los pacientes por institución participante.

<b>Hospital</b>	<b>Número de casos índice</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Hospital para el Niño de Toluca, IMIEM	76	58
Asociación Mexicana de Diabetes Mellitus, A.C.	25	19
Hospital General Nicolás San Juan ISEM	20	15
Hospital Materno Perinatal MPS, ISEM	6	5
Instituto de Oftalmología, IOCV	4	3
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>100%</b>

**Tabla 4.** *Hospitales participantes*



**Gráfica 1.** Distribución de la muestra de DMT1 por género (n=131).



**Gráfica 2.** Distribución etaria por género de los pacientes con DMT1 (n=131).

- **Estudio fenotípico**

Los pacientes propósito fueron seleccionados de acuerdo a los criterios descritos por López de Heredia [2013]. En la muestra total de 131 sujetos no relacionados con DMT1 se identificaron 6 sujetos con criterios clínicos compatibles con diagnóstico de SW, lo que correspondió a una frecuencia de 4.58% de casos de SW en la muestra de DMT1. Dentro de los casos se encontró una mediana de edad de inicio de 6 años (intervalo de 3 a 12 años), con una duración mediana de 11.5 años (intervalo de 2 a 40 años). Cuatro de los 6 pacientes presentaron atrofia óptica (66.6%); dos presentaron diabetes insípida (33.3%); 2 déficit auditivo (33.3%); 3 de 6 presentaron vejiga neurogénica e hidronefrosis secundaria (50%); 4 de 6 tuvieron catarata (66.6%); 2 de 6 presentaron pubertad retrasada (28.57%); 2 de 6 presentaron retinopatía diabética (33.3%) y 1 de 6 presentó ataxia (16.6%). Los hallazgos clínicos de los 6 pacientes se resumen en las tablas 5(A) Y 5(B).

Caso	Género	DMT1		Atrofia óptica	Diabetes insípida	Hipoacusia
		Edad de inicio	Años de evolución			
1	Masculino	8	12	(+)	(-)	(+)
2	Femenino	3	11	(+)	(-)	(+)
3	Masculino	3	7	(-)	(+)	(-)
4	Masculino	4	16	(+)	(-)	(-)
5	Masculino	12	2	(-)	(+)	(-)
6	Masculino	8	40	(+)	(-)	(-)
Subtotales	Mediana	3.5	10	4/6	2/6	2/6
	Proporción			66.6%	33.3%	33.3%

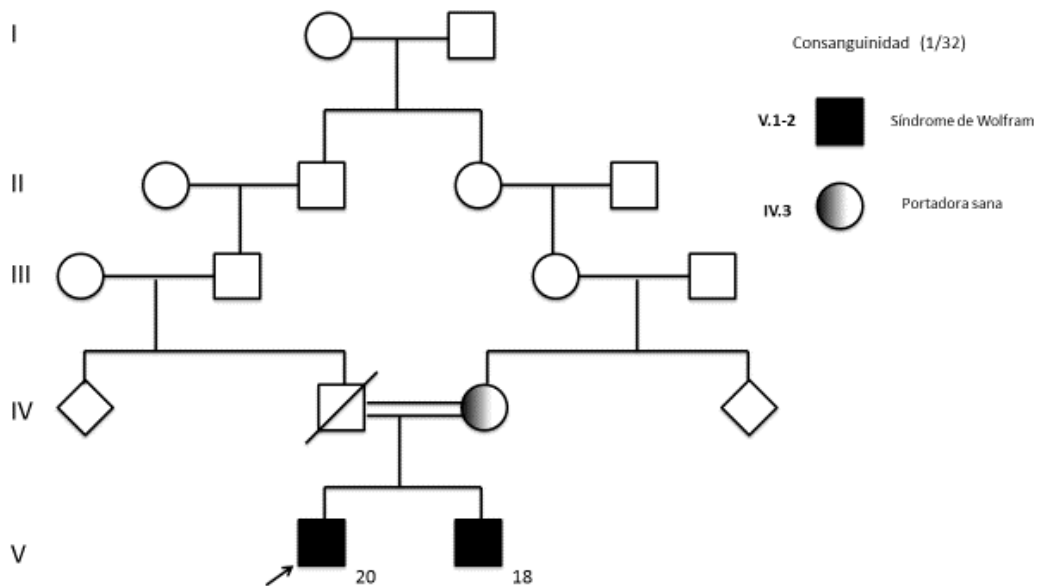
**Tabla 5 (A).** Datos fenotípicos compatibles con diagnóstico de SW en pacientes con DMT1. Frecuencia identificada: 6/131= 4.58%

Caso	Género	Vejiga neurogénica/hidronefrosis	Pubertad retrasada	Catarata subcapsular	Retinopatía	Ataxia
1	Masculino	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	Femenino	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	Masculino	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
4	Masculino	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
5	Masculino	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
6	Masculino	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
		2/6	2/6	4/6	2/6	1/6
		33.3%	33.3%	66.6%	33.3%	16.6%

**Tabla 5 (B).** Otras características fenotípicas de SW

- **Descripción clínica de pacientes con diagnóstico clínico de SW y resultados del estudio genético molecular**

**Caso 1:** El paciente índice era un individuo masculino de 20 años de edad, producto de una pareja consanguínea (Figura 7), con Diabetes Mellitus tipo 1 de inicio a los 8 años de edad y déficit visual con tiempo de evolución no especificado. Además, presentaba hipoacusia sensorial de grado superficial a media tipo bilateral, diabetes insípida y vejiga neurogénica. Un hermano menor presentaba un cuadro clínico similar. El estudio oftalmológico demostró atrofia óptica.



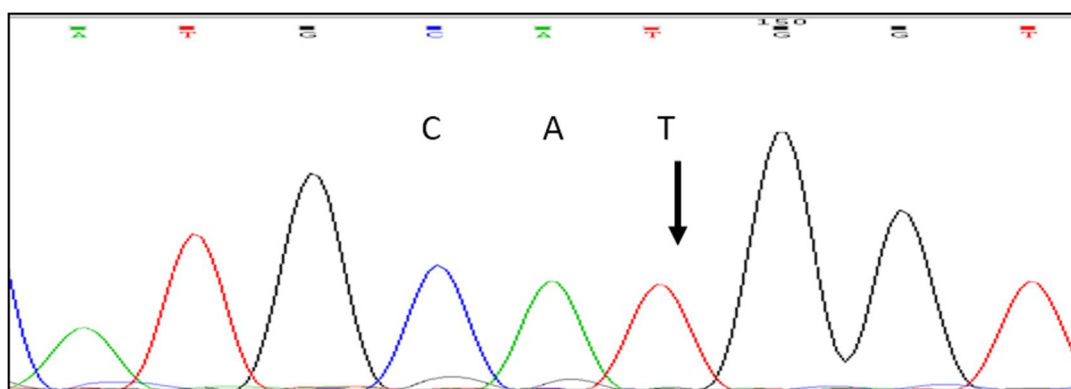
**Figura 7.** Árbol genealógico, caso 1



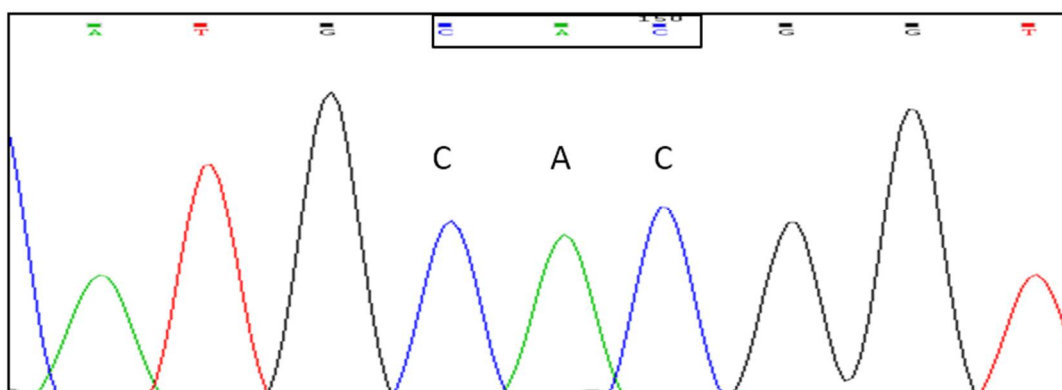
Estudio molecular (Caso 1).

El análisis del gen *WFS1* en este paciente demostró una mutación homocigota c.2611G>A (Figura 8), que predice una sustitución de sentido equivocado de valina a metionina en el residuo 871 de la proteína *wolframina* (p.V871M). Su hermano afectado presentaba la misma mutación también en estado homocigoto y la madre sana fue heterocigota (portadora) para la mutación. No pudo obtenerse muestra del padre. En las figura 7 se muestran los electroferogramas correspondientes.

(a)

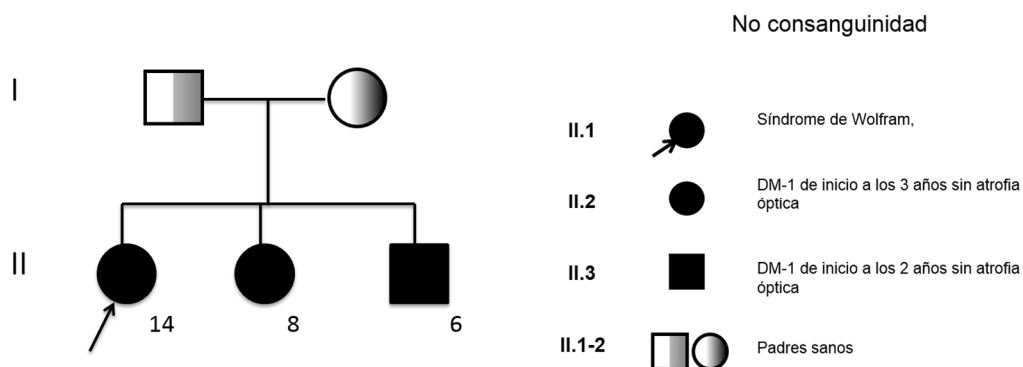


(b)



**Figura 8.** (a) Secuencia parcial del exón 8 del gen *WFS1* en DNA del caso 1. Se señala una mutación puntual homocigota c.2611G>A, que predice una sustitución p.V871M en la proteína; (b) DNA control. La secuencia mostrada corresponde a la cadena antisentido y se señalan los codones CAT (mutante) y CAC (normal).

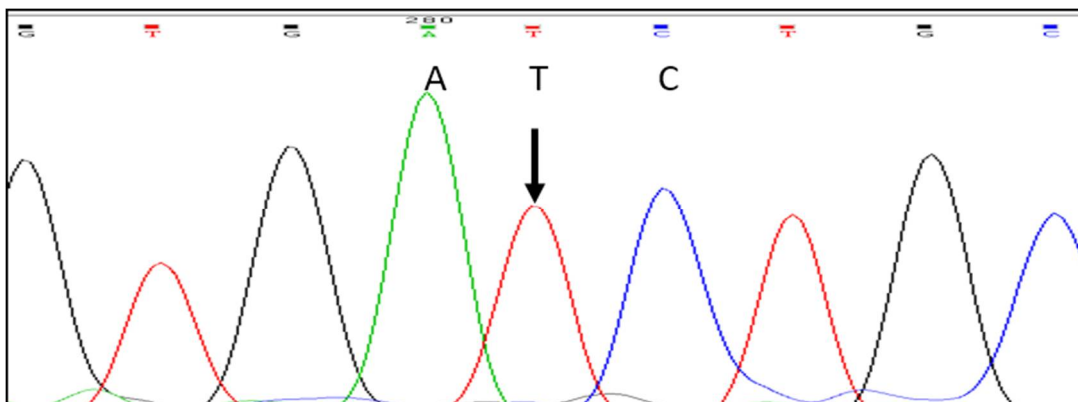
**Caso 2:** La paciente propósito (Figura 9) fue una mujer de 16 años de edad con DMT1 de inicio a los 3 años de edad. El análisis clínico reveló atrofia óptica bilateral y cataratas sub-capsulares. Presentaba infecciones recurrentes de vías urinarias y se identificaron atonía vesical, pielocaliectasia, y tracto ureteral dilatado bilaterales, mediante ultrasonido. La audiometría tonal demostró hipoacusia sensorial bilateral incipiente. Dos hermanos menores presentaban DMT1 desde los 3 y 2 años de edad, respectivamente y también catarata subcapsular. Los padres eran sanos y negaron consanguinidad, aunque provenían de la misma comunidad en el estado de México.



