

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGIA**



**CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO EN EL SINDROME  
DE USHER: DETERMINACION DE UN MODELO DE ESTUDIO  
EN DOS INFORMATIVAS FAMILIAS COLOMBIANAS**

**CLAUDIA PATRICIA GONZALEZ CARREÑO**

Bogotá, D.C.  
Mayo de 2003

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGIA**



**CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO EN EL SINDROME DE USHER:  
DETERMINACION DE UN MODELO DE ESTUDIO EN DOS  
INFORMATIVAS FAMILIAS COLOMBIANAS**

**CLAUDIA PATRICIA GONZALEZ CARREÑO**

**TRABAJO DE GRADO**  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de

**BIOLOGA**

Directora: MARTALUCIA TAMAYO F. MD., MSc.

Co- Directora: DIANA ALVAREZ GONZALEZ, MSc.

Bogotá, D.C.  
Mayo de 2003

***NOTA DE ADVERTENCIA***

“ La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946.

**CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO EN EL SINDROME  
DE USHER: DETERMINACION DE UN MODELO DE ESTUDIO  
EN DOS INFORMATIVAS FAMILIAS COLOMBIANAS**

**CLAUDIA PATRICIA GONZALEZ CARREÑO**

**APROBADO**

---

MARTALUCIA TAMAYO F. MD., MSc.  
Directora del Trabajo de Grado

---

DIANA ALVAREZ GONZALEZ, MSc  
Co- Directora

---

JUAN MANUEL GARCIA G., MD.

Jurado

---

IGNACIO BRICEÑO B., MD., PH.D.

Jurado

**CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO EN EL SINDROME  
DE USHER: DETERMINACION DE UN MODELO DE ESTUDIO  
EN DOS INFORMATIVAS FAMILIAS COLOMBIANAS**

**CLAUDIA PATRICIA GONZALEZ CARREÑO**

---

ANGELA UMAÑA, M. Phil.  
Decano Académico  
Facultad de Ciencias Básicas

---

LUZ MERCEDES SANTAMARIA, MSc  
Directora Carrera de Biología  
Facultad de Ciencias Básicas

## FORMATO DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
<b>GONZALEZ CARREÑO</b>	<b>CLAUDIA PATRICIA</b>

DIRECTOR (ES)

Apellidos	Nombres
<b>TAMAYO FERNÁNDEZ</b>	<b>MARTALUCIA</b>

ASESOR (ES) O CODIRECTOR

Apellidos	Nombres
<b>ALVAREZ GONZALEZ</b>	<b>DIANA</b>

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: **BIOLOGA**

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:

**CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO EN EL SINDROME DE USHER:  
DETERMINACION DE UN MODELO DE ESTUDIO EN DOS  
INFORMATIVAS FAMILIAS COLOMBIANAS .**

SUBTÍTULO DEL TRABAJO:

---

FACULTAD: CIENCIAS BASICAS

PROGRAMA: Carrera  Especialización  Maestría   
Doctorado

NOMBRE DEL PROGRAMA: BIOLOGÍA

CIUDAD: BOGOTA AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: 2003

NÚMERO DE PÁGINAS: 110

TIPO DE ILUSTRACIONES:

- Ilustraciones
- Mapas
- Retratos
- X Tablas, gráficos y diagramas
- Planos
- Láminas
- Fotografías

MATERIAL ANEXO (VÍdeo, audio, multimedia o producción electrónica):

**Duración del audiovisual:** \_\_\_\_\_ **Minutos.**

Número de casetes de vídeo: \_\_\_\_\_ Formato: VHS \_\_\_ Beta Max \_\_\_ ¾ \_\_\_

Beta Cam \_\_\_ Mini DV \_\_\_ DV Cam \_\_\_ DVC Pro \_\_\_ Vídeo 8 \_\_\_ Hi 8 \_\_\_

Otro. Cual? \_\_\_\_\_

Sistema: Americano NTSC \_\_\_\_\_ Europeo PAL \_\_\_\_\_ SECAM \_\_\_\_\_

Número de casetes de audio: \_\_\_\_\_

Número de archivos dentro del CD (En caso de incluirse un CD-ROM diferente al trabajo de grado: \_\_\_\_\_

## DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES.

Síndrome de Usher, Sordo-ceguera, Modelo de Estudio, Heterogeneidad Clínica, Heterogeneidad Genética, Evaluación Clínica, Análisis Moleculares, Correlación Fenotipo-Genotipo.

## RESUMEN DEL CONTENIDO

El Síndrome de Usher comprende un grupo de desórdenes autosómicos recesivos caracterizados por sordera congénita neurosensorial, disfunción vestibular y Retinitis Pigmentosa progresiva (RP). El Síndrome es clínica y genéticamente heterogéneo.

Con este trabajo se propuso establecer y evaluar un modelo de abordaje para el estudio del Síndrome de Usher, a nivel clínico y molecular. Este modelo o estrategia abarca el diagnóstico clínico de los pacientes, establecimiento y confirmación del subtipo mediante estudios moleculares y posterior correlación genotipo- fenotipo. De esta forma, se determinó en 6 personas afectadas de Síndrome de Usher y pertenecientes a 2 familias colombianas informativas, a qué tipo clínico pertenece cada una de ellas y se definió a nivel molecular, mediante análisis de ligamiento génico, el subtipo al que está asociado cada individuo. Posteriormente se estableció una correlación fenotipo-genotipo.

Con todo esto, se pudo confirmar la sospecha clínica y clasificar a cada afectado (en tipos y subtipos), así como también definir el estatus de portador en los familiares del afectado. Se encontró una correspondencia entre los datos clínicos y moleculares para cada familia. Con Síndrome de Usher. Los datos clínicos muestran que la familia 1 pertenece al tipo I y los resultados moleculares muestran ligamiento al subtipo USH1B. En cuanto a la Familia II, el tipo clínico es II y el subtipo molecular USH2B.

Se propone esta estrategia como el modelo ideal de estudio en enfermedades con una alta heterogeneidad clínica y genética como el Síndrome de Usher.

*A mi mamá por todo su amor, sabios consejos y por creer en mí incondicionalmente*

*A mi papá y a Conchita, por su legado y porque siempre serán una fuente de  
inspiración.*

*A la Dra. Martalucía por su apoyo, orientación y por la oportunidad que me brindó*

*A mi familia y amigos por toda su colaboración y solidaridad*

## **AGRADECIMIENTOS**

Un especial reconocimiento a todos los pacientes y sus familias, sin cuya valiosa participación, no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana, por el apoyo logístico en la parte de laboratorio. A la Fundación Oftalmológica Nacional por la realización de los exámenes visuales en los afectados y en especial al Dr. David Medina, por su colaboración en el diagnóstico de la Retinitis Pigmentosa. Al Departamento de Otorrinolaringología del Hospital San Ignacio, por la realización de la Audiometrías en los afectados. Al Dr. William Kimberling y su equipo de colaboradores del Boys Town National Research Hospital por su ayuda en la realización de la genotipificación de las familias.

A Diana Álvarez González por aceptar la co-dirección de este trabajo. A todo el grupo del Programa Visual y Auditivo por ofrecerme su apoyo y amistad. A la Dra. Martalucía Tamayo por su apoyo y por brindarme la oportunidad de trabajar en el Síndrome de Usher. A Sandra y Elizabeth Robles por su colaboración en los aspectos técnicos de la elaboración del manuscrito.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEORICO .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. AUDICION Y FUNCION VESTIBULAR .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Estructura del Oído .....	4
2.1.2. Función Vestibular .....	6
<b>2.2. LA VISION.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Estructura del Ojo .....	9
<b>2.3. BASES TEORICAS DEL SINDROME DE USHER.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Aspectos Básicos de la Sordera y la Retinitis Pigmentosa.....	13
2.3.2. Incidencia del Síndrome de Usher .....	14
2.3.3. Heterogeneidad Clínica y Genética del Síndrome de Usher .....	15
<b>2.4. ASPECTOS CLINICOS DEL SINDROME DE USHER .....</b>	<b>17</b>
2.4.1. Descripción Clínica y Alteraciones Presentes en el Síndrome de Usher	17
• <i>Alteraciones Visuales</i> .....	17
• <i>Alteraciones Audiológicas y Vestibulares</i> .....	17
• <i>Alteraciones Neurológicas y Psiquiátricas</i> .....	18
2.4.2. Diagnóstico del Síndrome de Usher .....	19
2.4.2.1. Evaluación Genética .....	19
2.4.2.2. Evaluación Oftalmológica.....	20
2.4.2.3. Evaluación Audiológica y Vestibular .....	22
2.4.2.4. Criterios para la Clasificación Fenotípica .....	23
<b>2.5. ASPECTOS GENOTÍPICOS DEL SÍNDROME DE USHER.....</b>	<b>24</b>
2.5.1. Síndrome de Usher tipo I.....	24
2.5.2. Síndrome de Usher Tipo II.....	29
2.5.3. Síndrome de Usher Tipo III .....	31
<b>2.6. BASES TEORICAS DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES .....</b>	<b>32</b>
2.6.1. Análisis de Ligamiento Génico.....	32
2.6.2. Secuenciación.....	34

<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2. POBLACION OBJETO DE ESTUDIO.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3. VALORACION FENOTIPICA.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.1. Evaluación Oftalmológica .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2. Evaluación Audiológica y Vestibular .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.3. Evaluación Clínico-Genética .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4. VALORACIÓN GENOTIPICA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.1. Toma de Muestras.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.2. Extracción de DNA .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.3. Estudios de Ligamiento Génico .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.3. Detección de Mutaciones .....</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. ESTUDIOS FAMILIARES.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2. HALLAZGOS FENOTIPICOS- EVALUACION CLINICA.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2.1. FAMILIA 1 .....</b>	<b>45</b>
5.2.1.1. Antecedentes Personales .....	45
5.2.1.2. Examen Oftalmológico .....	48
5.2.1.3. Evaluación Audiológica y Vestibular .....	50
5.2.1.4. Evaluación Neurológica:.....	50
5.2.1.5. Clasificación Fenotípica de la Familia 1 .....	52
<b>5.2.2. FAMILIA 2 .....</b>	<b>53</b>
5.2.2.1. Antecedentes Personales .....	53
5.2.2.2. Examen Oftalmológico .....	53
5.2.2.3. Evaluación Audiológica y Vestibular .....	56
5.2.2.4. Evaluación Neurológica.....	57
5.2.2.5. Clasificación Fenotípica de la Familia 2.....	58
<b>5.3. HALLAZGOS GENOTIPICOS- ESTUDIOS MOLECULARES .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.1. FAMILIA 1 .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.2. FAMILIA 2 .....</b>	<b>64</b>