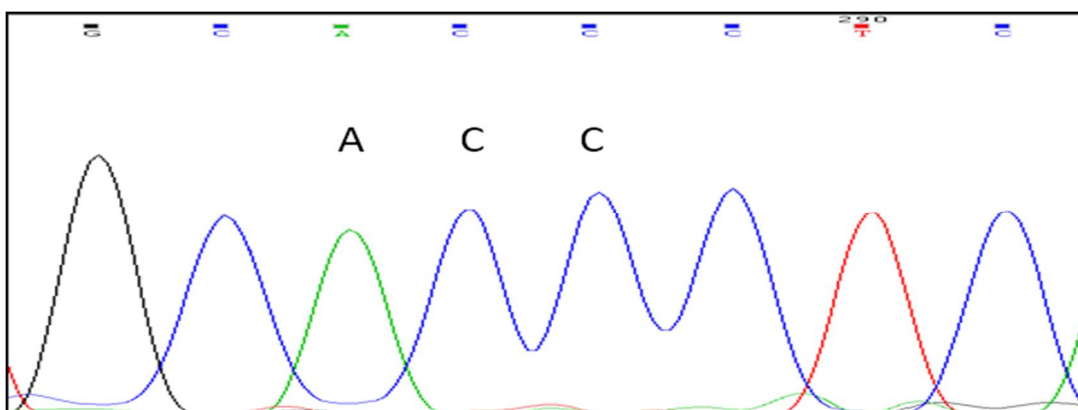
**Figura 9.** *Árbol genealógico, caso 2*

Estudio molecular (caso 2). El análisis molecular en la propósito identificó una mutación homocigota c.1080C>T en el exón 8 del gen *WFS1* (Figura 10). Esta transición nucleotídica predice una mutación de sentido equivocado de treonina a isoleucina en el aminoácido 361 de la proteína *wolframina* (p.T361I).

(a)

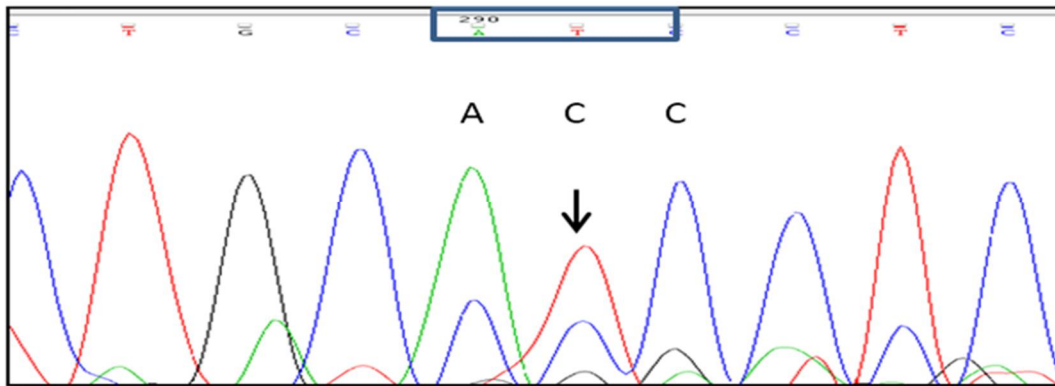


(b)

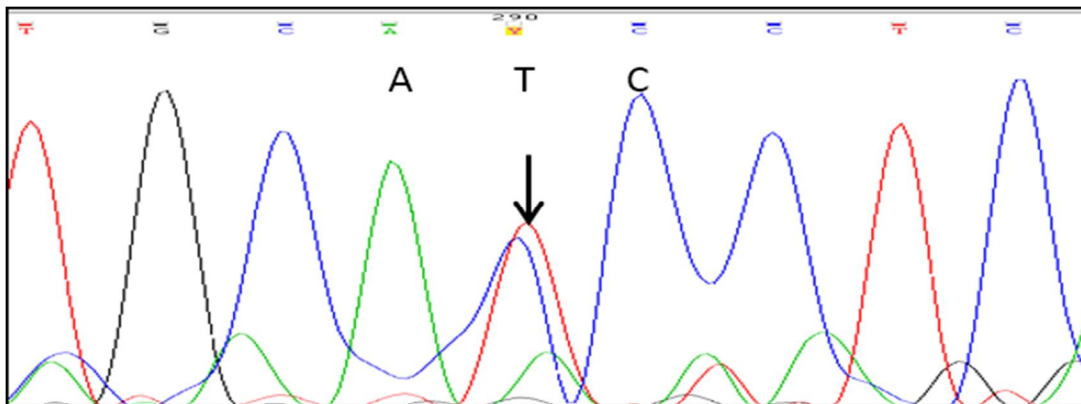


**Figura 10.** Secuencia parcial del caso índice 2, (II-1). (a) Se identificó una mutación puntual c.1080C>T homocigota, en el exón 8, que predice una mutación de sentido equivocado en la proteína, en la que se sustituye la tirosina normal por una isoleucina en el aminoácido 361 (p.T361I). (b) DNA control

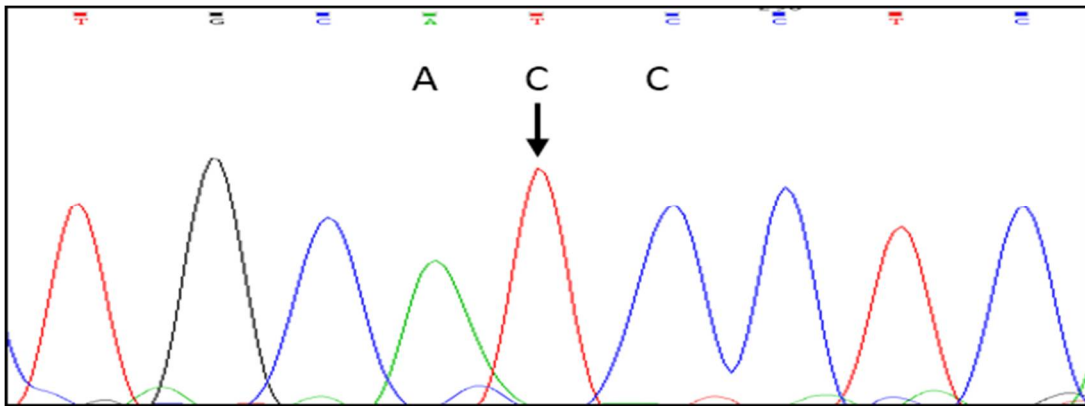
Se realizó estudio molecular a los familiares de primer grado del propósito y se identificó que los padres eran heterocigotos (portadores) de la mutación mientras que sus 2 hermanos afectados fueron homocigotos para la misma mutación (Figuras 11 a 14).



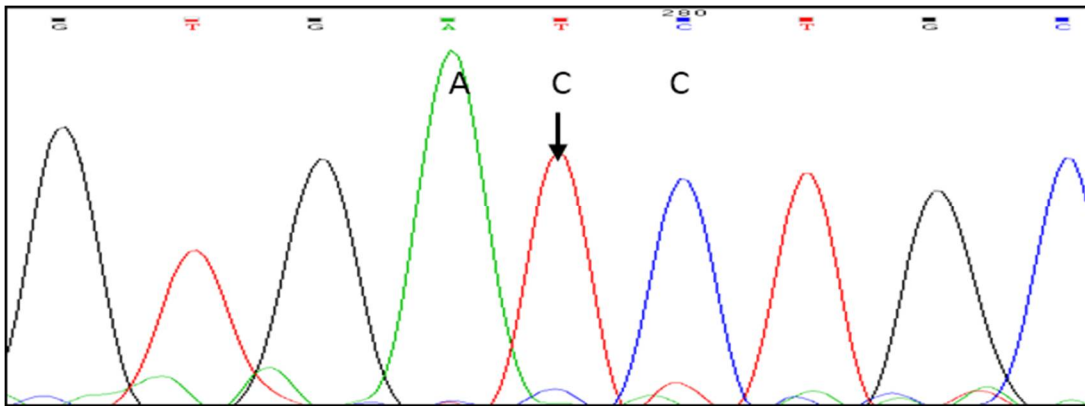
**Figura 11.** *Secuencia parcial del exón 8 del gen WFS1 en DNA del padre del caso 2. Se identificó heterocigosidad para la mutación c.1080C>T.*



**Figura 12.** *Secuencia parcial del exón 8 del gen WFS1 en DNA de la madre del caso 2. Se observa heterocigosidad para la mutación c.1080C>T (flecha).*

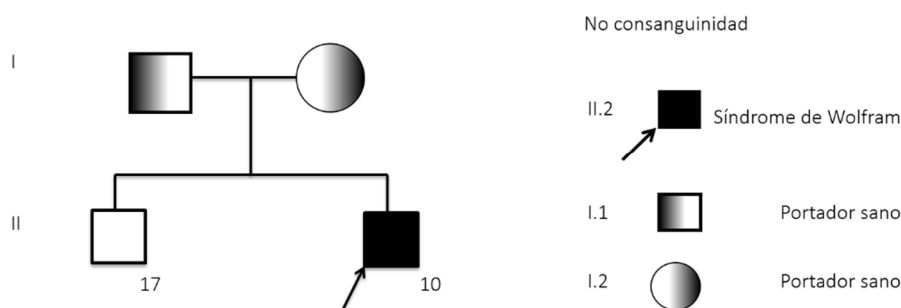


**Figura 13.** *Secuencia parcial del exón 8 del gen WFS1, correspondiente a una hermana afectada (II-2) del caso 2. Se identificó una mutación puntual homocigota c.1080C>T, que predice una mutación de sentido equivocado de tirosina a isoleucina en el aminoácido 361 (p.T361I).*



**Figura 14.** *Secuencia parcial del exón 8 del gen WFS1, correspondiente a un hermano (II-3) del caso 2. Se identificó una mutación puntual c.1080C>T homocigota, que predice una mutación de sentido equivocado en la que se sustituye la tirosina normal por una isoleucina en el aminoácido 361 (p.T361I).*

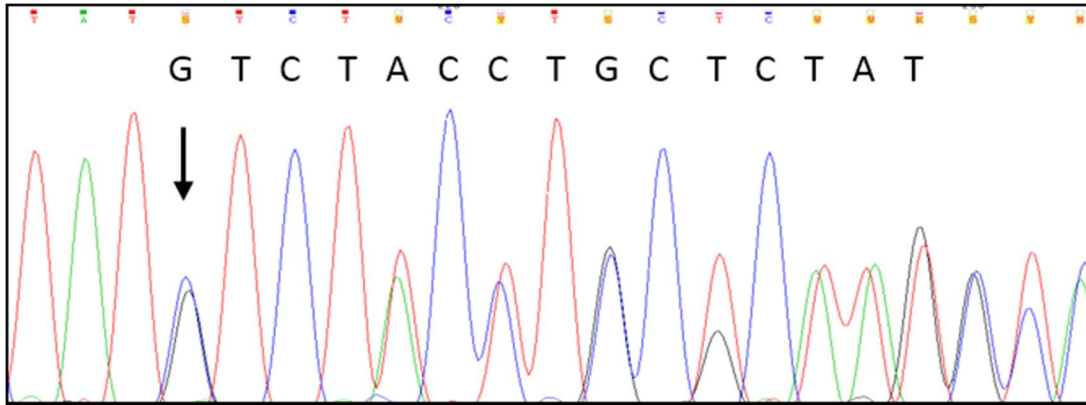
**Caso 3:** El propósito fue un individuo masculino de 10 años de edad con diagnóstico de DMT1 de inicio a los 3 años de edad. Presentó además diabetes insípida, catarata sub-capsular bilateral, hidronefrosis y vejiga neurogénica. Sus padres eran sanos y negaron ser consanguíneos (Figura 15).



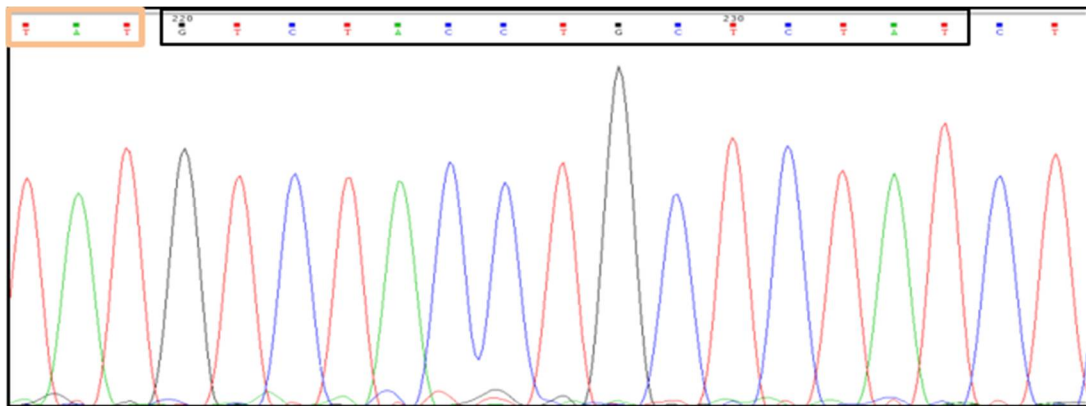
**Figura 15.** Árbol genealógico, caso 3

Estudio molecular (Caso 3): El análisis del gen *WFS1* en DNA de este paciente demostró 2 distintas mutaciones heterocigotas (heterocigosidad compuesta). Los padres fueron heterocigotos para cada una de las mutaciones (figuras 16-19). La mutación de origen paterno fue una deleción heterocigota de 15 pares de bases (c.1525-1539del15), que predice una deleción en fase de 5 aminoácidos (p. V509del\_Y513), mientras que la mutación de origen materno consistió en una deleción heterocigota de 4 nucleótidos (c.2643\_2646del) que origina un corrimiento de marco de lectura (p.F882fsX69).

(a)



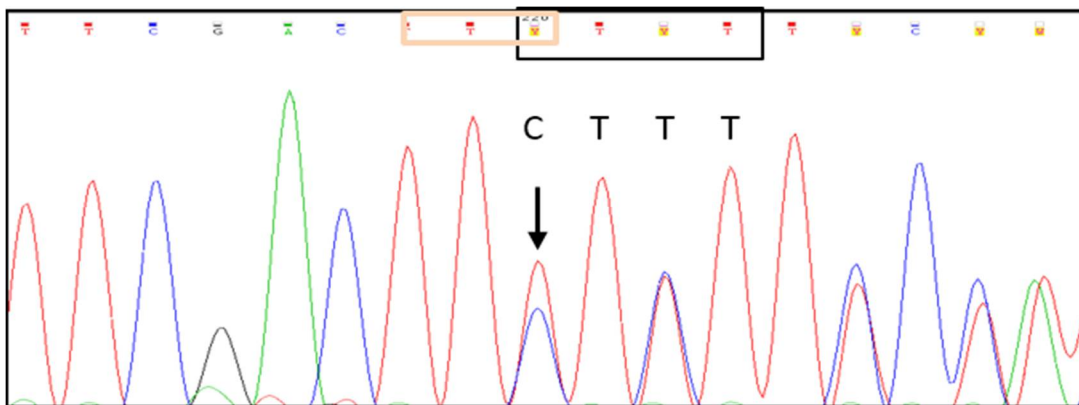
(b)



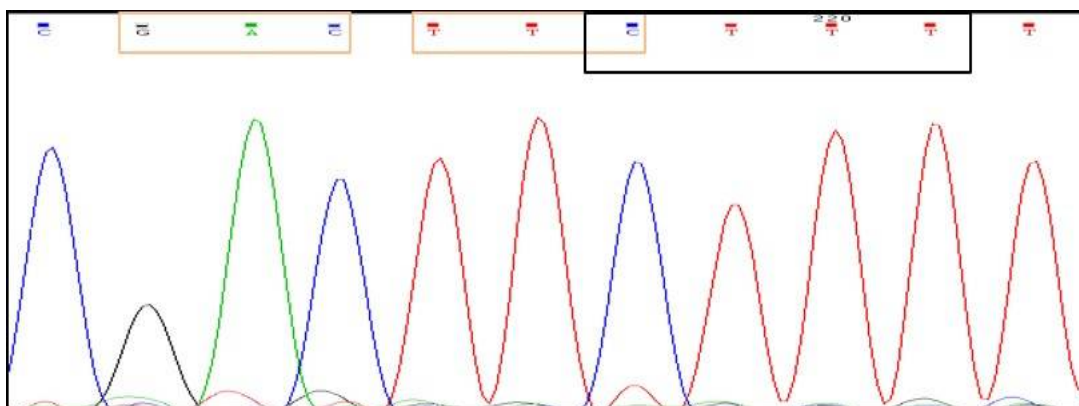
**Figura. 16.** *Secuencia parcial del exón 8 del gen WFS1 en DNA del caso 3. (a) Mutación por delección de 15 pares de bases.- c.1525- 1539del15 (p. V509del\_Y513), en estado heterocigoto (b) DNA control normal*

Caso III. Propósito (segunda mutación)

(a)



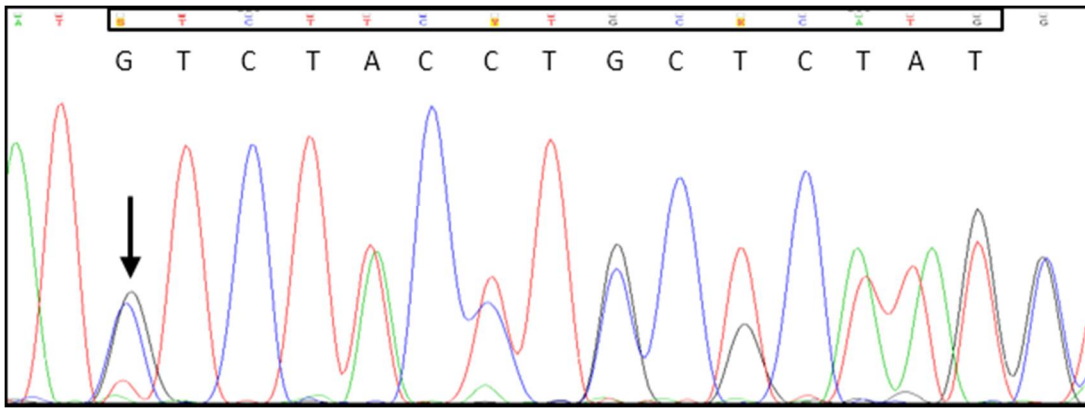
(b)



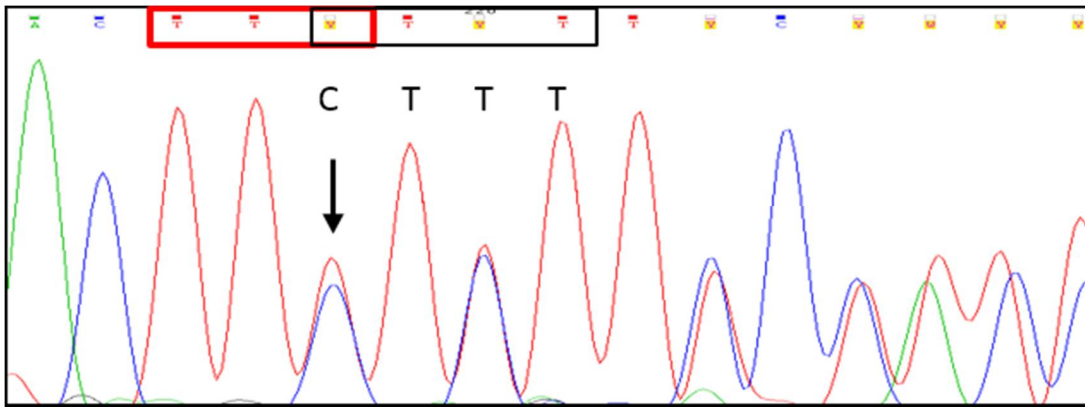
**Figura.17.** Secuencia parcial del exón 8 del gen *WFS1* en DNA del caso 3. (a) Se muestra una mutación heterocigota por deleción: c.2643\_2646del. (p.F882fsX69). (b) DNA control.

La secuenciación parcial de *WFS1* en DNA de los padres del caso 3 reveló que el padre era heterocigoto para la deleción c.1525\_1539del (p.V509del\_Y513) mientras que la madre fue heterocigota para la deleción c.2643\_2646del (F882fsX69)



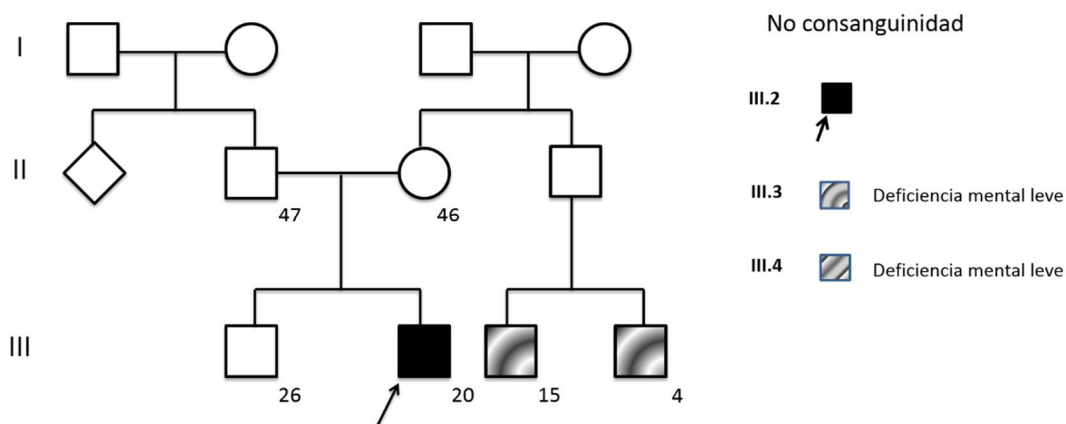


**Figura 18.** Secuencia parcial del exón 8 del gen *WFS1* en DNA del padre del caso 3. Deleción heterocigota en marco de lectura. c.1525\_1539del (p.V509del\_Y513).



**Figura 19.** Secuencia parcial del exón 8 del gen *WFS1* en DNA de la madre del caso 3. Se demuestra la deleción heterocigota 2643\_2646del (F882fsX69)

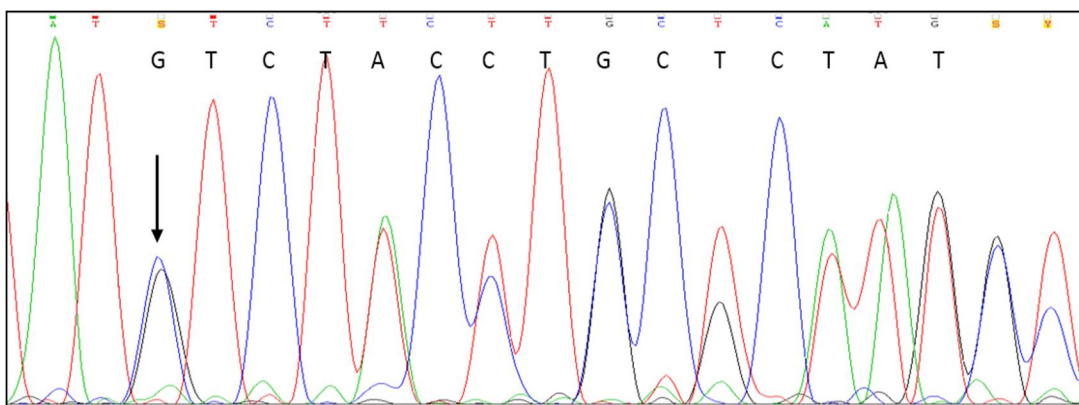
**Caso 4:** Es un paciente masculino de 20 años de edad, producto de la segunda gesta entre padres no consanguíneos. Tenía un diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 desde los 4 años de edad. Se identificaron anomalías asociadas como talla baja, pubertad retrasada, vitíligo, vejiga neurogénica, hidronefrosis unilateral, quiste aracnoideo en fosa craneal media, ataxia, catarata subcapsular bilateral y atrofia óptica. Negó antecedentes heredofamiliares de diabetes o de otras enfermedades relacionadas (Figura 20).