<b>5.4. CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>6.1. HALLAZGOS FENOTIPICOS.....</b>	<b>68</b>
<b>6.2. HALLAZGOS GENOTÍPICOS .....</b>	<b>70</b>
<b>6.3. CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO .....</b>	<b>73</b>
<b>6.4. DETEMINACION DE UN MODELO DE ESTUDIO .....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Heterogeneidad Clínica y Genética del Síndrome de Usher.....	16
<b>Tabla 2.</b> Marcadores utilizados para el análisis de Ligamiento en Síndrome de Usher .....	42
<b>Tabla 3.</b> Marcadores para Análisis de Ligamiento a USH1B (MYO7A) .....	43
<b>Tabla 4.</b> Marcadores para Análisis de Ligamiento a USH2A .....	43
<b>Tabla 5.</b> Caracterización Fenotípica y Diagnóstico Clínico de las dos Familias .....	59
<b>Tabla 6.</b> Caracterización Genotípica y Determinación del Subtipo en la Familia 1 ..	61
<b>Tabla 7.</b> Caracterización Genotípica y Determinación del Subtipo en la Familia 2 ..	64
<b>Tabla 8.</b> CORRELACION FENOTIPO –GENOTIPO .....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del Oído .....	4
Figura 2. Estructura de la Cóclea. ....	5
Figura 3. Sistema Vestibular: .....	8
Figura 4. Estructura del Ojo. ....	9
Figura 5. Organización Estructural de la Retina. ....	10
Figura 6. Diagrama esquemático de un bastón retiniano .....	12
Figura 7. Electrorretinograma .....	21
Figura 8. Estructura del gen MYO7A. ....	27
Figura 9. Estructura del Gen USH2A. ....	30
Figura 10. Arbol Genealógico de la Familia 1 .....	46
Figura 11. Arbol Genealógico de la Familia 2.....	47
Figura 12. Fondo de Ojo de un afectado de la Familia 1. ....	49
Figura 13. Audiometría de dos afectados de la Familia 1 .....	51
Figura 14. Fondo de Ojo. Retinitis Pigmentosa Típica de una mujer afectada de la familia 2. ....	54
Figura 15. ERG. Mujer afectada, familia 2.....	55
Figura 16. Audiometría de dos mujeres afectadas de la Familia 2 .....	56
Figura 17. Localización de los marcadores para el cromosoma 1q. ....	62
Figura 18. Resultados de Haplotipos Familia 1. ....	63
Figura 19. Resultados de Haplotipos Familia 2. ....	65

## RESUMEN

El Síndrome de Usher comprende un grupo de desórdenes autosómicos recesivos caracterizados por sordera congénita neurosensorial, disfunción vestibular y Retinitis Pigmentosa progresiva (RP); afecta a un amplio segmento de la población global y es la principal causa de sordo-ceguera en el mundo. El Síndrome es clínica y genéticamente heterogéneo.

Con este trabajo se propuso establecer y evaluar un modelo de abordaje para el estudio del Síndrome de Usher, a nivel clínico y molecular. Este modelo o estrategia abarca el diagnóstico clínico de los pacientes, establecimiento y confirmación del subtipo mediante estudios moleculares y posterior correlación genotipo- fenotipo. De esta forma, se determinó en 6 personas afectadas de Síndrome de Usher y pertenecientes a 2 familias colombianas informativas, a qué tipo clínico pertenece cada una de ellas y se definió a nivel molecular, mediante análisis de ligamiento génico, el subtipo al que está asociado cada individuo. Posteriormente se estableció una correlación fenotipo-genotipo.

Con todo esto, se pudo confirmar la sospecha clínica y clasificar a cada afectado (en tipos y subtipos), así como también definir el estatus de portador en los familiares del afectado. Se encontró una correspondencia entre los datos clínicos y moleculares para cada familia. Con Síndrome de Usher. Los datos clínicos muestran que la familia 1 pertenece al tipo I y los resultados moleculares muestran ligamiento al subtipo USH1B. En cuanto a la Familia II, el tipo clínico es II y el subtipo molecular USH2B.

Se propone esta estrategia como el modelo ideal de estudio en enfermedades con una alta heterogeneidad clínica y genética como el Síndrome de Usher.

**Palabras Clave:** Síndrome de Usher, Sordo-ceguera, Modelo de Estudio, Heterogeneidad Clínica, Heterogeneidad Genética, Evaluación Clínica, Análisis Moleculares, Correlación Fenotipo-Genotipo.

## ABSTRACT

Usher syndrome (USH) is comprised of a group of autosomal recessive disorders characterized by congenital sensorineural hearing loss, vestibular dysfunction, and progressive retinitis pigmentosa (RP). Usher syndrome affects a large segment of the global population and it is the foremost cause of combined blind/deafness in the world. The syndrome is clinically and genetically heterogeneous.

The purpose of this research is to establish and evaluate a model for the study of Usher Syndrome at a clinical and molecular level. This model or strategy includes the clinical diagnosis of patients, determination of subtype by means of molecular studies and posterior phenotype-genotype correlation. In this way, the clinical type was determined in 6 affected USH individuals, belonging to 2 informative Colombian families and the subtype to which was associated each individual was defined at a molecular level, using genetic linkage. Finally, a phenotype-genotype correlation was established.

With all this, it was possible to confirm the clinical diagnosis and to classify each affected individual (in types and subtypes); also to define the carrier status in the affected relatives. A relation between the clinical and molecular information for each family with Usher Syndrome was found.

Clinical findings show that Family 1 belongs to USH Type I and the molecular results show genetic linkage to subtype USH1B. For Family 2, the clinical type is II and the molecular subtype is USH2B.

This strategy is proposed as the ideal model for studying diseases with a high clinical and genetic heterogeneity as Usher Syndrome.

**Key Words:** Usher Syndrome, Model of Study, Clinical and Genetic Heterogeneity, Clinical Evaluation, Molecular Analysis, Phenotype-Genotype Correlation

## 1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Usher comprende un grupo de desórdenes autosómicos recesivos caracterizados por sordera congénita neurosensorial, disfunción vestibular y Retinitis Pigmentosa progresiva (RP) (Kimberling, 1995). Von Graefe (1858) fue el primero en reconocer la ocurrencia simultánea de sordera y Retinitis Pigmentosa, sin embargo, el síndrome recibió su nombre por el oftalmólogo inglés Usher, quien fue el primero en reconocer su naturaleza hereditaria.

El Síndrome de Usher afecta a un amplio segmento de la población global y es la principal causa de sordo-ceguera en el mundo. La frecuencia del Síndrome de Usher ha sido estimada en 3,2/100.000 habitantes en Colombia (Tamayo et al., 1991), constituyendo el 9,6% de la población sorda y el 10% de la población ciega (Tamayo et al., 1992).

El Síndrome es clínica y genéticamente heterogéneo. Clínicamente ha sido dividido en tres tipos, los cuales se diferencian uno de otro por la severidad y la progresión de la pérdida auditiva y por el grado del compromiso vestibular. Mientras que todos los pacientes con Síndrome de Usher desarrollan Retinitis Pigmentosa progresiva, el grado del deterioro auditivo y la presencia o ausencia de anomalías vestibulares difieren entre los tipos de Síndrome de Usher (Moller et al., 1989, Smith et al., 1992; Smith et al., 1994; Tamayo et al., 1991; Tamayo et al., 1996). El Síndrome de Usher tipo I (USH1) se caracteriza por sordera profunda congénita, ausencia de respuesta vestibular y aparición prepuberal de RP progresiva. El tipo II (USH2) por sordera congénita de moderada a severa, respuesta vestibular normal, con inicio de Retinitis Pigmentosa progresiva en la adolescencia. El tipo III (USH3) está caracterizado por pérdida auditiva progresiva, respuesta vestibular variable y aparición de Retinitis Pigmentosa durante la adolescencia.

En cuanto a la heterogeneidad genética, a cada uno de los tres tipos clínicos de Síndrome de Usher le corresponde uno o más subtipos genéticos, así: Al menos seis loci han sido identificados hasta el momento para los fenotipos correspondientes a USH1, dos loci para los fenotipos correspondientes a USH2 y un locus ha sido

identificado para el fenotipo correspondiente a USH3 (Kimberling et al., 1995; Eudy and Sumegi, 1999).

El Programa de Estudios Genéticos en Enfermedades Visuales y Auditivas del Instituto de Genética Humana, ha venido trabajando desde 1984, en varios aspectos de esta enfermedad en la población colombiana con limitaciones visuales y auditivas, que van desde los estudios epidemiológicos y clínicos hasta los sociales, logrando consolidar una sólida línea de investigación y obteniendo resultados notables para el conocimiento de esta entidad genética en nuestro país, aunque aún falta mucho camino por recorrer en cuanto a los estudios moleculares. A pesar de que los tres tipos clínicos en que se ha dividido el Síndrome de Usher son claramente diferenciables fenotípicamente, los subtipos que han sido reportados en la literatura mundial en los últimos años no han sido caracterizados desde el punto de vista auditivo, vestibular u oftalmológico y más aún, hace falta definir una exacta correlación con los hallazgos moleculares.

Con este trabajo se propuso establecer y evaluar un modelo de abordaje para el estudio del Síndrome de Usher, a nivel clínico y molecular. Este modelo o estrategia abarca el diagnóstico clínico de los pacientes, establecimiento y confirmación del subtipo mediante estudios moleculares y posterior correlación genotipo- fenotipo. De esta forma, se determinó en 6 personas afectadas de Síndrome de Usher y pertenecientes a 2 familias colombianas informativas, a qué tipo clínico pertenece cada una de ellas y se definió a nivel molecular, mediante análisis de ligamiento génico, el subtipo al que está asociado cada individuo. Posteriormente se estableció una correlación fenotipo-genotipo. Con todo esto, se pudo confirmar la sospecha clínica y clasificar a cada afectado (en tipos y subtipos), así como también definir el estatus de portador en los familiares del afectado. Se busca proponer esta estrategia como el modelo ideal de estudio en enfermedades con una alta heterogeneidad clínica y genética.

La propuesta de realizar un completo estudio genético y molecular en Síndrome de Usher, constituye un trabajo de gran relevancia en la genética de enfermedades visuales y auditivas. Todo esto no sólo ayudaría a entender los

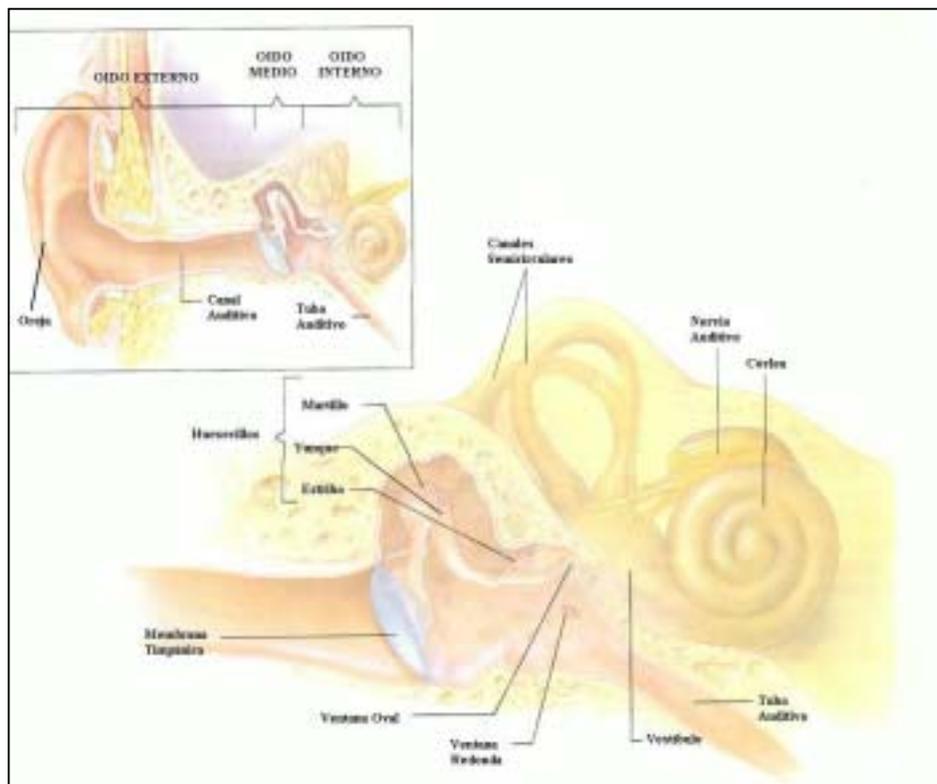
mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y ofrecería una importante información clínica, genética y molecular a la investigación actual sobre el tema, sino que brindaría información necesaria para el paciente y para desarrollar una consejería genética más efectiva, ya que la pérdida de los sentidos de la visión y la audición es especialmente comprometedor para el individuo afectado, para su familia y para la sociedad.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. AUDICION Y FUNCION VESTIBULAR