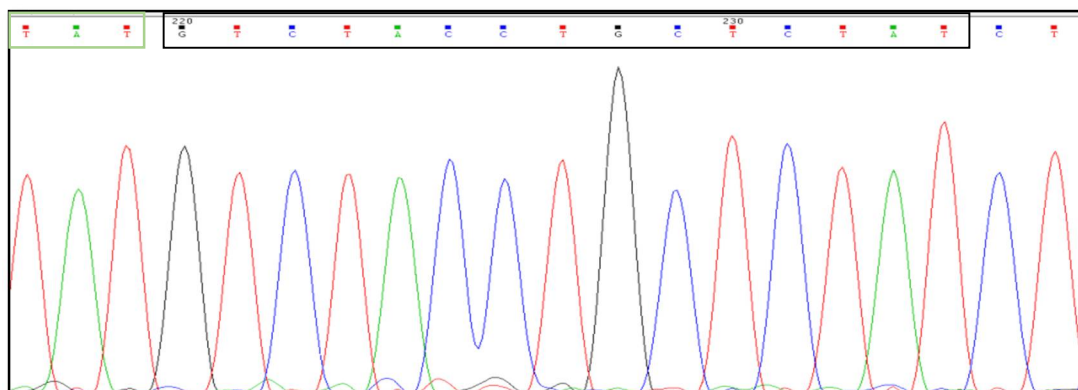
**Figura 20.** Árbol genealógico del caso 4.

Estudio molecular (caso 4). El estudio molecular del gen *WFS1* en este paciente reveló una deleción heterocigota c.1525\_1539del, en el exón 8 (Figura 21). Esta mutación predice una deleción de 5 aminoácidos, en fase de lectura, en la proteína *wolframina* (p.V509\_Y513del). No se identificó una segunda mutación en región codificante de *WFS1*.

(a)

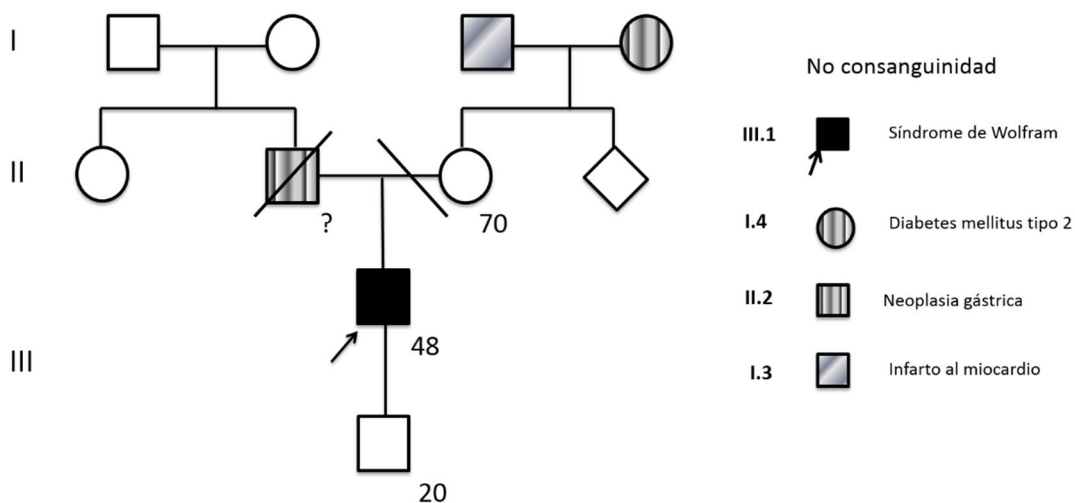


(b)



**Figura 21.** Secuencia parcial del exón 8 de *WFS1* en DNA del caso 4. (a) Se demuestra una delección de 15 bases c.1525\_1539del, (p.V509\_Y513 del), en estado heterocigoto. (b) DNA control.

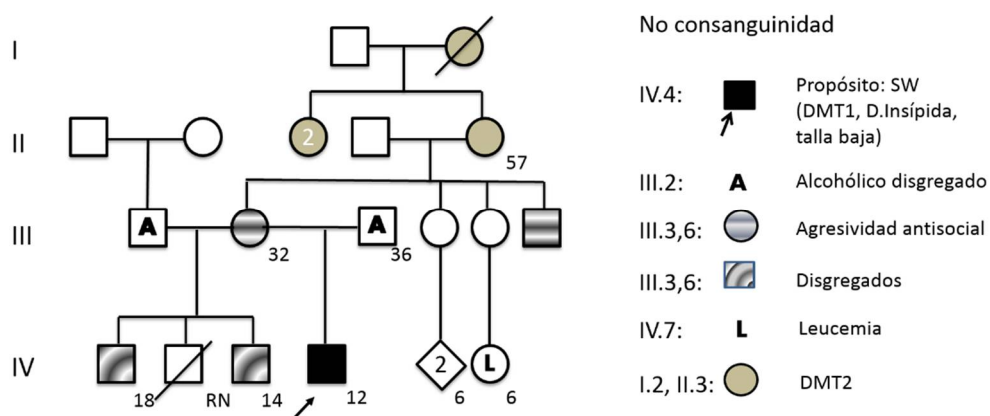
**Caso 5:** Es un paciente masculino de 48 años de edad con diabetes mellitus tipo 1 desde los 8 años de edad (Figura 22). Presentó nefropatía diabética desde los 32 años de edad con trasplante renal a los 39 años de edad y antecedente de disminución de la agudeza visual desde los 40 años de edad. La valoración oftalmológica reveló retinopatía diabética en ambos ojos. En ojo derecho se observó iris atrófico, papila con palidez +, excavación 50%, mácula sin brillo foveolar, huellas de láser 360°, pseudofaquia y retina derecha coagulada. Este ojo tenía antecedente de trasplante de córnea y exposición a láser. En ojo izquierdo se observó atrofia difusa del iris, retina aplicada, papila pálida y con excavación del 50%.



**Figura 22.** Árbol genealógico del caso 5.

Estudio molecular (caso 5): No se identificó ninguna mutación en la región codificante de *WFS1* en el DNA de este paciente.

**Caso 6:** Es un paciente masculino de 12 años de edad, con diagnóstico de DMT1 desde los 12 años de edad y cuadros frecuentes de cetoacidosis diabética y diabetes insípida intermitente. En este sujeto se consideró un diagnóstico probable de SW debido a la diabetes insípida y a trastornos conductuales, que son frecuentes también en la enfermedad (Figura 23). No se realizó estudio molecular ya que el paciente no aceptó la toma de muestra para extracción de DNA.



**Figura 23.** *Árbol genealógico del caso 6.*

- **Resumen del estudio genotípico**

Genotipo: Se identificaron 5 mutaciones en total (4 mutaciones distintas), que correspondieron a dos mutaciones de sentido equivocado y dos deleciones intragénicas. Todas las mutaciones se localizaron en el exón 8 del gen *WFS1*. La frecuencia de mutaciones en el gen *WFS1* en la muestra de pacientes con SW fue de 80% (4/5).

Caso	Tipo de mutación	Mutación en DNA	Mutación predicha en la Proteína	Población en la que se ha descrito la mutación	Cigosidad
1	Sentido equivocado	c.2611G>A	p.V871M	Canadiense <sup>Young TL et al. 2001, Domenech E et al. 2002</sup>	Homocigoto
2	Sentido equivocado	c.1080C>T	p.T361I	Francesa <sup>Chaussonot A et al. 2011</sup>	Homocigoto
3	Dos deleciones	1.-c.1525_1539del 2.-c.2643_2646del	1.-p.V509_Y513del 2.-p.F882_S884del	Francesa <sup>Chaussonot A et al. 2011</sup> Mexicana <sup>Chacón-Camacho O et al. 2013</sup> Japonesa <sup>Matsunaga K et al. 2014</sup> Brazilian <sup>Gasparin MR et al. 2009</sup>	Heterocigoto compuesto
4	Delección	c.1525_1539del	p. V509_Y513 del	Francesa <sup>Chaussonot A et al. 2011</sup> Mexicana <sup>Chacón-Camacho O et al. 2013</sup> Japonesa <sup>Matsunaga K et al. 2014</sup>	Heterocigoto
5	Sin mutación	-----	-----	-----	-----

**Tabla 6.** Resultados de la genotipificación de *WFS1* en 5 pacientes con *DMT1* y criterios clínicos para SW.

## DISCUSIÓN

- **SW vs DMT1**

a. El SW es una entidad poco frecuente en la población general [Barret TG, 1995; Matsunaga K et al, 2014; Rohayem J et al, 2011]. Generalmente se ha detectado a partir de evaluación dirigida en grupos de pacientes diabéticos o con anomalías oftalmológicas o neurológicas en diversas poblaciones del mundo [Hardy C et al, 2000; Medlej R et al, 2004; Hansen L et al 2005; Rohayem J et al, 2011; Matsunaga K et al, 2014; Chaussebot A et al, 2011].

b. En función de la detección de casos diagnosticados en estos grupos, se organizaron sociedades multidisciplinarias de apoyo dirigidas a este síndrome genético debido al alto impacto de la enfermedad sobre la salud y a su alta mortalidad asociada (4ª década de la vida) [Marshall BA et al, 2004; Kinsley BT et al, 1995; Proyecto Eurowabb; Wolfram Society UK Support Group; Washington University & Wolfram Syndrome Study; Asociación española del Síndrome de Wolfram]. En nuestro país existen asociaciones de Diabetes tipo 1 [FMD, AMD] y ésta fue la fuente más importante de los pacientes para esta muestra. Al momento no se había realizado ninguna investigación para reconocer el SW en grupos de pacientes mexicanos con diagnóstico de DMT1.

c. El síndrome se considera infrecuente en población caucásica y en otras poblaciones del mundo, pero ocurre en mayor número en poblaciones endogámicas [Zalloua PA et al, 2008; Lombardo F et al, 2014]. En función de la frecuencia de DMT1, se utilizó la estrategia de analizar a pacientes con esta característica utilizando criterios adicionales de detección clínica de SW y se obtuvo una frecuencia de 4.58% en el grupo de pacientes con DMT1.

- **Hallazgos clínicos de nuestro estudio**

a. Se obtuvo una muestra de 137 pacientes diabéticos tipo 1, un tamaño de muestra mayor al calculado de 102 casos (95% de intervalo de confianza); 5 de las familias incluidas contaban con al menos 2 hermanos diabéticos y en 2 de ellas los pacientes tuvieron datos sugestivos de SW y los otros 3 casos familiares fueron DMT1 no sindrómica. Se consideraron sólo el número de familias (casos índice), dado que los pacientes afectados en una sola familia presentan el mismo genotipo de *WFS1*.

b. Por criterios clínicos, se identificó una frecuencia de SW de 4.58% (6/131 casos índice), muy similar a la reportada en un estudio de 399 pacientes diabéticos tipo 1 de Líbano. En tal estudio, se observó una predominancia del síndrome de Wolfram en grupos endogámicos comparado con los no relacionados genéticamente (12% vs 0.4%) [Zalloua PA et al, 2008].

c. La edad mediana de inicio de DMT1 fue similar a otros estudios, sin embargo la aparición de síntomas del DIDMOAD fue muy variable. El caso 1, al momento de ser diagnosticado ya presentaba todas las características, pero éste se realizó hacia la tercera década de la vida. En el caso 2, la propósito fue detectada a mitad de la segunda década de la vida; presentaba una evolución más lenta, aunque durante su estudio pudo demostrarse que manifestaba todas las características incluyendo alteraciones vesicales con excepción de diabetes insípida. A diferencia de este caso, el caso número 3 manifestó inicialmente diabetes insípida adicionalmente a la DMT1 y posteriormente vejiga neurogénica, hidronefrosis y cataratas. El caso número 4, manifestaba todo el cuadro clínico, sin embargo también fue estudiado en su tercera década de la vida. La diabetes insípida también fue una de las primeras manifestaciones adicionales a la DMT1 en el caso que no pudo ser estudiado molecularmente. El paciente con atrofia óptica en la quinta década de la vida presentaba múltiples alteraciones oculares y complicaciones propias de la



DMT1, pero no se integraron otras características del DIDMOAD. Dado que el criterio de inclusión fue la DMT1, no pudimos detectar casos que hubieran iniciado la DMT1 posterior a alguna otra característica del DIDMOAD como se ha observado en otros reportes [De Heredia ML, 2013; Matsunaga K et al, 2014]. La atrofia óptica no se detectó en el 100% de los casos, probablemente por la edad de captura en algunos de nuestros casos, ya que se conoce una edad mediana de presentación en la segunda década de la vida [Barret TM and Bunday SE 1997].

- **Hallazgos moleculares del Estudio**

Las mutaciones identificadas en el gen *WFS1* fueron puntuales y de sentido equivocado en 2 casos y deleciones intragénicas cortas en 3 casos.

a. La **primera mutación** consiste en una transición de Guanina a Adenina (c.2611G>A) en el exón 8 y genera la sustitución de un aminoácido en el dominio carboxilo terminal en la proteína (p.V871M). Esta mutación no se ha descrito antes en el SW, aunque sí se había identificado en estado heterocigoto en casos de hipoacusia neurosensorial autosómica dominante [Young TL et al, 2001; Domenech E et al, 2002; Goncalves AC et al, 2014]. Dicha característica forma parte del espectro de SW y en estado heterocigoto se conoce como una de las causas de hipoacusia neurosensorial no sindromática (heterogeneidad alélica). De manera interesante, se han reportado casos de Diabetes tipo 2 y sordera asociados a mutaciones de *WFS1* en estado heterocigoto [Domenech E et al, 2002]. La naturaleza progresiva de la hipoacusia relacionada a este gen sugiere un papel de la *wolframina* en el mantenimiento de transducción del sonido más que del desarrollo y maduración de células cocleares; incluso podría ser razonable sugerir un papel en la presbiacusia, la cual afecta principalmente frecuencias altas, dado que en estadios tardíos del SW se observa progresión a hipoacusia en ese rango [Young TL et al, 2001]. Se ha

postulado que la progresividad de estas manifestaciones se debe a la degeneración de áreas específicas del SNC en este caso en núcleo ventricular coclear y colículo inferior [Besvalopa IN et al, 2001]. Los pacientes del presente estudio con esta mutación tenían hipoacusia sensorial grado superficial a medio, con riesgo, si la mutación se comporta como en otras poblaciones, de ser progresiva, [Young TL et al, 2001]. En esta familia se informó de una hermana de los afectados, fallecida por cardiopatía congénita a temprana edad. Este dato es de relevancia ya que se han reportado pacientes con SW y malformaciones cardíacas [Ganie MA et al, 2011; Medlej R et al, 2004]. Como se mencionó previamente, esta mutación no había sido descrita en el SW y las evidencias que se tomaron en cuenta para considerarla causa de la enfermedad en la familia 1 de nuestro estudio, fueron las siguientes:

i. Estado homocigoto en ambos hermanos afectados y heterocigoto en la madre (el padre, heterocigoto obligado, no pudo ser estudiado).

ii. En estado heterocigoto, la mutación ha sido asociada previamente a un fenotipo de hipoacusia, parte del espectro clínico del SW. Por lo tanto, es factible que en estado homocigoto que se asocie a un cuadro sindrómico como el mostrado por los pacientes.

iii. Los estudios de predicción in silico (programa Polyphen) de patogenicidad de esta mutación (datos no mostrados) indican que el cambio es deletéreo para la función de la proteína.

iv. La mutación no ha sido identificada en estado homocigoto en bases de datos de secuenciación de exoma en miles de controles sanos de diversos grupos étnicos, como Exac Browser, 1000 Genomas y Exome Variant Server.

b. **Segunda mutación.** Esta mutación (c.1080C>T) es del tipo puntual y de sentido equivocado, consiste por una transición C>T y ha sido reportada

previamente en pacientes franceses con SW [Chausseot A et al, 2011]. Predice un cambio de aminoácido en el dominio transmembranal de la *wolframina* (p.T361I). Los pacientes de nuestro estudio con esta mutación presentaban catarata sub-capsular posterior, hallazgo poco frecuente en el SW. Debe señalarse que se ha demostrado la expresión de *WFS1* durante el desarrollo del cristalino [Berry V et al, 2014] y que recientemente se identificaron mutaciones heterocigotas (dominantes) de *WFS1* como causa de cataratas no sindrómicas hereditarias [Berry V et al, 2014].

c. La **tercera mutación** corresponde al caso 3, sujeto en el que se caracterizaron dos mutaciones distintas en *WFS1* (heterocigosidad compuesta). La primera mutación (c.1525-1539del15), transmitida por el padre, fue reportada previamente en población Francesa [Chausseot A et al, 2011], Mexicana [Chacón-Camacho O et al, 2013] y Japonesa [Matsunaga K et al, 2014]. Esta mutación se observó también en el caso 4. Esta mutación origina una delección de 5 aminoácidos en la *wolframina*, sin corrimiento de la fase de lectura. Se ha sugerido que este tipo de mutaciones se asocian a una aparición más temprana de la enfermedad [Hansen, 2005]. La segunda mutación de este paciente (c.2643\_2646del), transmitida por la madre, origina un corrimiento del marco de lectura. La mutación origina una proteína 61 aminoácidos más larga que la proteína silvestre. Fue reportada previamente en población Brasileña [Gasparin MRR et al, 2009].

d. La **mutación del caso 4** fue c.1525-1539del15 (idéntica a la primera mutación del caso 3) y se identificó en estado heterocigoto. No se encontró otra mutación en región codificante de *WFS1*. Es interesante mencionar que se han descrito varios casos de SW en los que se ha identificado solo una mutación en *WFS1* y en tales casos se ha propuesto que la segunda mutación se localice en regiones no codificantes del gen (promotores, secuencias intrónicas profundas) o que la segunda mutación se encuentre en otro gen

(enfermedad digénica) [Chausseot A et al, 2014; Homa K et al, 2014]. Además de los datos de SW, el paciente con esta mutación presentó Vitiligo, anomalía que a nuestro conocimiento no ha sido asociada con anterioridad al SW y podría tratarse de un hallazgo fortuito.

e. En el caso 5 **no se determinaron mutaciones** en la región codificante del gen. Como ha sido sugerido previamente, en casos compatibles con fenotipo de SW y ausencia de mutaciones en *WFS1*, la mutación pudiera estar localizada en una región no codificante del gen [Chausseot A et al, 2014]; otras posibilidades son que este caso se deba a mutaciones en el gen *CISD2*, responsables del infrecuente segundo tipo de la enfermedad [Mozillo E et al, 2014] o bien que las características clínicas observadas en el paciente hayan concurrido de manera fortuita simulando el SW (fenocopia). La posibilidad de variantes en número de copias ha sido descartada [Matsunaga, 2014]. Otros casos similares de la literatura se han resuelto por medio de secuenciación de nueva generación de genoma completo o exoma completo [Lieber DS et al, 2012] y otros se han resuelto por tecnología de microarreglos [Chausseot A et al, 2014].

f. **Mutación recurrente** p. V509\_Y513 del. La presencia de una deleción común en los casos 3 y 4 junto con el antecedente de un reporte previo de esta mutación en otra familia mexicana [Chacón-Camacho O et al, 2013] sugieren un efecto fundador de esta mutación en México. Tal efecto se ha considerado en población española en la que se reportó una mutación recurrente (425ins16) y también se consideró este mecanismo [Gómez- Zaera M et al, 2001]. En nuestra cohorte se observó variabilidad fenotípica en estos 3 casos. Dos de ellos provenían de regiones cercanas del estado de México (85 km aproximadamente), mientras que el otro provenía del norte de Veracruz. No se descarta que estos casos pudieran estar relacionados. Se requerirían estudios de homocigosidad para demostrar este mecanismo [Sharon and

Banyan, 2015]. En la vasta información bibliográfica, no ha habido relación genotipo- fenotipo, sino expresión diferente con la misma mutación, lo cual supone genes modificadores [Sobhani M et al, 2013]. Es necesaria la genotipificación de grupos más amplios de pacientes con SW de nuestra población así como la comparación de polimorfismos intragénicos entre pacientes con la delección recurrente para confirmar si la delección p.V509\_Y513del es una mutación fundadora en nuestro país.

- **Limitaciones del estudio**

- a. Muestra. La población “diana” se obtuvo de la ciudad de México y la región metropolitana y es relativamente pequeña. Aunado a que se trataba de una población cautiva, puede haberse incurrido en un sesgo de “selección” de pacientes, ya que los pacientes estables no acuden frecuentemente a sesiones de seguimiento. Otro sesgo sistemático relacionado que se pudo presentar es el sesgo de “sub-representación” en el caso de los niños menores de 15 años que pudieran no haber manifestado aún las alteraciones asociadas a DMT1 [Hernández DB et al, 2000].

- b. Expediente. Es difícil que los expedientes sean uniformes en las diferentes instituciones (“sesgo de información”) por lo que pueden variar en la profundidad de la información necesaria para detectar esta enfermedad. Los pacientes con sospecha clínica fueron citados a valoración, pero no todos acudieron al llamado, por lo que puede originar sesgo de localización o búsqueda [Hernández-Avila M et al, 2000].

- c. Costo del estudio. En este caso fue apoyado por el laboratorio del IOCV y en segunda instancia por CONACYT y UNAM, sin embargo, estos recursos se dispusieron sólo con el fin de realizar este proyecto de investigación. Para un estudio en varios estados del país se requerirían fondos nacionales.

- **Propuesta de estudio más amplio y genotipificación**

- a. Se propone realizar estudios integrales en clínicas de DMT1 en todo el país que permitan detectar casos de SW, enlazados a través de una base nacional que permita calcular una prevalencia más específica como se ha hecho en otros países o consorcios (Unión europea, Reino unido, Estados Unidos, España).

## CONCLUSIONES

- En nuestra cohorte se identificó que aproximadamente 5% de los casos diagnosticados como DMTI eran realmente pacientes con SW. Esta frecuencia es similar a la observada en un estudio en Líbano, en la que se incluyeron mayoritariamente familias con consanguinidad en los padres.
- En el aspecto genotípico, la frecuencia de mutaciones en *WFS1* en pacientes con criterios clínicos de SW fue de 80% y se distribuyeron en la misma proporción mutaciones puntuales en sentido equivocado y las deleciones (50%). La mutación c.1525\_1539del pudiera considerarse una mutación frecuente en nuestra población.
- Se considera que el análisis clínico y genético de grandes grupos de pacientes con DMT1 de diferentes poblaciones, ayudará a estimar la frecuencia relativa de SW en DMT1 en distintas poblaciones.
- La diferenciación clínica temprana entre DMT1 y SW, permite un manejo adecuado de los pacientes al evitar las complicaciones crónicas derivadas del diagnóstico retrasado de las anomalías asociadas.

## REFERENCIAS

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* (2010); 33(Suppl 1): S62- S69.
2. WHO/NCD/NCS/99.2 Definition, diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1999. World Health Organization. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. American Diabetes Association. *Diabetes Care* (2010); 33, suppl1. S62-S69
3. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes- 2011. *Diabetes Care* (2011); 34(Suppl 1): S11-S61.
4. Springer SC, Silverstein J, Copeland K, Moore KR, Prazar GE, Raymer T, Shiffman RN, Thaker VV, Anderson M, Span SJ and Flinn SK. Management of Type 2 Diabetes Mellitus in Children and Adolescents. *Pediatrics* (2013); 131(2):e648-64.
5. SEARCH for Diabetes in Youth Study Group. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics* (2007); 118: 1510-8.
6. Fendler M, Borowiec M, Baranowska-Jazwiecka A, Szadkowska A, Skala-Zamorowska E, Deja G, Jarosz-Chobot P, Techmanska I, Bautembach-Minkowska J, Mysliwiec M, Zmyslowska A, Pietrzak I, Malecki MT, Mlynarski W. Prevalence of monogenic diabetes amongst Polish children after a nationwide screening campaign. *Diabetologia* (2012); 55:2631–2635
7. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 6th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013. <http://www.idf.org/diabetesatlas>
8. Pinhas-Hamiel O, Dolan LM, Daniels SR, Standiford D, Khoury PR, Zeitler P. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr* (1996); 128(5 Pt 1):608-15.