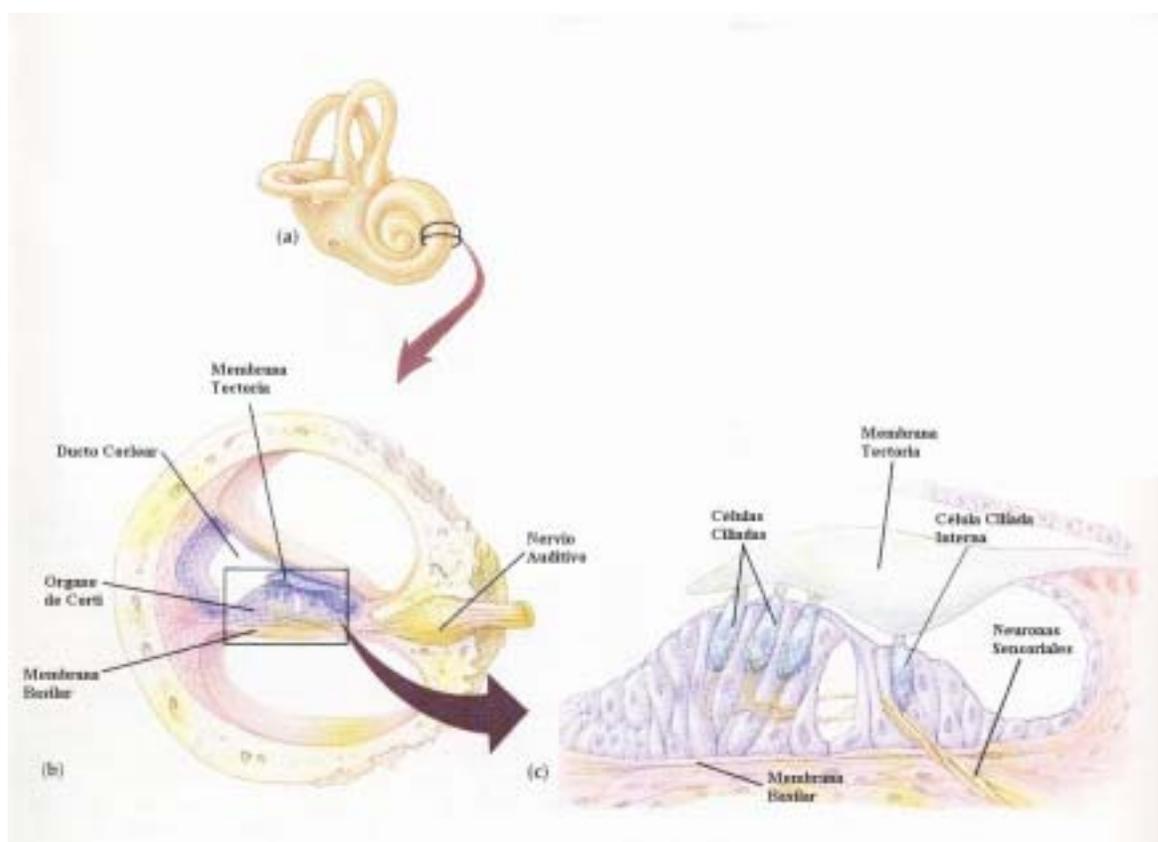
#### 2.1.1. Estructura del Oído

El oído está dividido en tres regiones: el oído externo, el oído medio y el oído interno (Figura 1). El oído externo consiste de la oreja o pinna y del canal auditivo, los cuales colectan las ondas del sonido y las canalizan hacia la membrana timpánica en el oído medio. Allí las vibraciones son conducidas a través de tres pequeños huesecillos llamados martillo, yunque y estribo, hacia el oído interno, pasando a través de la membrana oval, que se encuentra debajo del estribo. El oído interno está formado por un laberinto de canales dentro del hueso temporal. Estos canales están forrados por una membrana y contienen fluido que se mueve en respuesta al sonido o al movimiento de la cabeza (Campbell, 1993).



**Figura 1.** Estructura del Oído (Tomado de Campbell, 1993).

La parte del oído interno comprometida con la audición es la cóclea o caracol, que ocupa parte de la cavidad laberíntica dentro del hueso temporal. La cóclea está formada por 3 canales, uno superior llamado el canal vestibular, uno inferior que es el canal timpánico, y entre los dos se encuentra un canal más pequeño conocido como el ducto coclear (Figura 2). Los canales vestibular y timpánico contienen un fluido llamado perilinfa y el canal coclear líquido endolinfático. El canal central o ducto coclear contiene el órgano de Corti, el cual descansa sobre la membrana basilar y dentro de él se encuentran las células receptoras sensoriales del oído o células ciliadas, con sus cilios proyectándose hacia el canal coclear. El órgano de Corti está compuesto por las células ciliadas internas y externas, las células de soporte y la membrana tectoria. Los extremos de algunos de los cilios, se encuentran adheridos a la membrana tectoria, la cual se encuentra en la parte superior del órgano de Corti a manera de techo (Campbell 1993, Haines 1997).



**Figura 2.** Estructura de la Cóclea. (a) Cóclea. (b) Vista transversal, que muestra 3 canales: Vestibular, timpánico y ducto coclear. (c) Órgano de Corti (Tomado de Campbell, 1993)

En el proceso de la audición, el oído convierte la energía mecánica de las ondas sonoras, que viajan a través del aire, en impulsos nerviosos que el cerebro percibe como sonido. Estas ondas causan una vibración en la membrana timpánica de la misma frecuencia que el sonido. La frecuencia es el número de vibraciones por segundo y se mide en Hertz (Hz). Los tres huesecillos del oído medio amplifican y transmiten los movimientos mecánicos a la ventana oval, una membrana en la superficie de la cóclea. Las vibraciones de la ventana oval, producen ondas de presión en el fluido de la cóclea.

La cóclea transforma la energía del fluido vibrante en potenciales de acción. El estribo vibrando contra la ventana oval crea una onda de presión en el fluido de la cóclea que pasa al canal vestibular. Esta onda continua hasta el extremo de la cóclea y a través del canal timpánico, disipándose a medida que choca contra la ventana redonda. Las ondas de presión en el canal vestibular ejercen una presión sobre el canal central o ducto coclear y sobre la membrana basilar. A medida que la membrana basilar vibra en respuesta a las ondas de presión, alternadamente presiona y aleja a las células ciliadas contra la membrana tectoria. Este movimiento de los cilios distorsiona la membrana plasmática de las células ciliadas o células mecanorreceptoras, haciéndolas más permeables al sodio. La despolarización resultante incrementa la liberación de neurotransmisores desde las células ciliadas y la frecuencia de los potenciales de acción en la neurona sensorial, con la cual la célula ciliada hace sinapsis. Esta neurona conduce las sensaciones al cerebro a través del nervio auditivo.

### **2.1.2. Función Vestibular**

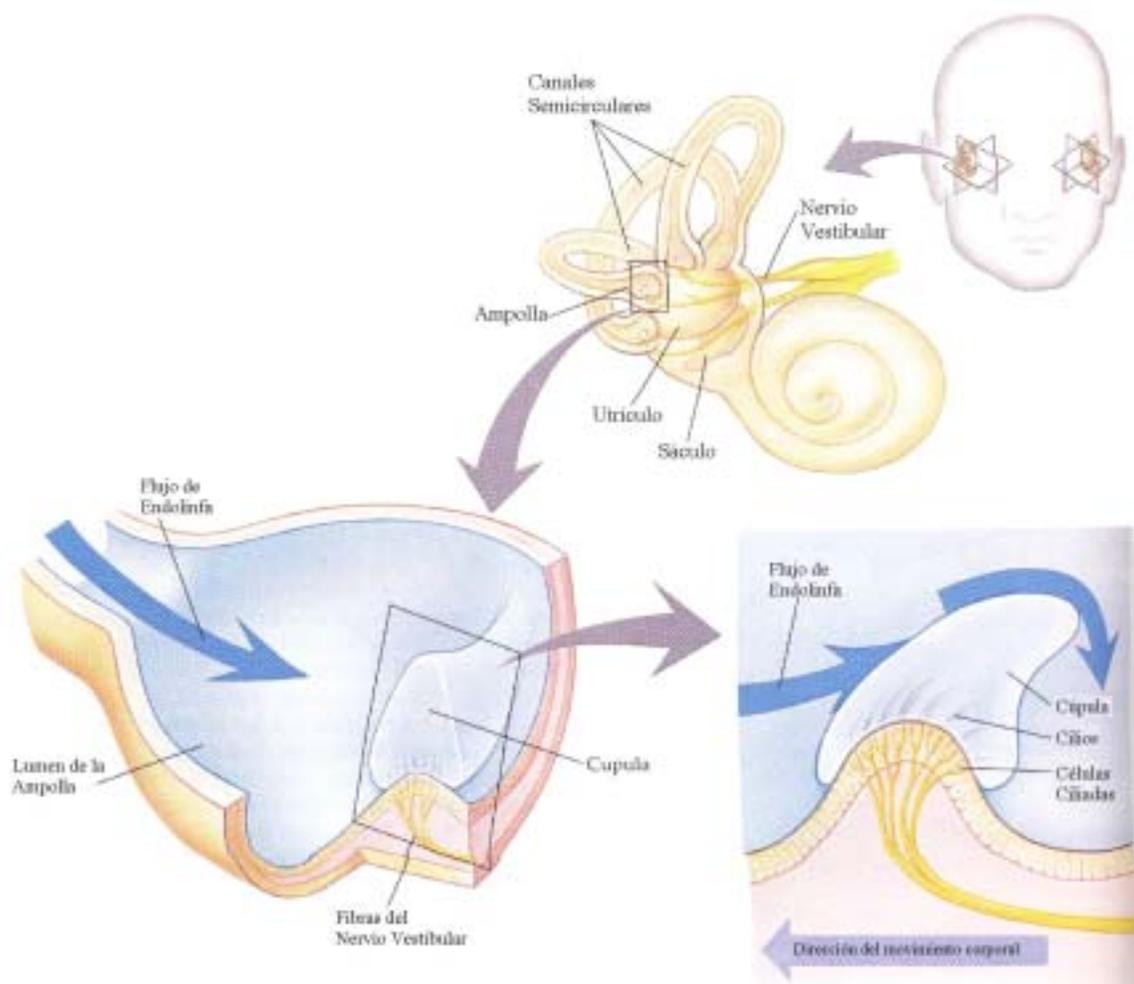
La función vestibular consta de un sistema de controles neurosensoriales que actúa de manera refleja para estabilizar la visión y coordinar los movimientos y balancear cabeza, cuerpo y miembros (West, 1986). El sistema vestibular se encuentra también dentro del oído interno.

Detrás de la ventana oval se encuentra un vestíbulo que contiene dos cámaras: El utrículo y el sáculo. El utrículo se abre en tres canales semicirculares que completan el sistema vestibular. Las células ciliadas de los tres conductos semicirculares, cada uno de los cuales se encuentra orientado en ángulo recto con respecto a los otros, se concentran en la ampolla, donde se encuentran embebidas en una masa gelatinosa denominada cúpula (Figura 3).

Las sensaciones relacionadas con la posición del cuerpo son generadas de forma muy similar a las sensaciones del sonido. Las células ciliadas del utrículo y el sáculo responden a cambios en la posición de la cabeza con respecto a la gravedad y al movimiento en una dirección. Las células ciliadas están ordenadas en racimos y todos sus cilios se proyectan dentro de un material gelatinoso que contiene muchas

partículas pequeñas de carbonato de calcio llamadas otolitos. Debido a que el material gelatinoso es más pesado que la endolinfa dentro del utrículo y el sáculo, la gravedad está siempre halando hacia abajo los cilios de las células receptoras, enviando un flujo constante de potenciales de acción a lo largo de las neuronas sensoriales de la rama vestibular del nervio auditivo.

Cuando la posición de la cabeza cambia con respecto a la gravedad, la fuerza sobre las células ciliadas cambia, e incrementa su liberación de neurotransmisores. El cerebro interpreta los cambios resultantes en producción de impulsos por parte de las neuronas sensoriales para determinar la posición de la cabeza. Mediante un mecanismo similar, los canales semicirculares, que se encuentran dispuestos en los tres planos del espacio, detectan la rotación de la cabeza (Campbell 1993, Haines 1997) (Figura 3).

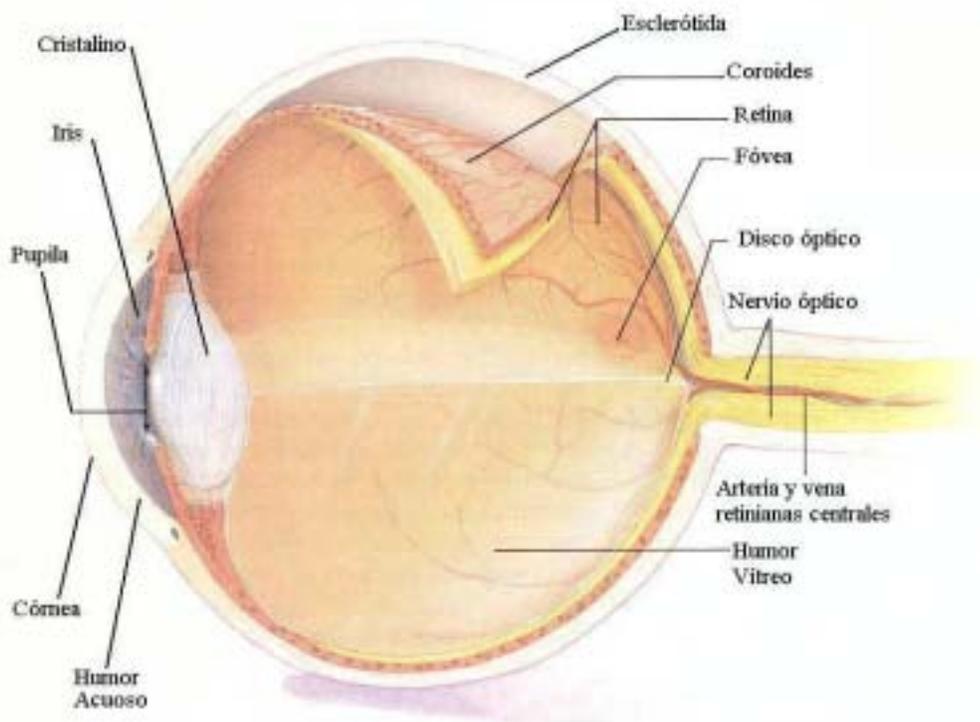


**Figura 3.** Sistema Vestibular: Canales semicirculares, Utriculo y Sáculo (Tomado de Campbell, 1993).

## 2.2. LA VISION

### 2.2.1. Estructura del Ojo

El globo ocular está formado por una capa exterior blanca y dura de tejido conectivo llamada la esclerótida y de una capa interna, delgada y pigmentada llamada coroides. En la parte frontal del ojo, la esclerótida se transforma en la transparente córnea, la cual permite el paso de la luz. La coroides anterior forma el iris, el cual le da al ojo su color. Al cambiar de tamaño, el iris regula la cantidad de luz que entra a través de la pupila, que es el agujero en el centro del iris. Justo adentro de la coroides, la retina forma la capa más interna del globo ocular. La retina contiene las células fotorreceptoras. La información de las células fotorreceptoras abandona el ojo por el disco óptico, lugar donde se encuentra el nervio óptico (Figura 4).



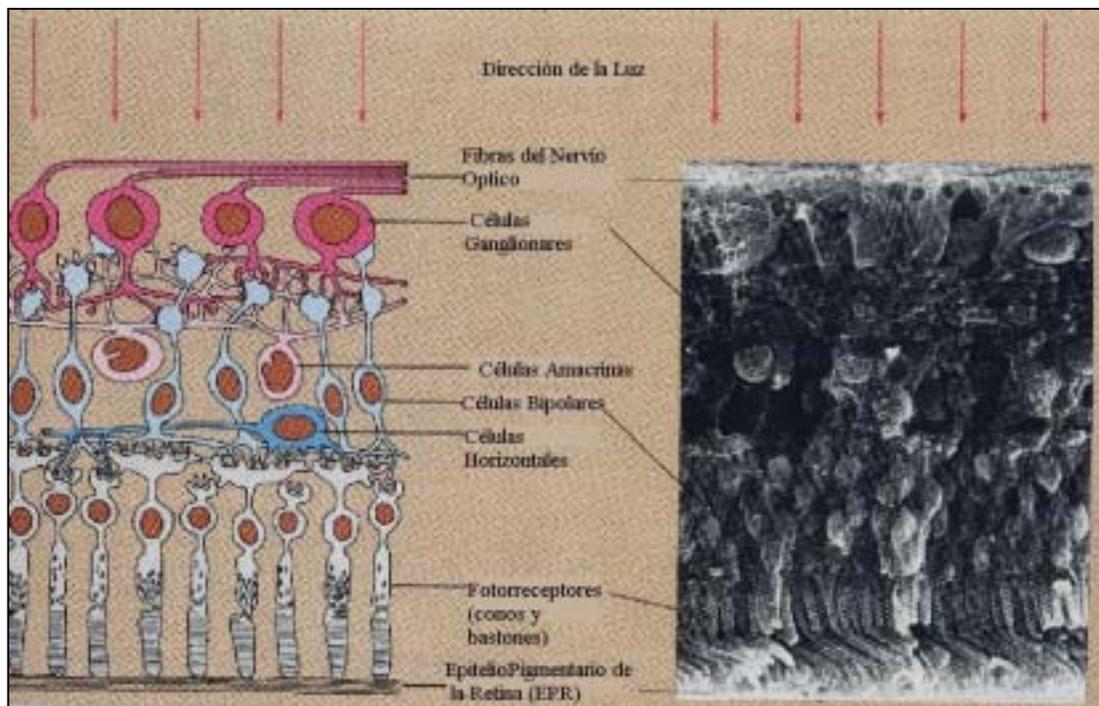
**Figura 4.** Estructura del Ojo (Tomado de Campbell, 1993).

El cristalino y el cuerpo ciliar dividen al ojo en dos cavidades o cámaras. Una entre el cristalino y la córnea y otra mucho más grande detrás del cristalino y que abarca prácticamente todo el globo ocular.

- **La Retina :**

La superficie interna de la parte posterior del ojo está cubierta por la retina, la cual está compuesta de la retina neural y del epitelio pigmentario de la retina (EPR).

El EPR es una hoja continua de células cuboidales pigmentadas unidas mediante uniones celulares tipo *tight junctions* que bloquean el flujo de plasma o iones. El EPR sule la nutrición de la retina neural en forma de iones esenciales y glucosa, protege a los fotorreceptores retinianos de niveles potencialmente dañinos de luz y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la anatomía de los fotorreceptores (Figura 5), (Haines 1997).

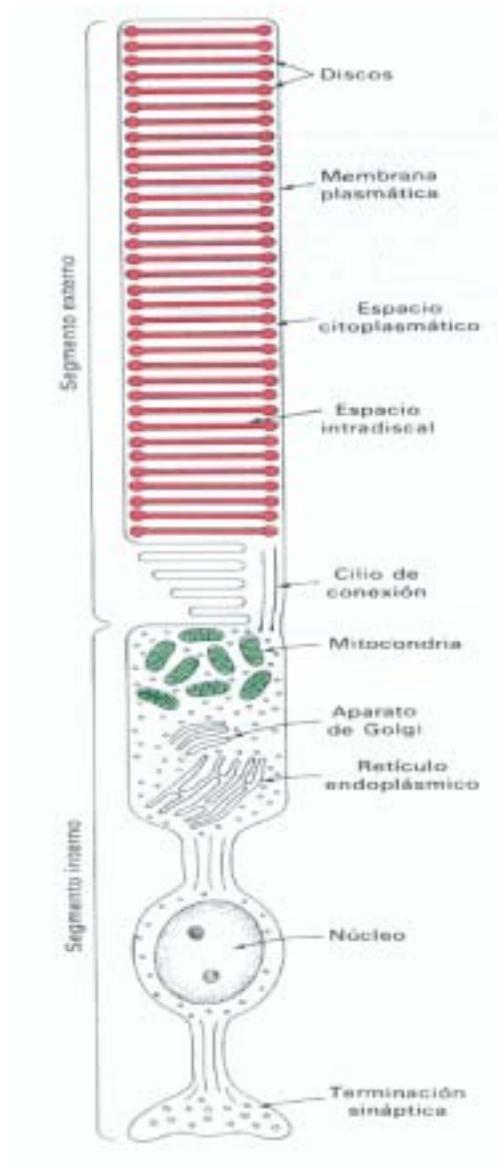


**Figura 5.** Organización Estructural de la Retina. Se observan los principales tipos celulares retinianos. Las células fotorreceptoras bastones y conos, envían la señal a las células horizontales y a las células bipolares. Las células bipolares a su vez hacen sinapsis con las células amacrinas y con las células ganglionares (Tomado de Fundamental Neuroscience, Haines 1997)

La retina neural contiene los fotorreceptores y las neuronas asociadas del ojo y está especializado para percibir la luz y procesar la información resultante. Los fotorreceptores absorben los cuanta de luz (fotones) y convierten esta entrada de energía en una señal eléctrica. La señal es entonces procesada por las neuronas retinianas.

Existen dos tipos básicos de fotorreceptores: Los conos y los bastones. Los conos y los bastones de la retina son los responsables de la fotorrecepción, el proceso por el cual los fotones de luz son detectados y la información es transformada en señales electroquímicas. La luz es detectada y transformada en el segmento externo que apunta hacia el EPR. Un cilio, conecta el segmento externo con el segmento interno del fotorreceptor (Figura 6). El cilio contiene nueve pares de microtúbulos que emanan del cuerpo basal localizado en el segmento interno.

Existen alrededor de 125 millones de bastones y 6 millones de conos en la retina humana. Los conos y los bastones tienen diferentes funciones en la visión, los bastones son más sensibles a la luz pero no distinguen los colores, con lo cual posibilitan la visión nocturna o con luz tenue, pero sólo en blanco y negro. Los conos son estimulados cuando hay una mayor cantidad de luz, y por ende estos fotorreceptores no son funcionales para la visión nocturna, pero pueden distinguir los colores durante el día o en presencia de luz brillante.



**Figura 6.** Diagrama esquemático de un bastón retiniano (Tomado de Stryer, 1997)

### 2.3. BASES TEORICAS DEL SINDROME DE USHER

El Síndrome de Usher comprende un grupo de desórdenes, de herencia autosómica recesiva, caracterizados por sordera congénita neurosensorial, disfunción vestibular y Retinitis Pigmentosa progresiva (RP) (Kimberling, 1995).