9. <http://fmdiabetes.org.mx/wp-content/uploads/2014/11/diabetes2013INEGI.pdf>
10. Waugh N, Royle N, Craigie I, Ho V, Pandit L, Ewings P, Adler A, Helms P and Sheldon C. Screening for cystic fibrosis-related diabetes: a systematic review. *Health Technology Assessment* (2012); 6 (24).
11. Soliman, A, DeSanctis V, Yassin M, Elalaily R, and Eldarsy N E. Continuous glucose monitoring system and new era of early diagnosis of diabetes in high risk groups. *Indian J Endocrinol Metab.* (2014); 18(3): 274–282.
12. Hwang JL, and Weiss RE. Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment. *Diabetes Metab Res Rev* (2014); 30(2):96-102.
13. Kono S, Miyajima H, Sugimoto M, Suzuki Y, Takahashi Y, and Hishida A. Stiff-person Syndrome Associated with Cerebellar Ataxia and High Glutamic Acid Decarboxylase Antibody Titer. *Intern Med* (2001); 40(9):968-71.
14. Bojesen A1, Høst C, and Gravholt CH. Klinefelter's syndrome, type 2 diabetes and the metabolic syndrome: the impact of body composition. *Mol Hum Reprod* (2010); 16(6):396-401.
15. Reddy PH. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS Spectr* (2009); 14(8 Suppl 7): 8–18.
16. Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What Is Gestational Diabetes? *Diabetes Care* (2007); 30(S2): S105-S11.
17. Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Ávila MA, Gaona B, Rebollar R, Hernández L. Prevalence and distribution of type 2 Diabetes mellitus in Mexican adult population. A probabilistic survey. *Salud Publica Mex* (2010); 52 (suppl 1):S19-S26.
18. Kussman M, Morine MJ, Hager J, Sonderegger B and Kaput J. Perspective: a systems approach to diabetes research. *Frontiers in Gen* (2013); 4:205.

19. Schwitzgebel VM. Many faces of monogenic diabetes. *J Diabetes Invest* (2014); 5(2): 121-133.
20. Manaviat MR, Rashidi M, Mohammadi SM. Wolfram Syndrome presenting with optic atrophy and diabetes mellitus: two case reports. *Cases J.* (2009); 2:9355.
21. Zmysłowska A, Borowiec M, Fichna P, Iwaniszewska B, Majkowska L, Pietrzak I, Szalecki M, Szypowska A, Mlynarski W. Delayed recognition of Wolfram syndrome frequently misdiagnosed as type 1 diabetes with early chronic complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (2014); 122(1):35-8.
22. Homa K, Stefański A, Zmysłowska A, Mołęda P, Bryśkiewicz ME, Majkowska L. False diagnosis of type 1 diabetes mellitus and its complications in Wolfram syndrome — is it the reason for the low number of reported cases of this abnormality?. (*Endokrynol Pol* (2014); 65 (5): 398–400.
23. Naderian G, Ashtari F, Nouri-Mahdavi K and Sajjadi V. A Case of Wolfram Syndrome. *J Ophthalmic Vis Res* (2010); 5(1): 53-56.
24. Slingerland A S. Monogenic diabetes in children and young adults: Challenges for researcher, clinician and patient. *Rev Endocr Metab Disord* (2006) 7:171–185.
25. Barret T G. Differential diagnosis of type 1 diabetes: which genetic syndromes need to be considered? *Pediatric Diabetes* (2007); 8 (suppl 6); 15-23.
26. Van Maldergem L, Magré J, Khallouf TE, Gedde-Dahl Jr T, Delépine M, Trygstad O, Seemanova E, Stephenson T, Albott C S, Bonnici F, Panz V R, Medina J-L, Bogalho P, Huet F, Savasta S, Verloes A, Robert J-J, Loret H, de Kerdanet M, Tubiana-Rufi N, Mégarbané A, Maassen J, Polak M, Lacombe D, Kahn C R, Silveira E L, D'Abronzio F H, Grigorescu F, Lathrop M, Capeau J, O'Rahilly S. Genotype-phenotype relationships in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Med genet* (2002); 39:722-733.
27. Johannson, S, Irgens H, Chudasama KK, Molnes J, Aerts J, Roque FS, Jonassen I, Levy S, Lima K, Knappskog PM, Bell GI, Molven A, Njølstad PR. Exome Sequencing and Genetic Testing for MODY. *PLoS ONE* (2012); 7(5):e38050.

28. Julier C and Nicolino M. Wolcott-Rallison syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* (2010); 5:29.
29. Porter JR, Barrett. TG. Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and b cell failure. *J Med Genet* (2005); 42:893–902.
30. Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* (1995);346(8988):145
31. Fraser F C and Gunn T. Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. *J Med Genet* (1977); 14:190-193.
32. Gunn T, Bortolussi R, Little JM, Andermann F, Fraser FC, Belmonte MM. Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, sensory nerve deafness, and diabetes insipidus--a syndrome. *J Pediatr* (1976); 89(4):565-70.
33. Lombardo F, Salzano G, Di Bella C, Aversa T, Pugliatti T, Cara S, Valenzise M, De Luca F, Rigoli L. Phenotypical and genotypical expression of Wolfram syndrome in 12 patients from a Sicilian district where this syndrome might not be so infrequent as generally expected. *J Endocrinol Invest* (2014); 37:195–202.
34. Zalloua P A, Azar ST, Delepine M, Makhoul NJ, Blanc H, Sanyoura M, Lavergne A, Stankov K, Lemainque A, Baz P and Julier C. *WFS1* mutations are frequent monogenic causes of juvenile-onset diabetes mellitus in Lebanon. *Hum Mol Genet* (2008);17(24):4012-21
35. Pilley SFJ and Thompson HS. Familial syndrome of diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness (didmoad) in childhood. *Brit J Ophthal* (1976); 60: 294-298.
36. Wolfram DJ, Wagner HP. Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clinic Proc* (1938);13:715-8
37. de Heredia ML, Clèries R, and Nunes V. Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genet Med* (2013); 15(7):497-506.

38. Lieber D S, Vafai SB, Horton LC, Slate NG, Liu S, Borowsky ML, Calvo SE, Schmahmann JD and Mootha VK. Atypical case of Wolfram syndrome revealed through targeted exome sequencing in a patient with suspected mitochondrial disease. *BMC Medical Genetics* (2012); 13:3.
39. Kinsley BT, Swift M, Dumont RH, Swift RG. Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care* (1995); 18(12):1566-70.
40. Casey J.A. Smith, BSC. Phenotype-Genotype Correlations in a Series of Wolfram Syndrome Families *Diabetes Care* (2004); 27:2003–2009.
41. Viswanathan V, Medempudi S, Kadiri M. Wolfram syndrome *J Assoc Physicians India*. (2008); 56:197-9.
42. Barrett TG and Bunday SE. Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* (1997); 34: 838-841.
43. Chausseot A, Bannwarth S, Rouzier C, Vialettes B, El Mkadem SA, Chabrol B, Cano A, Labauge P, and Paquis-Flucklinger V. Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Ann Neurol* (2011); 69: 501-508.
44. Bischoff AN, Reiersen AM, Buttlair A, Al-lozi A, Doty T, Marshall BA, Hershey T. Selective cognitive and psychiatric manifestations in Wolfram Syndrome. *Orphanet J Rare Dis* (2015); 10:66.
45. Hershey T, Lugar HM, Shimony JS, Rutlin J, Koller JM, Perantie DC, Paciorkowski AR, Eisenstein SA, Permutt MA. Early Brain Vulnerability in Wolfram Syndrome. *PLoS ONE* (2012); 7(7):e40604.
46. Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, Loiselet J, Permutt A, and Halaby G. Diabetes Mellitus and Optic Atrophy: A Study of Wolfram Syndrome in the Lebanese Population. *J Clin Endocrinol Metab* (2004); 89: 1656–1661
47. Esteban BG, and Gómez T FM. Clinical manifestations and diagnostic delay in Wolfram's syndrome. *Rev Clin Esp* (2006); 206(7):332-(7):3325.
48. Swift M and Swift RG. Wolframin mutations and hospitalization for psychiatric illness. *Mol Psych* (2005); 10:799-803.

49. Aluclu MU , Bahceci M, Tuzcu A, Arikan S, Gokalp D. A new mutation in *WFS1* gene (C.15221523delTA, Y508fsX421) may be responsible for early appearance of clinical features of Wolfram syndrome and suicidal behaviour. *Neuro Endocrinol Lett* (2006); 27(6):6914.
50. Al-Till M, Jarrah NS, Ajlouni KM. Ophthalmologic findings in fifteen patients with Wolfram syndrome. *Eur J Ophthalmol* (2002); 12(2):84-8.
51. Hoekel J, Chisholm SA, Al-Lozi A, Hershey T, Tychsen L. Ophthalmologic correlates of disease severity in children and adolescents with Wolfram syndrome. *J AAPOS*. (2014); 18(5):461-465.e1.
52. Chacón-Camacho O, Arce-Gonzalez R, Granillo-Alvarez M, Flores-Limas S, Ramírez M, Zenteno JC. Expansion of the clinical ocular spectrum of Wolfram Syndrome in a family carrying a novel *WFS1* gene deletion. *Ophthalmic Genet* (2013); 34(4):243-8.
53. Zmyslowska A, Malkowski B, Fendler W, Borowiec M, Antosik K, Gnys P, Baranska D, Mlynarski W. PECT Central Nervous System PET-CT Imaging Reveals Regional Impairments in Pediatric Patients with Wolfram Syndrome. *PLoS ONE* (2014); 9(12): e115605.
54. Köks S, Soomets U, Paya-Cano JL, Fernandes C, Luuk H, Plaas M, Terasmaa A, Tillmann V, Noormets K, Vasar E and Schalkwyk LC. *Wfs1* gene deletion causes growth retardation in mice and interferes with the growth hormone pathway. *Physiol Genomics* (2009); 37:249-259.
55. Hardy C, Khanim F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, Collier D, Kirk J, Polymeropoulos M, Latif F, Barrett T. Clinical and Molecular Genetic Analysis of 19 Wolfram Syndrome Kindreds Demonstrating a Wide Spectrum of Mutations in *WFS1*. *Am J Hum Genet* (1999); 65:1279–1290.
56. Gasparin MR, Crispim F, Paula SL, Freire MBS, Dalbosco IS, Manna TD, Salles JEN, Gasparin F, Guedes A, Marcantonio JM, Gambini M, Salim CP and Moisés RS.

Identification of novel mutations of the *WFS1* gene in Brazilian patients with Wolfram syndrome. *Eur J of Endocr* (2009); 160: 309–316

57. Faccaro M and Gastaldi F. *Folia hered Path (Milano)* (1952); 2: 177.
58. Akinci A, Oner O, Aktas Z, Cetinkaya E, Aycan Z. Refractive errors and strabismus in children with laurence-moon-biedl syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* (2010); 47(1):26-8.
59. Waschbisch A, Volbers B, Struffert T, Hoyer J, Schwab S, Bardutzky J. Primary diagnosis of Wolfram syndrome in an adult patient--case report and description of a novel pathogenic mutation. *Neurol Sci* (2011); 300(1-2):191-3.
60. Borgna-Pignatti C, Marradi P, Pinelli L, Monetti N, Patrini C. Thiamine-responsive anemia in DIDMOAD syndrome. *J Pediatr* (1989); 114(3):405-10.
61. Newman NJ. Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. *Arch Neurol* (1993); 50(5):540-8.
62. Vilan A, Farias O and Campos MM. *Rev Neurol* (2009); 49 (4): 221-222.
63. Valéro R, Bannwarth S, Roman S, Paquis-Flucklinger V, Vialettes B. Autosomal dominant transmission of diabetes and congenital hearing impairment secondary to a missense mutation in the *WFS1* gene. *Diabet Med* (2008); 25(6):657-61.
64. Rendtorff ND, Lodahl M, Boulahbel H, Johansen IR, Pandya A, Welch KO, Norris VW, Arnos KS, Bitner- Glindzicz M, Emery SB, Mets MB, Fagerheim T, Eriksson K, Hansen L, Bruhn H, Möller C, Lindholm S, Ensgård S, Lesperance MM, and Tranebjærg1 Identification of p.A684V missense mutation in the *WFS1* gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *Am J Med Genet* (2011); 155A (6): 1298–1313.
65. Rotig A, Cormier V, Chatelain P, Francois R, Saudubray J-M, Rustin P, and Munnich A. Deletion of Mitochondrial DNA in a Case of Early-Onset Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, and Deafness (Wolfram Syndrome, MIM 222300). *J Clin Invest* (1993); 91:1095-1098.