#### 2.3.1. Aspectos Básicos de la Sordera y la Retinitis Pigmentosa

Se denomina *sordera* a cualquier pérdida de la capacidad auditiva de un individuo. La clasificación de la sordera varía de acuerdo al enfoque dado. Según la vía dañada la sordera se clasifica en:

- *Sordera Conductiva:* Es consecuencia de anomalías en los oídos externo o medio, que puede ocasionar una insuficiencia en la conducción de las ondas sonoras.
- *Sordera Neurosensorial:* Es debida a alguna disfunción en el oído interno o en el nervio auditivo. Este tipo de sordera es la que se presenta en los casos de sordera genéticamente determinada y por lo general es debida a una aplasia de las células ciliadas o un deterioro de ellas. Puede estar presente en el momento del nacimiento (congénita) o aparecer durante la vida adulta.
- *Sordera Mixta:* Este tipo de sordera presenta componentes de sordera neurosensorial y de sordera conductiva.

En el Síndrome de Usher la sordera es de tipo neurosensorial y varía entre los pacientes: Puede ir desde moderada hasta profunda, afectando principalmente la percepción de tonos agudos (frecuencias más altas). Esta pérdida auditiva es congénita y puede ser estable o progresiva. En muchos de los casos está asociada con disfunción vestibular y alteración del equilibrio (Kimberling y Moller 1995).

La *Retinitis Pigmentosa* es una degeneración progresiva, bilateral y simétrica de la retina, que se inicia en la periferia; los bastones (fotorreceptores activos en el estado de adaptación a la oscuridad) son principalmente afectados en las primeras etapas, causando ceguera nocturna (nictalopía) y constricción de los campos visuales (visión en túnel). La mayoría de los pacientes muestran acúmulos de pigmento en la

retina en cúmulos o en las paredes de los vasos retinianos en un patrón pigmentario característico de “espículas de hueso”. Otros hallazgos clínicos incluyen palidez del nervio óptico, adelgazamiento y esclerosis de los vasos retinianos e hipopigmentación del epitelio pigmentario de la retina (EPR).

### **2.3.2. Incidencia del Síndrome de Usher**

El primer reporte de la enfermedad fue realizado en Berlín en 1858 por el oftalmólogo alemán von Graefe, quien describió sordera y alteraciones pigmentarias de la retina en tres de cinco hermanos afectados. Pocos años después en 1861, Liebreich describió la asociación en 14 de 241 individuos sordos en Berlín. Sin embargo, fue el oftalmólogo británico Charles Usher, quien en 1914 hizo énfasis sobre la naturaleza hereditaria de esta asociación, razón por la cual el síndrome lleva su nombre.

El Síndrome de Usher (USH) afecta a un amplio segmento de la población global y es la principal causa de sordo-ceguera en el mundo. La frecuencia del Síndrome de Usher ha sido estimada en 3,2/100.000 habitantes en Colombia, constituyendo aproximadamente el 9,6% de la población sorda y el 10% de la población ciega (Tamayo et al.,1991, Tamayo et al., 1992). En Escandinavia la frecuencia de USH es de 3,0/100.000 (Hallgren, 1959; Nuutila, 1970) y de 4,4/100.000 en los Estados Unidos (Boughman, 1983). A nivel mundial, se ha estimado que entre el 8% y el 33% de los individuos con Retinitis Pigmentosa tienen algún grado de pérdida auditiva y muchos de estos individuos pueden, de hecho, estar presentando Síndrome de Usher. La mayoría de los individuos afectados de Síndrome de Usher pertenecen a los subtipos USH1B o USH2A. Se estima que el Síndrome de Usher tipo I es responsable del 3-6% de todas las sorderas infantiles y del 50% de todas las sordo-cegueras (Boughman et al., 1983).

### 2.3.3. Heterogeneidad Clínica y Genética del Síndrome de Usher

Clínicamente, el Síndrome de Usher ha sido dividido en tres tipos, los cuales se diferencian entre sí por la severidad y la progresión de la pérdida auditiva y por el grado del compromiso vestibular (Tabla 1). Mientras que todos los pacientes con Síndrome de Usher desarrollan RP progresiva, el grado del deterioro auditivo y la presencia o ausencia de anomalías vestibulares difieren entre los tipos de Síndrome de Usher. (Moller et al., 1989, Smith et al., 1992; Smith et. al, 1994; Tamayo et al., 1991; Tamayo et al., 1996).

Los tres tipos clínicos de Síndrome de Usher son:

- *TIPO I:* El Síndrome de Usher tipo I (USH1) se caracteriza por sordera profunda neurosensorial congénita, bilateral, no progresiva y simétrica, ausencia de respuesta vestibular y aparición prepuberal de Retinitis Pigmentosa progresiva.
- *TIPO II:* El tipo II (USH2) se caracteriza por sordera congénita de moderada a severa, no progresiva, bilateral, respuesta vestibular normal, con inicio de Retinitis Pigmentosa en la adolescencia.
- *TIPO III:* El tipo III (USH3) está caracterizado por pérdida auditiva neurosensorial congénita, progresiva, respuesta vestibular variable y aparición de Retinitis Pigmentosa durante la adolescencia.

Como se conocía que la enfermedad era clínicamente heterogénea, se pensó que podría también presentar heterogeneidad genética. Los primeros datos experimentales que sustentan esta suposición fueron publicados a comienzos de la década de 1990, en una serie de revistas científicas especializadas en genética humana. Por consiguiente, a cada uno de los tres tipos clínicos de Síndrome de Usher le corresponde uno o más subtipos genéticos así: Al menos seis loci (sitios en el genoma) independientes han sido identificados hasta el momento para los fenotipos del tipo I (USH1a-f), dos loci han sido identificados para los fenotipos del tipo II (USH2a-b) y un locus para el fenotipo del tipo III (USH3) (Kimberling et al., 1995; Eudy and Sumegi, 1999) (Tabla 1).

Los seis loci para el Síndrome de Usher tipo I (USH1a-f) están localizados en los sitios cromosómicos 14q32, 11q13, 11p15, 10q, 21q21 y 10q (Bonne-Tamir et al., 1994; Chaib et al., 1997; Gerber et al., 1996; Kaplan et al., 1992; Kaplan et al., 1990; Keats et al., 1994; Kimberling et al., 1992; Larget-Piet et al., 1994; Smith et al., 1992; Wayne et al., 1996). Los loci para el Síndrome de Usher tipo II están asociados con el cromosoma 1q41 (USH2A) y con el cromosoma 5q11(USH2B), respectivamente (Kimberling et al., 1990, Kimberling et al., 1992; Kimberling et al., 1995; Moller et al., 1989; Pieke-Dahl et al., 1993; Sumegi et al., 1996). El locus para el tipo III está localizado en el sitio 3q (Gasparini et al., 1998; Sankila et al., 1995; Pakarinen et al., 1995).

Entre los genes que se han identificado y caracterizado para los 9 loci del Síndrome de Usher, se encuentran los de los subtipos USH1B Y USH2A (Weil et al., 1995; Eudy et al., 1998). Recientemente han sido identificados los genes para los subtipos de Síndrome de Usher USH1C (Verpy et al., 2000; Zwaenepoel, et al., 2001), USH1D (Bolz et al., 2001; Bork et al., 2001) y USH1F (Zubair et al., 2001);

**Tabla 1.** Heterogeneidad Clínica y Genética del Síndrome de Usher. Se puede observar la complejidad del estudio del Síndrome de Usher, dado que cada tipo presenta variantes de subtipo, con genes localizados en diferentes cromosomas.

Tipo Clínico	Pérdida Auditiva	Función Vestibular	Alteración Retiniana	Sub Tipo Genetico	Localización Crom.	Gen
<b>I</b>	Sordera Congénita y Profunda, No progresiva	Disfunción Congénita y severa	Prepuberal	1a	14q32	Desconocido
				1b	11q13.5	MYOVIIA
				1c	11p15.1	USH1C
				1d	10q21-q22	CDH23
				1e	21q	Desconocido
				1f	10q	PCDH15
<b>II</b>	Congénita, de moderada a severa, No Progresiva	Normal	Adolescencia temprana	IIa	1q41	USH2A
			Adolescencia tardía	IIb	5q11	Desconocido
<b>III</b>	Congénita, Progresiva	Variable	Adolescencia	III	3q21-q25	USH3

## 2.4. ASPECTOS CLINICOS DEL SINDROME DE USHER

### 2.4.1. Descripción Clínica y Alteraciones Presentes en el Síndrome de Usher

- *Alteraciones Visuales*

Una alta frecuencia de cataratas después de los 40 años de edad fue observada por Hallgren en 1959 y Grondahl en 1986; sin embargo, según Heckenlively, éstas no difieren en frecuencia de las observadas en cualquier caso de Retinitis Pigmentosa. Por otra parte, los pacientes colombianos parecen presentar cataratas a edades mucho más tempranas que otras poblaciones. Los reportes de Grondahl difieren de manera importante de los presentados en Colombia por Tamayo y colaboradores. Similar condición parece observarse en lo referente a la edad de inicio de la nictalopía o ceguera nocturna (Grondahl et al., 1996, Tamayo et al., 1991, Tamayo et al., 1992). Ahora bien, si las cataratas corresponden a una manifestación directa del gen o son secundarias a un proceso degenerativo retiniano, es otro punto de discusión en la actualidad.

Finalmente, en cuanto a la alteración retiniana, se ha encontrado la Retinitis Pigmentosa típica y la atípica o sin pigmento (Hallgren 1959, Vernon 1969, Fishman et al., 1983, Tamayo et al., 1991, Tamayo et al., 1992). Ya que la alteración retiniana es progresiva, es frecuente observar en una misma familia diversos estadios de la lesión. Es por esto, que se viene enfatizando sobre la conveniencia del diagnóstico temprano electrofisiológico de la limitación visual. (Abraham 1977).

- *Alteraciones Auditológicas y Vestibulares*

La mayoría de los estudios sugieren una lesión coclear, así como una hipoacusia neurosensorial congénita, simétrica y bilateral en el Síndrome de Usher. De igual manera existe un consenso generalizado sobre el concepto de similaridad intrafamiliar y variabilidad interfamiliar, en especial en lo referente al patrón de la sordera.

Los estudios histopatológicos son escasos, pero los resultados que corroboran las sospechas clínicas son muy interesantes. En 1907 Siebemann y Bing demostraron por

primera vez, similares cambios histopatológicos en la retina y en el órgano de Corti, de un paciente sordo que además presentaba Retinitis Pigmentosa. Hallazgos muy similares fueron presentados por Buch en 1963, Belal en 1975, Nadol y Cremers en 1988.

Con respecto a las alteraciones vestibulares, ha sido evidente que los pacientes con el tipo I de la enfermedad, presentan serias anormalidades en el examen vestibular y en el electronistagmograma; estos pacientes suelen presentar alteraciones clínicas evidentes de daño vestibular, como retardo psicomotor, marcha atáxica, torpeza y anormalidades en la coordinación a la marcha. Por su parte, los pacientes con Síndrome de Usher tipo II no presentan anormalidades vestibulares.