66. Hofmann S, Bezold R, Jaksch M, Obermaier-Kusser B, Mertens S, Kaufhold P, Rabl W, Hecker W, Gerbitz KD. Wolfram (DIDMOAD) syndrome and Leber hereditary optic neuropathy (LHON) are associated with distinct mitochondrial DNA haplotypes. *Genomics* (1997); 39:8-18.
67. Amr S, Heisey C, Zhang M, Xia X-J, Shows KH, Ajlouni K, Pandya A, Satin LS, El-Shanti H, and Shiang R. A Homozygous Mutation in a Novel Zinc-Finger Protein, ERIS, Is Responsible for Wolfram Syndrome 2. *Am J Hum Genet* (2007); 81(4):673-83.
68. Mozillo E, Delvecchio M, Carella M, Grandone E, Palumbo P, Salina A, Aloï C, Buono P, Izzo A, D'Annunzio G, Vecchione G, Orrico A, Genesio R, Simonelli F and Franzese A. A novel *CISD2* intragenic deletion, optic neuropathy and platelet aggregation defect in Wolfram syndrome type 2. *BMC Med Genet*. (2014); 15:88.
69. Strom TM, Hörtnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD and Meitinger T. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* (1998); 7(13):2021-8.
70. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crock P, Rogers D, Mikuni M, Kumashiro H, Higashi K, Sobue G, Oka Y and Permutt AM. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* (1998); 20(2):143-8.
71. Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD and Bauer MF. Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the *WFS1* gene product. *Hum Mol Genet* (2003); 12(16):2003-12.
72. Gómez-Zaera M, Strom TM, Rodríguez B, Estivill X, Meitinger T, Nunes V. Presence of a major *WFS1* mutation in Spanish Wolfram syndrome pedigrees. *Mol Genet Metab* (2001); 72(1):72-81.

73. Hansen L, Eiberg H, Barrett T, Bek T, Kjærsgaard P, Tranebjærg L and Rosenberg T. Mutation analysis of the *WFS1* gene in seven Danish Wolfram syndrome families; four new mutations identified. *Eur J of Hum Genet* (2005); 13: 1275–1284.
74. Khanim F, Kirk J, Latif F, Barrett TG. *WFS1*/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum Mutat* (2001); 17(5):357-67.
75. Chausseot A, Rouzier C, Quere M, Plutino M, Ait-El-Mkadem S, Bannwarth S, Barth M, Dollfus H, Charles P, Nicolino M, Chabrol B, Vialettes B, Paquis-Flucklinger V. Mutation update and uncommon phenotypes in a French cohort of 96 patients with *WFS1*-related disorders. *Clin Genet* (2014); 87(5):430-9.
76. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F. *WFS1* Is a Novel Component of the Unfolded Protein Response and Maintains Homeostasis of the Endoplasmic Reticulum in Pancreatic Cells. *J Biol Chem* (2005); 280(47): 39609–39615.
77. Xu R, Xia B, Geng J, Shi J, Shi H, Yuan L, De W. Expression and localization of Wolfram syndrome 1 gene in the developing rat pancreas. *World J Gastroenterol* (2009); 15(43): 5425–5431.
78. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka y, Permutt MA, and Urano F. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* (2010); 120(3):744–755.
79. Schroeder, M. and Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* (2005) 74, 739–789
80. Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, Katagiri H, Maruyama Y, Oka Y. *WFS1* protein modulates the free  $Ca^{2+}$  concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 580 (2006): 5635–5640.
81. Hara T, Mahadevan J, Kanekura K, Hara M, Lu S, and Urano F. Calcium Efflux From the Endoplasmic Reticulum Leads to  $\beta$ Cell Death. *Endocrinology* (2014) ; 155(3): 758–768.



82. Fonseca SG, et al. *WFS1* protects  $\beta$ -cells against ER stress and, conversely, that chronic ER stress is caused by loss of function of *WFS1*. *J Biol Chem* (2005); 280(47):39609-39615.
83. Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M. Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* (2003); 278(52):52755-62.
84. Yamamoto H, Hofmann S, Hamasaki DI, Yamamoto H, Kreczmanski P, Schmitz C, Parel JM, Schmidt-Kastner R. Wolfram syndrome 1 (*WFS1*) protein expression in retinal ganglion cells and optic nerve glia of the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* (2006); 83(5):13036.
85. Rigoli L, Lombardo F, Di Bella C. Wolfram syndrome and *WFS1* gene. *Clin Genet* (2011); 79: 103–117
86. Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake Ch, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J-i and Oka Y. *WFS1*-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic  $\beta$ -cells. *Hum Mol Genet.* (2006); 15(10):1600-9.
87. Schmidt-Kastner R, Kreczmanski P, Preisinger M, Diederend R, Schmitzd Ch, Reisa D, Blanksb J, and Doreya CK. Expression of the diabetes risk gene wolframin in the human retina. *Exp Eye Res* (2009); 89(4): 568–574.
88. Takeda K, Kreczmanski P, Preisinger M, Diederend R, Schmitzd Ch, Reisa D, Blanksb J, and Doreya CK. *WFS1* (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* (2001); 10(5): 477-484.
89. Hilson J, Merchant S N, Adams JC and Joseph JT. Wolfram syndrome: a clinicopathologic correlation. *Acta Neuropathol* (2009); 118(3): 415–428.

90. Noormets K, Kõks S, Kavak A, Arend A, Aunapuu M, Keldrimaa A, Vasar E and Tillmann V. Male mice with deleted Wolframin (*Wfs1*) gene have reduced fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2009); 7:82.
91. Zenteno JC, Ruiz G, Pérez-Cano HJ, Camargo M. Familial Wolfram syndrome due to compound heterozygosity for two novel *WFS1* mutations. *Molecular Vision* (2008); 14:1353-1357
92. Cano A, Molines L, Valéro R, Simonin G, Paquis-Fluckinger V, Vialettes B. Microvascular Diabetes Complications in Wolfram Syndrome (Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, and Deafness [DIDMOAD]) *Diabetes Care* (2007); 30:2327–2330.
93. Rohayem J, Ehlers C, Wiedemann B, Holl R, Oexle K, Kordonouri O, Salzano G, Meissner T, Burger W, Schober E, Huebner A, Lee-Kirsch MA; Wolfram Syndrome Diabetes Writing Group. Diabetes and Neurodegeneration in Wolfram Syndrome; A multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care* (2011); 34:1503–1510
94. Besvalopa IN, Van Camp G, Bom SJH, Brown DJ, Cryns K, DE Wan AT, et al. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (*WFS1*) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet* (2001); 10(22):2501-8.
95. Fawcett KA, Wheeler E, Morris AP, Ricketts SL, Hallmans G, Rolandsson O, Daly A, Wasson J, Permutt A, Hattersley AT, Glaser B, Franks PW, McCarthy MI, Wareham NJ, Sandhu MS, and Barrosol. Detailed Investigation of the Role of Common and Low-Frequency *WFS1* Variants in Type 2 Diabetes Risk. *Diabetes* (2010); 59:741–746.
96. Cizza G, Brown R.J, and Rothe K.I. Rising incidence and challenges of childhood diabetes. A mini review. *J Endocrinol Invest* (2012); 35(5): 541
97. Häkli S, Kyövuori L, Luotonen M, Sorri M, Majamaa K. *WFS1* mutations in hearing-impaired children. *Intl J of Aud* (2014); 53: 446–451.
98. Philip R, Patidar P, Agarwal P, and Gupta KK. A young diabetic with suicidal risk: Rare disease with a rarer presentation. *Indian J Endocrinol Metab.* (2013); 17(5): 920–921.

99. Dains JE, Baurmann LC and Scheibel. Advanced Health Assessment & Clinical Diagnosis in Primary Care. (ebook) 14th ed. 2012. Elsevier Health Sciences.
100. NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos
101. Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H, Okuya S, Ohta S, Akiyama M, Taguchi A, Kora Y, Okayama N, Yamada Y, Wada Y, Amemiya S, Sugihara S, Nakao Y, Oka Y, Tanizawa Y. Wolfram Syndrome in the Japanese Population; Molecular Analysis of *WFS1* Gene and Characterization of Clinical Features. PLoS One (2014);9(9):e106906.
102. Marshall BA, Permutt MA, Paciorkowski AR, Hoekel J, Karzon R, Wasson J, Viehover A, White NH, Shimony JS, Manwaring L, Austin P, Hullar TE, Hershey T and the Washington University Wolfram Study Group. Phenotypic characteristics of early Wolfram Syndrome. Orph J of Rare Dis (2013): 8:64.
103. Euro- WABB Project. [www.euro-wabb.org/es/](http://www.euro-wabb.org/es/)
104. Wolfram Syndrome UK Support Group. [www.wolframsyndrome.co.uk](http://www.wolframsyndrome.co.uk)
105. Worldwide Society of Wolfram Syndrome Families. [www.wolframsyndrome.dom.wustl.edu](http://www.wolframsyndrome.dom.wustl.edu)
106. Asociación española para la ayuda e investigación de síndrome de Wolfram). [www.aswolfram.org](http://www.aswolfram.org)
107. Federación Mexicana de diabetes. [www.fmdiabetes.org.mx](http://www.fmdiabetes.org.mx)
108. Asociación Mexicana de diabetes. [www.amdiabetes.org](http://www.amdiabetes.org)
109. Sharon D and Banin E. Nonsyndromic retinitis pigmentosa is highly prevalent in the Jerusalem region with a high frequency of founder mutations. Molecular Vision 2015; 21:783-792.
110. Young TL, Ives E, Lynch E, Person R, Snool S, MacLaren L, Cator T, Griffin A, Fernandez B, Lee MK and King MC. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene. Hum Mol Genet (2001); 10(22):2509-14.

111. Domenech E, Gómez-Zaera M and Nunes V. *WFS1* mutations in Spanish patients with diabetes mellitus and deafness. *Eur J of Hum Genet* (2002); 10: 421 – 426
112. Goncalves AC, Matos TD, Simões-Teixeira HR, Pimenta Machado M, Simão M, Dias ÓP, Andrea M, Fialhoa G, Caria H. *WFS1* and non-syndromic low-frequency sensorineural hearing loss: A novel mutation in a Portuguese case. *Gene* 538 (2014) 288–291.
113. Ganie MA, Laway BA, Nisar S, Wani MM, Khurana ML, Ahmad F, Ahmed S, Gupta P, Ali I, Shabir I, Shadan A, Ahmed A, Tufail S. Presentation and clinical course of Wolfram (DIDMOAD) syndrome from North India. *Diabet Med* (2011); 11: 1337-42.
114. Berry V, et al. Wolfram gene (*WFS1*) mutation causes autosomal dominant congenital nuclear cataract in humans. *Eur J of Hum Genet* (2013); 21: 1356–1360.
115. Sobhani M, Tabatabaiefar MA, Rajab A, Kajbafzadeh AM, NooriDaloii MR. Significant expressivity of Wolfram syndrome: phenotypic assessment of two known and one novel mutation in the *WFS1* gene in three Iranian families. *Mol Biol Rep* (2014);41(11):7499-505.
116. Hernández D B., Velasco-Mondragón HE. Encuestas transversales. *Salud pública mex* (2000); 42(5): 447-455
117. Hernández-Avila M, Garrido F, Salazar-Martínez E. Sesgos en estudios epidemiológicos. *Salud pública mex* (2000); 42 (5): 438- 446.