- ***Alteraciones Neurológicas y Psiquiátricas***

En cuanto al hallazgo de alteraciones neurológicas, es llamativo encontrar varios reportes que demuestran anomalías del sistema nervioso central (SNC). Piazza y Fishman encontraron, por medio de Resonancia Nuclear Magnética (RNM), anomalías cerebelares y de la parte central del cerebro en siete pacientes. Kimberling y Moller encontraron anomalías del CNS solo en unos pacientes. Tamayo y colaboradores, en Colombia, practicaron Resonancia Nuclear Magnética a 30 pacientes con diagnóstico confirmado de Síndrome de Usher, encontrando anormalidades cerebelares en 11 de ellos (Tamayo et al., 1996). En dicho estudio se evaluaron neuro-radiológicamente 30 pacientes colombianos con Síndrome de Usher, tipo I y tipo II. La Resonancia Magnética Cerebral (RMC) mostró anormalidades cerebelares, principalmente atrofia, en 50% de los pacientes Usher tipo I y en 75% del tipo II. Estas anormalidades no se correlacionan con la edad o el sexo de los afectados.

Hallgren en 1959 fue quien primero notó la asociación de Síndrome de Usher con alteraciones mentales. El 25% de sus pacientes presentaba severos disturbios emocionales, como esquizofrenia y otros cambios similares a alteraciones maníaco-depresivas. Aunque existen varios reportes de anormalidades mentales, otros autores cuestionan la presencia de estas como parte del Síndrome, sosteniendo que bien

podieran ser expresión y resultado del aislamiento que produce la doble limitación visual y auditiva.

Las investigaciones realizadas, sobre estos aspectos por Tamayo y colaboradores, han arrojado resultados interesantes (Tamayo et al., 1995, 1997). Se practicó una evaluación psicosocial a 19 familias colombianas con 40 pacientes afectados de Síndrome de Usher, a fin de conocer las necesidades del individuo afectado, la clase de relación que éste lleva al interior de su grupo familiar o social y de establecer las implicaciones intrafamiliares de la doble limitación de sordo-ceguera. Sorprendió encontrar retardo mental límite, enfermedad psicoafectiva bipolar o severa depresión en el 16.7% de los casos estudiados de Síndrome de Usher Tipo I y en el 33.3% de los tipo II.

Algunos autores creen que estas alteraciones mentales y neurológicas observadas en algunos pacientes pueden ser manifestación de los efectos pleiotrópicos del gen (diversos efectos fenotípicos de un solo gen o un par génico) (Tamayo et al., 1996). La otra teoría en discusión propone que tal relación se trata de un efecto secundario de la enfermedad e, inclusive, de un error de apreciación. Repetidamente se ha insistido en la dificultad obvia de realizar pruebas psicométricas y evaluaciones psicológicas a pacientes con severas limitaciones visuales y auditivas, con lo que probablemente se dé pie a interpretaciones erróneas sobre la existencia de un retardo mental, cuando en realidad no lo hay.

#### **2.4.2. Diagnóstico del Síndrome de Usher**

Para lograr un diagnóstico acertado del Síndrome de Usher, es necesario realizar evaluaciones tanto a nivel genético como oftalmológico y audiológico. Para establecer el tipo clínico o clasificación fenotípica de cada afectado, es de vital importancia tener muy claros los criterios diagnósticos que los diferencian.

##### **2.4.2.1. Evaluación Genética**

La realización de una completa valoración especializada es indispensable en una persona con enfermedad genética en quien se sospecha alguna alteración ocular o

auditiva. Como primera medida se debe realizar una detallada historia clínica especialmente encaminada a detectar enfermedades genéticas. Se debe indagar si existe consanguinidad entre los padres y el grado de ésta. Es indispensable determinar cuáles familiares están afectados por la enfermedad, elaborando un árbol genealógico del núcleo familiar y de esta forma definir el tipo de herencia presente en cada familia

#### **2.4.2.2. Evaluación Oftalmológica**

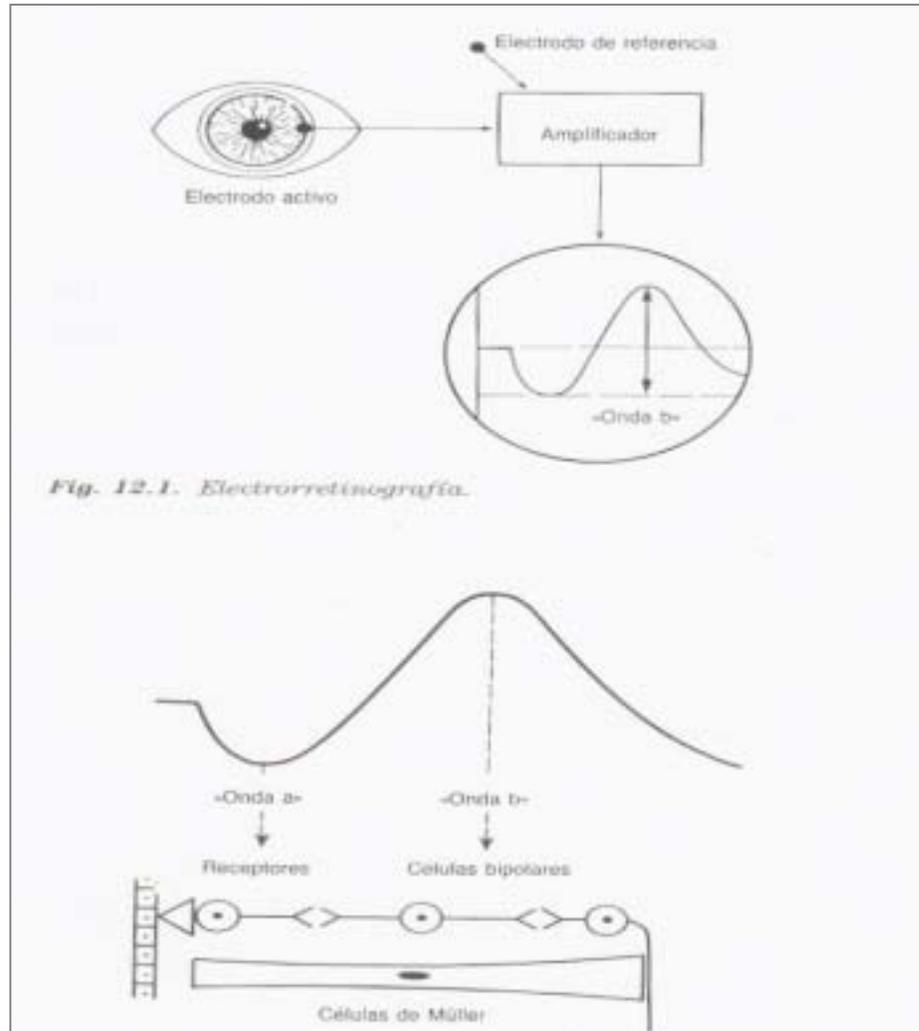
Se debe realizar un examen oftalmológico completo el cual incluya las siguientes evaluaciones:

- **Examen Externo** con medición de la agudeza visual y evaluación de desviaciones, estado de las pupilas y exámenes de biomicroscopia (exploración del segmento anterior, se usa lámpara de hendidura) y tonometría (determinación de la presión intraocular – PIO-).
- **Examen de Fondo de Ojo o Fundoscopia:** Este examen es muy importante, ya que muestra el estado de la retina y la presencia de los hallazgos clínicos clásicos de la Retinitis Pigmentosa como son: Deposición de pigmento en la retina en un patrón característico de “espículas de hueso”; palidez del nervio óptico, adelgazamiento de los vasos retinianos e hipopigmentación del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Para su realización se dilata la pupila.

Según los hallazgos iniciales, se recurrirá o no a exámenes especiales que evalúan la función retiniana:

- **Electroretinograma (ERG):** Evalúa la función de los conos y los bastones. El ERG es un registro del potencial de acción producido por la retina cuando se estimula con una fuente de luz de intensidad adecuada. En la práctica clínica se detecta en el exterior del ojo, usualmente sobre la córnea con un electrodo de lente de contacto (Figura 7). Cuando un haz de luz incide sobre la retina, ocasiona una estimulación de los fotorreceptores, generando una corriente eléctrica, que

escapa al vítreo y a los espacios extracelulares y puede ser medida a nivel de la córnea.



**Figura 7.** Electrorretinograma. (Tomado de Kanski ,1992. Oftalmología Clínica)

El ERG tiene dos componentes principales: La “Onda a” es la deflexión negativa inicial o potencial receptor tardío, que proviene de los fotorreceptores. La “Onda b” corresponde al potencial combinado de las células bipolares y de Muller, comienza al final de la onda a y es positivo (Figura 7).

Según las condiciones en que se tome la prueba se evalúan diferentes células fotorreceptoras. Así por ejemplo, las condiciones fotópicas (con luz) valoran los

conos, mientras que las escotópicas (oscuridad) valoran los bastones. El valorar separadamente estos dos tipos de células, permite evaluar enfermedades como la Retinitis Pigmentosa, en la cual se afectan primero los bastones, lo cual explica que estos pacientes se quejen inicialmente de mala visión en la oscuridad (nictalopía).

- ***Electrooculograma (EOG):*** Valora específicamente el epitelio pigmentario de la retina (EPR).
- ***Campimetría o medición del campo visual:*** Es un examen que mide la visión central y periférica de un individuo. En las enfermedades retinianas suele haber pérdida progresiva del campo visual, el cual se va estrechando y reduciéndose cada vez más. La realización de este examen es muy importante en los pacientes con Retinitis Pigmentosa ya que la constricción de los campos visuales es una de las primeras manifestaciones de la enfermedad.
- ***Las Fotos a color y la Angiografía Fluoresceínica:*** Proporcionan una documentación importante de las valoraciones de fondo de ojo en las diferentes etapas de la enfermedad. Las fotos del fondo de ojo son la prueba gráfica del estado de la retina. La angiografía es un examen que utiliza un medio de contraste radiológico, que permite ver los vasos de la retina y detectar mínimas alteraciones retinianas.

#### **2.4.2.3. Evaluación Audiológica y Vestibular**

La pérdida auditiva es cuantificada mediante la realización de exámenes como la Audiometría Tonal, la logaudiometría y el tímpanograma. Todos estos exámenes permiten evaluar la capacidad auditiva del individuo.

• ***Audiometría Tonal:*** Es un examen que evalúa la audición del paciente y su realización es necesaria para determinar el grado de pérdida auditiva en el Síndrome de Usher. Se realiza colocando a la persona en una cámara que lo aisle de los ruidos,

con unos audífonos colocados en ambos oídos. El examinador procede a pasarle diferentes tipos de sonidos, calculando diferentes frecuencias, según la calibración en Hz. que el aparato permite probar. Es importante evaluar la audición a frecuencias bajas, medias y altas: 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 Hz. Así mismo, la prueba mide la intensidad que debe tener el sonido para ser percibido por un individuo, lo cual es cuantificado de acuerdo a los decibeles (dB) a los que se comienzan a percibir sonidos. La audición normal está siempre por debajo de 20dB.

*.Valoración del Sistema Vestibular:* El sistema vestibular no puede ser examinado directamente, pero, debido a sus íntimas relaciones con los núcleos oculomotores, puede ser evaluado a través de la observación de los efectos de la estimulación vestibular sobre los movimientos oculares (reflejos vestibulooculares). Las pruebas vestibulares incluyen pruebas posicionales (giros rápidos de la cabeza-reflejo oculocefálico-) y pruebas de estimulación calórica con electronistagmografía (evaluación cuantitativa precisa que requiere el registro eléctrico de los movimientos oculares con los ojos cerrados). Las pruebas preliminares de función vestibular se realizan utilizando las gafas de Frenzel y el test de Romberg.

#### **2.4.2.4. Criterios para la Clasificación Fenotípica**

Como se ha mencionado con anterioridad, clínicamente, los tres tipos de Síndrome de Usher son distinguibles uno de otro teniendo como base la edad de aparición, la severidad y la progresión de la pérdida auditiva y, el grado de compromiso vestibular. Los pacientes con Síndrome de Usher tipo I presentan sordera profunda, mientras que los pacientes del tipo II muestran sordera moderada y tienen un audiograma en forma de declive, con patrones de sordera leve en las frecuencias bajas y patrones de sordera más severa en las frecuencias más altas. Los audiogramas son muy característicos y la mayoría de las veces no hay una desviación significativa de los patrones esperados. La función vestibular es otro discriminador importante entre los tipos I y II de Síndrome de Usher, ya que los pacientes del tipo I carecen de función vestibular (Nuutila,1970; Kumar, 1984; Moller y Kimberling,

1989) y los del tipo II tienen respuestas vestibulares normales. El diagnóstico de la disfunción vestibular es un componente crítico en la diferenciación entre los tipos de síndrome de Usher I y II.

Los pacientes con Síndrome de Usher tipo III muestran una pérdida auditiva progresiva, la cual es de leve a moderada en el paciente joven y puede ser profunda en el adulto (Karjalainen, 1985). Consecuentemente, los pacientes del Tipo III pueden tener un fenotipo audiológico que es similar al del tipo II cuando son muy jóvenes, pero que es más parecido al fenotipo audiológico del tipo I cuando el paciente es adulto. Así también algunos pacientes del tipo III muestran un compromiso progresivo de la función vestibular. Las evaluaciones audiológicas son además importantes para confirmar el nivel del compromiso coclear.

Los estudios electrofisiológicos proveen el diagnóstico más temprano y confiable de Retinitis Pigmentosa. Varios estudios han mostrado que el electroretinograma (ERG) es subnormal a una edad tan temprana como 2 ½- 3 años, antes de esa edad las anomalías pueden ser vistas funcionalmente o con un examen fundoscópico (Fondo de Ojo) La respuesta se extingue totalmente a medida que la degeneración progresa. Una respuesta a ERG ausente o disminuida en al menos un individuo afectado es una condición necesaria para el diagnóstico de Síndrome de Usher en una familia. Una historia de ceguera nocturna y de disminución de los campos visuales se requiere para que el diagnóstico sea seguro.

## **2.5. ASPECTOS GENOTÍPICOS DEL SÍNDROME DE USHER**

### **2.5.1. Síndrome de Usher tipo I**

La localización para el Síndrome de Usher tipo I, ha sido a varios loci. Originalmente fue a marcadores en el cromosoma 14q, en un estudio de 10 familias con ancestro en el Occidente de Francia. De las 10 familias, 8 son originarias de una pequeña área de la región de Poitou- Charentes, sugiriendo que un efecto fundador podría estar involucrado (Kaplan et al 1992). La confirmación de este ligamiento no fue obtenida ni en la muestra general de los Estados Unidos, ni tampoco en la población Acadiana de Luisiana (Keats et al., 1992). Por el contrario, dos ligamientos separados fueron encontrados a los brazos largo y corto del cromosoma 11 (Kimberling et al., 1992; Smith et al., 1992). Subsecuentemente, se encontró que la muestra francesa era significativamente heterogénea, con sólo una fracción mostrando el ligamiento a 14q y el resto mostrando ligamiento a 11q13 (Kaplan,1992). Luego, tres nuevas localizaciones para el Síndrome de Usher tipo I fueron reportadas: dos a 10q y una a 21q (Wayne et al. 1996; Wayne et al., 1997; Chaib et al., 1997).

El símbolo para USH1A y su adicional designación como la “variedad francesa” del Síndrome de Usher, ha sido asignado a la forma que fue mapeada al cromosoma 14. El símbolo USH1C ha sido asignado a la “variedad Acadiana” de la enfermedad localizada en 11p y el símbolo USH1B para la “variedad no- Acadiana” en 11q.

Entre los genes que se han identificado y caracterizado para los 6 loci del Síndrome de Usher tipo I, se encuentra el del subtipo USH1B, que fue el primer gen del Síndrome de Usher en ser identificado (Weil et al., 1995; Eudy et al., 1998). Recientemente han sido identificados los genes para los subtipos de Síndrome de Usher USH1C ( Verpy et al., 2000; Zwaenepoel,et al., 2001), USH1D (Bolz et al., 2001; Bork et al., 2001) y USH1F (Zubair et al., 2001).

- **Tipo IB (USH1B): Identificación del Gen para el Tipo IB**

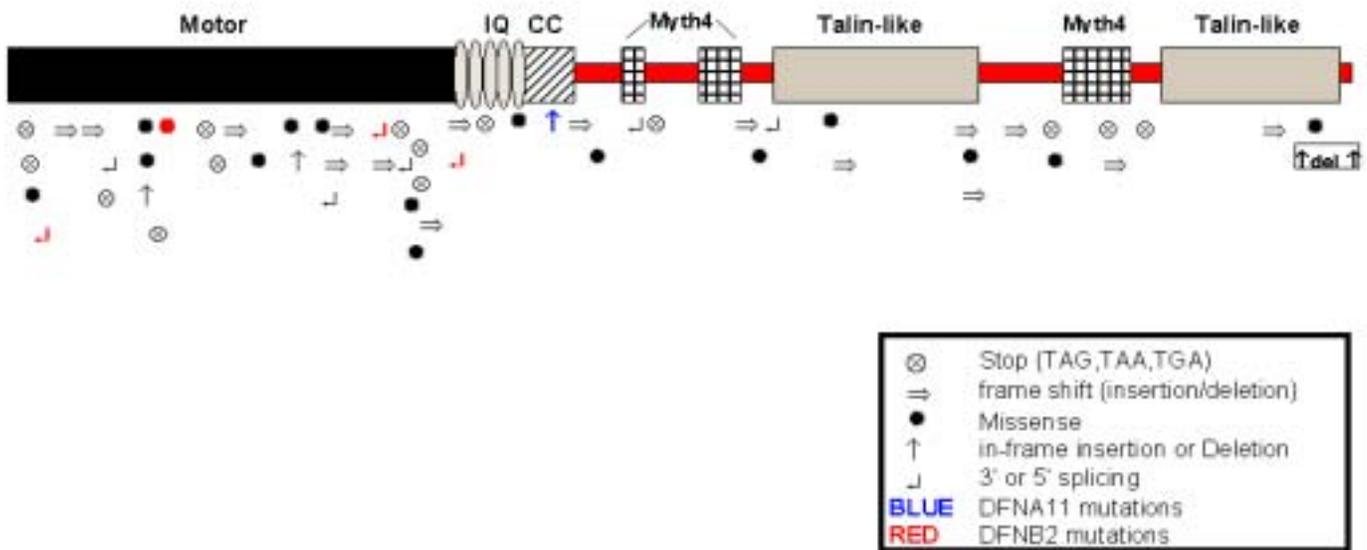
El primer gen del Síndrome de Usher en ser identificado fue el gen USH1B, en 1995. El gen que codifica para la miosina VIIA, una miosina no convencional, fue identificado como el responsable para el fenotipo USH1B, el cual cuenta para

aproximadamente el 75% de los casos del Síndrome de Usher tipo I, ya que se observaron 2 mutaciones *missense*, una delección de 6 bp y 2 codones de parada prematuros, en cinco familias no relacionadas que segregaban para Síndrome de Usher tipo I y mostraba ligamiento a 11q13.5 (Weil et al., 1995; Weston, Kimberling et al., 1995). De igual forma, se demostró que, las mutaciones en el gen murino de la miosina VIIa, eran responsables para el fenotipo *shaker-1*, que causa disfunción vestibular, así como anormalidades neuroepiteliales y degeneración del órgano de Corti en ratones (Gibson et al., 1995).

El gen MYO7A consta de 49 exones y tiene una longitud de 120 kb (Kelley, Kimberling et al., 1997). La secuencia deducida de aminoácidos predice una cadena polipeptídica de 2215 aminoácidos con la estructura típica de una miosina no convencional: un dominio de cabeza motora, que incluye los altamente conservados sitios de unión al ATP y a la actina; un dominio del cuello de la miosina, con cinco motivos IQ (sitios putativos de unión a la calmodulina) y un largo dominio de cola de 1359 aminoácidos ( Figura 8).

El gen MYO7A codifica para la miosina-VIIA, que pertenece a una clase de motores moleculares o proteínas motoras, evolutivamente conservadas, actino-dependientes, conocida como la superfamilia de la miosina. Las miosinas interactúan con la actina y a través de la hidrólisis de ATP, se mueven a lo largo de los filamentos de actina debido a la generación de fuerza mecánica. Hay al menos 15 diferentes clases de miosinas. Las 15 clases fueron derivadas por una comparación filogenética de sus dominios motores conservados y enumeradas de acuerdo a su orden de descubrimiento.

Mediante estudios de inmunolocalización, se demostró que la proteína miosina VIIA, es expresada en los tejidos involucrados en la patología del Síndrome de Usher: células ciliadas internas y externas del órgano de Corti y epitelio pigmentario retiniano (EPR).



**Figura 8.** Estructura del gen MYO7A.

Representación gráfica de la estructura del gen de MYO7A, con sus dominios principales: Dominio Motor o cabeza motora, dominio de cuello con cinco motivos IQ y dominio de cola, con sus motivos principales. También se muestra la localización de las mutaciones encontradas hasta la fecha, con relación a los motivos específicos dentro del gen. Las mutaciones están distribuidas de forma uniforme a lo largo del gen, sin mostrar un hot spot específico. (Tomado de Kimberling, et al., 1997)

- *Expresión de MYO7A en la Cóclea y la Retina:*

Los efectos retinianos de USH1B, parecen ser debidos a la falta MYO7A en el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y las capas de células fotorreceptoras de la retina (Weil et al., 1996). Un estudio de la expresión del gen MYO7A durante el desarrollo de la retina en humanos reveló, la expresión de MYO7A en el EPR a las cinco, siete y ocho semanas de desarrollo. Durante este temprano estado de desarrollo de la retina, no se detectaron transcritos en la retina neural. A las 19 semanas, la expresión de MYO7A se hace evidente en la retina neural y está confinada a la capa de fotorreceptores. En la edad adulta, la expresión de MYO7A, se detecta específicamente dentro de las células fotorreceptoras: los conos y los bastones (el-Amraoui et al., 1996). Es interesante observar que la más alta concentración de la proteína Miosina VIIA está localizada en los cilios conectores tanto de los conos como de los bastones y rodeando las dupletas de microtúbulos, cerca de la membrana plasmática (Liu et al., 1997).

Por otro lado, mediante inmunohistoquímica, la proteína Miosina VIIA ha sido localizada en los estereocilios apicales y el citoplasma de las células ciliadas de la cóclea y el sistema vestibular, en el oído interno (Hasson et al., 1997). El dominio de cola de la proteína MYOVIIA, puede interactuar con una proteína de anclaje, para estabilizar los estereocilios de las células de la cóclea y los cilios conectores de los fotorreceptores retinianos (Goodyear and Richardson, 1998)

Aunque los tipos celulares específicos en la retina y la cóclea con respecto a la expresión del gen MYO7A, son conocidos, en la actualidad, la función particular de la proteína MYOVIIA en estos tipos celulares particulares permanece sin esclarecer. Varios fenómenos diferentes, basados en la actina, que ocurren en las células ciliadas y en los fotorreceptores, incluyendo la fagocitosis de los segmentos de los discos exteriores por las células del EPR, el transporte de organelos, y la liberación de neurotransmisores, han sido postulados como vías potenciales que podrían afectarse con una proteína miosina VIIA ausente o defectuosa.