## ANEXOS

- **Anexo I.** Instrumentos de Investigación (Hojas de recolección de datos)

Ficha de identificación				
Institución	Clínica de diabetes	Fecha	Nombre	Expediente
Edad	Fecha de nacimiento	Domicilio	Teléfono	Familiar responsable
Fecha de ingreso al Hospital/Asociación de Diabetes	Niveles de péptido C	Fecha de toma de péptido C	Fecha de última valoración oftalmológica	Edad de inicio DM1
Edad de inicio atrofia óptica	Edad de inicio diabetes insípida	Edad de inicio de trastornos vesicales	Edad de inicio Sordera	Status psicológico
Alteraciones neurológicas	Consanguinidad (si/no)	Familiares afectados con DM1	Familiares afectados con DM2	
Fecha de consentimiento /Asentimiento informado	Toma de muestra	Fecha de extracción de DNA	Fecha de PCR	Fecha de secuenciación

**Anexo I-a.** Datos clínicos concentrados

Evaluación inicial		Exploración oftalmológica integral			Estudios paraclínicos				Conclusión
Oftalmoscopia directa	Oftalmoscopia indirecta	Agudeza visual	Segmento anterior	Tonometría	Campimetría	Potenciales visuales	Electroretinograma	OCT (tomografía de coherencia óptica)	

**Anexo I-b.** Estudio oftalmológico integral

Número de caso	Número de banco	Posición nucleotídica	Posición aminoácido	Cambio de aminoácido	Dominio de la proteína	Conclusiones		
						Homocigoto	Heterocigoto	Heterocigoto compuesto

**Anexo I-c.** Hoja de captura del estudio molecular

- **Anexo II.** Carta de consentimiento informado del protocolo

**Título** del protocolo

FRECUENCIA DE SÍNDROME DE WOLFRAM EN UN GRUPO DE DIABÉTICOS TIPO 1, CON DETERMINACIÓN DE SU ESPECTRO MUTACIONAL

Investigador principal: MIC María Esther Blanco Aguirre

Lugar en donde se realizará el estudio clínico:

---

Lugar en donde se realizará el estudio molecular: Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Nombre del paciente

---

Padre o tutor:

---

### **Justificación**

Se desconoce la proporción de casos con SW dentro del grupo de pacientes diabéticos tipo 1. Aunque aún no existe tratamiento curativo para esta enfermedad, podría limitarse el daño en algunos aspectos de la enfermedad, así como proporcionar información de la forma en que se hereda la enfermedad

**El objetivo del estudio es** determinar la presencia o ausencia de atrofia óptica en el paciente diabético tipo 1 y otras alteraciones clínicas que establecen el diagnóstico clínico de SW y confirmarlo mediante estudios moleculares.



**Procedimiento:**

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos, antecedentes familiares, antecedentes médicos, y se realizará revisión del fondo de ojo, mediante dilatación de la pupila con medicamentos y en caso necesario, toma de muestra de saliva para DNA a fin de realizar el estudio molecular.

**Molestias o riesgos asociados con el estudio**

Este estudio consta de las siguientes fases:

La primera implica realización de árbol genealógico y aplicación de gotas oftálmicas para dilatación de la pupila y exploración de fondo de ojo

Si usted presenta dos o más características de SW, pasará a la siguiente fase

La segunda parte del estudio consistirá en toma de muestra de saliva con hisopo. Esto no dejará molestia alguna, sólo una leve sensación del suave raspado. Si es mayor de 15 años, se tomará una muestra de 5 ml de sangre periférica tomada en forma habitual del pliegue interno del brazo.

Puede haber efectos secundarios por la aplicación de las gotas oftálmicas, lo cual consiste en visión borrosa que se revierte en un plazo máximo de 4 a 6 horas, aunque se ha reportado en algunos pacientes de hasta 24 horas. Puede haber alteraciones del comportamiento. En algunos casos puede presentarse aumento de la presión intraocular, taquicardia, dolor de cabeza, comezón, alergia. Pueden existir otras reacciones que nosotros desconozcamos. En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, favor de acudir al Instituto de Oftalmología al área de urgencias.

En cuanto a la toma de muestra de saliva, sólo percibirá la sensación del “raspado” mediante un algodón del hisopo la cual desaparecerá en unos segundos.

Si se toma muestra de sangre periférica, se ocasionará molestia mínima por la punción, la cual desaparece en algunos minutos.

### **Beneficios** que puede obtener del estudio

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que se han diagnosticado complicaciones de la enfermedad que se han manejado limitando el daño renal por ejemplo. Con este estudio conocerá de manera precisa si usted padece SW y no sólo Diabetes Mellitus tipo 1. Si es el caso, podrá conocer cómo se hereda esta enfermedad.

Este estudio permitirá que en un futuro pueda encontrarse tratamiento para la enfermedad no disponible actualmente

### **Aclaraciones:**

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria
- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos y beneficios.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- Toda la información obtenida en este estudio será confidencial y los resultados se entregarán únicamente a usted. Las muestras tomadas llevarán un número codificado en lugar de su nombre y sólo serán utilizadas para el objetivo de la investigación. Su nombre se conservará en anonimato.

- El investigador tendrá la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- No recibirá pago por su participación
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (firma)**

Yo, \_\_\_\_\_  
he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación en la etapa 1 \_\_\_\_ (si/no) y en la etapa 2 \_\_\_\_ (si/no). Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante o del padre o tutor

\_\_\_\_\_  
Fecha

Domicilio \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Testigo 1:  
\_\_\_\_\_  
Nombre Parentesco Fecha

Domicilio \_\_\_\_\_

No. Telefónico: \_\_\_\_\_

Testigo 2  
\_\_\_\_\_  
Nombre Parentesco Fecha

Domicilio \_\_\_\_\_

No. Telefónico: \_\_\_\_\_

Responsiva del Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
Nombre del investigador

\_\_\_\_\_  
No. Telefónico

\_\_\_\_\_  
correo electrónico

Responsiva del investigador:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio, sus apartados, riesgos y beneficios potenciales y la familia consiente en participar por medio de sus firmas.

\_\_\_\_\_  
(Investigador principal o investigador suplente o investigador externo)

Fecha: \_\_\_\_\_

## ASENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIO GENÉTICO.

Título del estudio: FRECUENCIA DE SÍNDROME DE WOLFRAM EN UN GRUPO DE DIABÉTICOS TIPO 1 Y DETERMINACIÓN DE SU ESPECTRO MUTACIONAL

INFORMACIÓN: El síndrome de Wolfram es una enfermedad genética rara, en la cual se padece de diabetes mellitus tipo 1 y dificultades visuales a temprana edad, además de otras alteraciones como problemas urinarios, sordera, problemas de la marcha y de la conducta.

Ya que has sido diagnosticado con DIABETES MELLITUS TIPO 1, se solicita tu participación en este proyecto de investigación cuyo objetivo principal es establecer la frecuencia de síndrome de Wolfram en un grupo de sujetos con Diabetes Mellitus tipo 1 y determinar la causa genética de tu enfermedad. Los genes son estructuras que se encuentran en todo ser vivo y que determinan sus características físicas, existen enfermedades determinadas genéticamente, como el síndrome de Wolfram.

En este estudio participa el Departamento de Endocrinología del Hospital \_\_\_\_\_ y la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación "Conde de Valenciana" Institución de Asistencia Privada (I.A.P). Ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital \_\_\_\_\_ y por los comités correspondientes así como de Bioseguridad del Instituto de Oftalmología Fundación "Conde de Valenciana", IAP.

Es posible que de tu participación en este estudio, no obtengas un beneficio directo. Sin embargo, sabrías si padeces de una enfermedad con otras alteraciones adicionales a la diabetes mellitus tipo 1, de manera que se establecería un tratamiento por otras especialidades adicionales al que se ofrece actualmente y contribuirás igualmente a un mejor conocimiento de los médicos que podrán mejorar el manejo de esta enfermedad.

Tu participación es totalmente voluntaria y si decides no participar, recibirás igualmente que hasta ahorita, todos los cuidados médicos que precises y la relación con el equipo médico que te atiende no se verá afectada.

Si decides participar, el estudio tendrá dos etapas.

Etapas 1:

En la primera, realizaremos un ARBOL GENEALOGICO, para recabar información de la salud de tus familiares que pudiera estar relacionada con tu padecimiento y esta información será confidencial y no se revelarán datos personales. También se realizará una revisión oftalmológica (en caso de no haberse realizado en los últimos 6 meses) dirigida para encontrar o descartar cierta alteración del fondo de ojo.

Se te solicita tu consentimiento para que se realice esta valoración.

En su caso, tendrán que aplicarse unas gotas oftálmicas para dilatar tu pupila, lo cual puede arder un poco. De esta forma el oftalmólogo podrá realizar la exploración del fondo de ojo. A continuación tendrás visión borrosa por un lapso hasta de 4 horas y posteriormente volverá tu visión habitual. En caso contrario deberás acudir al servicio de urgencias del Hospital

\_\_\_\_\_

Yo.....

paciente de la clínica de diabetes del \_\_\_\_\_, declaro bajo

mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar en este estudio genético.

Se me ha entregado una copia de este asentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas y todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis datos con un número codificado.

Soy libre de retirarme del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre nuestro tratamiento médico. Tras ello se procederá a la destrucción de nuestra información. Entiendo que el objetivo del estudio genealógico y oftalmológico es confirmar o descartar el diagnóstico clínico de SÍNDROME DE WOLFRAM para el manejo adecuado de mi salud, por lo que dicha información se me comunicará cuando sea terminado el estudio.

Acepto \_\_\_\_\_ No acepto \_\_\_\_\_ que se realicen los estudios genéticos referentes al punto I.

Consiento y otorgo mi asentimiento en participar voluntariamente en el(los) apartado(s) marcado(s) de este estudio genético.



Responsiva del investigador:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio, sus apartados, riesgos y beneficios potenciales y la familia consiente en participar por medio de sus firmas.

\_\_\_\_\_  
(Investigador principal o investigador suplente  
o investigador externo)

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma del padre*

\_\_\_\_\_  
*Nombre firma de la madre*

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma del hijo (1)*

\_\_\_\_\_  
*Nombre firma del hijo (2)*

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma del testigo 1*

\_\_\_\_\_  
*Nombre y firma de testigo 2*

*Dirección:* \_\_\_\_\_ *Dirección:* \_\_\_\_\_

*Teléfono* \_\_\_\_\_ *Teléfono* \_\_\_\_\_

Segunda etapa:

Si presentas anomalías pasarás a la segunda etapa. En esta etapa, se te extraerá una muestra de mucosa oral, mediante un “tallado” de la parte interna de la boca con un cepillito, preparado para ello, el cual no creará ni dejará ninguna molestia y será utilizada para obtener tu ADN.

El ADN es un elemento que está presente en todas tus células porque lo has recibido de tus padres y lleva un código en forma de “genes” que determina tus características físicas personales como el color de ojos, de piel, etc. Las diferencias dentro de un gen que se manifiestan como enfermedad se conocen como “mutaciones”.

Se te solicita tu consentimiento para que con la muestra de saliva, se hagan los procedimientos especificados en los siguientes puntos:

1. Que en el ADN de tu muestra se estudie el gen *WFS1* relacionado con el probable síndrome de Wolfram que ha sido sospechado clínicamente

Esta muestra será utilizada única y exclusivamente para este diagnóstico. Tu muestra será almacenada con un número codificado en la unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana”, IAP y únicamente los investigadores directamente involucrados conocerán su identidad. Existe el compromiso de destruir la muestra, una vez determinado su diagnóstico.

Si estás de acuerdo, deberás otorgar tu asentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio genético aceptas y firmando este documento, antes de la obtención del ADN.

#### ASENTIMIENTO INFORMADO. Firma

Yo .....  
paciente de la clínica de diabetes del Hospital \_\_\_\_\_, declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar en este estudio genético.

Se me ha entregado una copia de este ASENTIMIENTO informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas y todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán las muestras de saliva y de ADN con un número codificado.

Soy libre de retirarme del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.

Entiendo que el objetivo del estudio genético es confirmar el diagnóstico clínico de SÍNDROME DE WOLFRAM para el manejo adecuado de mi padecimiento, por lo que dicha información se me comunicará cuando sea terminado el estudio.

Acepto \_\_\_\_\_ No acepto \_\_\_\_\_ que se realicen los estudios genéticos referentes al punto I.

Consiento en participar voluntariamente en el(los) apartado(s) marcado(s) de este estudio genético.

_____	_____
<i>Nombre y firma del padre</i>	<i>Nombre firma de la madre</i>
_____	_____
<i>Nombre y firma del hijo (1)</i>	<i>Nombre firma del hijo (2)</i>
_____	_____
<i>Nombre y firma del testigo 1</i>	<i>Nombre y firma de testigo 2</i>

Dirección: \_\_\_\_\_

Responsiva del investigador:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio, sus apartados, riesgos y beneficios potenciales y la familia consiente en participar por medio de sus firmas.

\_\_\_\_\_  
(Investigador principal o investigador suplente o investigador externo)

Fecha: \_\_\_\_\_