### 2.5.2. Síndrome de Usher Tipo II

El primer locus del Síndrome de Usher tipo II, fue localizado por Kimberling y colaboradores (co-investigadores en USA), al realizar un estudio de 8 familias, encontrando un ligamiento a 3 marcadores en la región distal del brazo largo del cromosoma 1 (Kimberling et al., 1990). La heterogeneidad genética del Síndrome de Usher tipo II, fue reconocida en un familia que no mostró ligamiento a marcadores en 1q41 (Pieke- Dahl et al., 1991). Este locus, fue luego localizado en el cromosoma 5q. De esta forma se designó como USH2A al subtipo del Síndrome de Usher tipo II, que muestra ligamiento a marcadores en el cromosoma 1q41 y USHB al subtipo localizado en el cromosoma 5q.

- **Tipo IIA (USH2A): Identificación del Gen para el Tipo IIA**

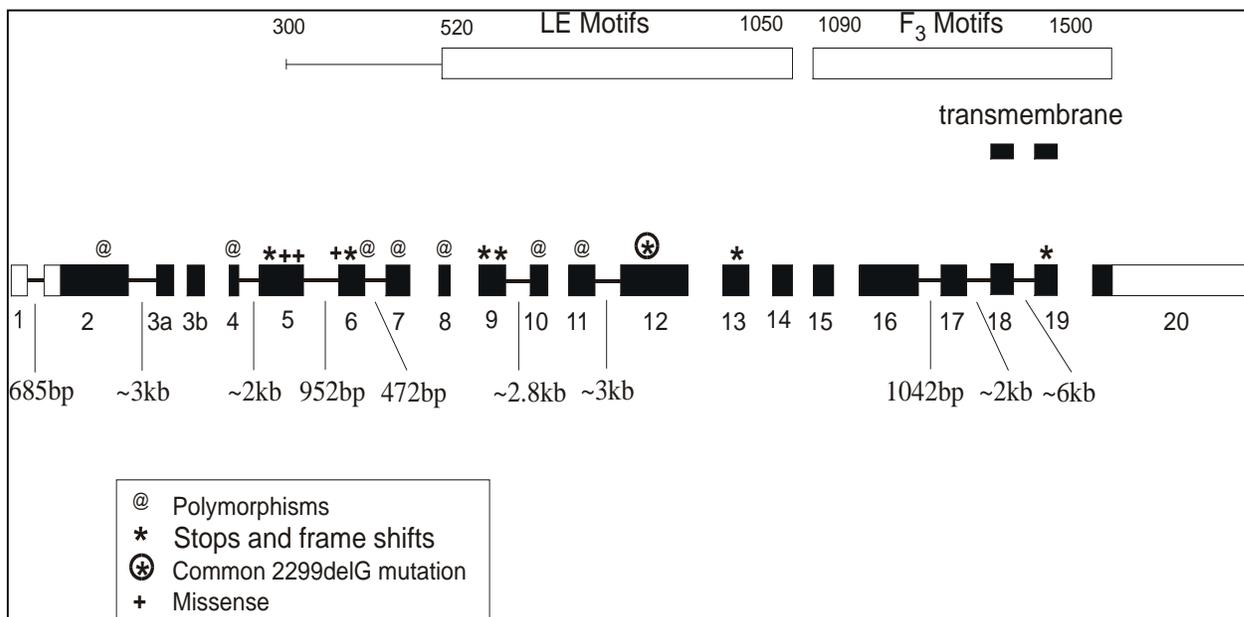
El segundo gen del Síndrome de Usher en ser identificado, fue el gen USH2A. Este gen fue identificado en 1998, por el grupo del Boys Town National Research Hospital, que dirige el Dr. William Kimberling. (Eudy et al., 1998). Aunque, en un comienzo se creía que el fenotipo del Síndrome de Usher tipo I era el más común, estudios recientes sugieren que el fenotipo del tipo II es tan prevalente o aún más que el del tipo I. Las mutaciones en el gen USH2A, pueden contar para cerca de la mitad de todos los tipos en general, de Síndrome de Usher.

El gen, que parece ser un gen nuevo, contiene 10 motivos de factor de crecimiento epidérmico tipo laminina (LE), seguidos por 4 motivos de fibronectina tipo III (F3). Estos tipos de motivos proteicos han sido observados en proteínas que conforman la matriz extracelular y en las moléculas de adhesión celular y de hecho, miembros de la superfamilia de las lamininas, son unos de los componentes más comunes de las membranas o láminas basales en todos los tejidos y el motivo LE es común en proteínas de la matriz extracelular.

El grupo de Kimberling y colaboradores propusieron llamar Usherina a la proteína producida. Usherina parece tener una señal para el transporte a través de la membrana celular. Kimberling y colaboradores, han lanzado la hipótesis de que la proteína podría ser, debido a la homología que presenta con motivos de otras

proteínas, un componente de la lámina basal o una molécula de adhesión celular que anclaría la célula a la lámina basal. El patrón de expresión del gen USH2A, está virtualmente confinado a la retina y la cóclea.

El mismo grupo, después de descubrir el gen USH2A, realizó un screening para mutaciones de 96 casos de Síndrome de Usher tipo II, en una región limitada del gen y se encontraron 3 mutaciones non-sense diferentes. Una de las mutaciones 2299delG, fue encontrada en cerca de 31/192 de los cromosomas USH2 y representa la mutación más común. La figura 9 muestra la estructura del gen USH2A. El gen tiene 21 exones y una longitud aproximada de 110 a 140kb.



**Figura 9. Estructura del Gen USH2A.**

Las repeticiones de motivos LE y F<sub>3</sub> (Fibronectina tipo III), son mostrados junto con la región putativa identificada como un componente transmembranal. La mayoría de las mutaciones missense han sido identificadas en la región 5' y fuera de regiones con función reconocida hasta el momento (Tomado de Eudy et al., 1998)

- ***Expresión de US2A en la Retina y la Cóclea:***

Análisis de Northern Blot de una variedad de tejidos humanos, detectaron transcritos de USH2A en la retina y la cóclea. Es posible que Usherina sea un componente crítico bien sea del laberinto membranoso de la cóclea o de la membrana tectoria. En la retina, es factible que Usherina sea un componente de la matriz extracelular especializada que rodea los fotorreceptores y las células de Muller.

### **2.5.3. Síndrome de Usher Tipo III**

Usando marcadores microsatélite altamente polimórficos para una búsqueda sistemática del locus para USH3, Sankila y colaboradores (1994, 1995), mediante análisis de ligamiento génico asignaron el locus a 3q21-q25. Joensuu y colaboradores (2001), identificaron el gen candidato USH3. El gen USH3 presenta dos dominios transmembranales y no muestra homología a genes conocidos. Mediante RT-PCR, se encontró que se expresa en varios tejidos humanos, incluyendo la retina.

## **2.6. BASES TEORICAS DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES**

Cuando un trastorno genético que parecer ser una entidad única, se analiza meticulosamente como en el caso del Síndrome de Usher, es frecuente hallar que resulta ser genéticamente heterogéneo. Esto es, el trastorno incluye varios fenotipos que son similares, pero en realidad están determinados por genotipos diferentes. En estos casos, el análisis molecular entra a jugar un papel muy importante en el reconocimiento de la heterogeneidad genética y por ende en el diagnóstico de la enfermedad. Además, el análisis molecular y particularmente el análisis de ligamiento y la conformación de haplotipos resultante, brindan la posibilidad, en el caso de las enfermedades autosómicas recesivas, de identificar a los heterocigotos o portadores sanos, lo cual constituye una herramienta valiosísima en la consejería genética de los afectados y sus familias.

### **2.6.1. Análisis de Ligamiento Génico**

Muchas veces se quiere obtener información acerca de una enfermedad donde no se conoce la localización exacta del gen causante dentro del cromosoma; o bien cuando una enfermedad presenta heterogeneidad genética y se necesita conocer cual de todos los posibles loci es el implicado; para todos estos casos se utiliza el Análisis de Ligamiento Génico. El principal valor del análisis de ligamiento génico en genética humana y médica es ayudar a la identificación, el mapeo y el diagnóstico de los genes que provocan enfermedad hereditaria.

El ligamiento génico puede ser explicado como la violación a la primera ley de Mendel: “Segregación independiente”. Esta ley dice que los alelos en dos lugares cromosómicos diferentes (loci) se segregan independientemente y son transmitidos al azar a la progenie. Segregación no-independiente ocurre cuando dos loci están localizados bastante cerca uno de otro, en un mismo cromosoma. A medida que la distancia entre dos loci aumenta, la fracción de recombinación (RF) también aumenta.

Entre menor sea la fracción de recombinación quiere decir que dos loci están más cerca, es decir, mayor la probabilidad de que hereden juntos.

En conclusión, el ligamiento génico puede definirse como, la medición de la tendencia de alelos muy cercanos en el mismo cromosoma a segregarse o transmitirse juntos (es decir “ligados”), como una unidad intacta a través de la meiosis, en estudios familiares. Entonces, en ciertas familias, es posible identificar genéticamente la herencia de un determinado gen, siguiendo la transmisión de otros loci estrechamente ligados, que se denominan “loci marcadores” (Thompson & Thompson, 1996).

Algunas regiones del genoma se caracterizan por tener secuencias de DNA que pueden ser distintas entre diversos individuos, siendo estas diferencias de tipo neutral (no tienen una repercusión fenotípica y no aumentan ni disminuyen la viabilidad del individuo). Cuando estas diferencias se pueden detectar, y estas secuencias están localizadas en regiones específicas del genoma, se les denomina “marcadores”. Para que estos marcadores sean informativos, deben corresponder a secuencias polimórficas, que al ser analizadas en la población presenten dos o más alelos, con una frecuencia de 1% o más.

Los marcadores más polimórficos son del tipo microsatélite, que consisten en repeticiones en tandem de di, tri y tetranucleótidos, repetidos entre 15 y 60 veces. Para un estudio en particular, se seleccionan los marcadores cuya posición dentro del cromosoma a estudiar sea conocida y estén bastante cerca al gen de interés (Ott, 1992; Terwillinger, 1994). Estos microsatélites pueden ser analizados por PCR, amplificando los alelos que difieren en tamaño por la cantidad de unidades repetidas. Los productos amplificados por PCR pueden ser tipificados manualmente, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y visualizados mediante tinción de plata o bien se puede realizar la genotipificación usando un secuenciador automático. En este caso, el secuenciador automático analiza las moléculas de DNA, que han sido marcadas fluorescentemente con varios colores. Después de que las muestras se cargan en el gel del sistema, durante la electroforesis, un detector láser detecta y graba la señal fluorescente. La señal de salida resultante, es en forma de perfiles de

intensidad para cada uno de los diferentes fluoroforos coloreados, pero la información resultante es simultáneamente guardada de manera electrónica. Esto disminuye posibles fuentes de errores, con respecto a la alternativa manual.

Por regla general, después de haber tipificado una determinada familia con marcadores informativos, para saber si hay o no ligamiento, se usa la fórmula del **lod score (Z)**, que según se ha demostrado es el estadístico más eficiente para evaluar el ligamiento. Esta fórmula fue introducida por Morton en 1955 y se fundamenta en la comparación del logaritmo de las probabilidades de observar ligamiento ( $\theta$ ) sobre el logaritmo de la probabilidad de no-ligamiento (0.5),  $Z = \log(\theta) / \log 0.5$ . Cuando  $Z > 3$ , la probabilidad de ligamiento/no-ligamiento es  $> 1000 : 1$ , es decir existe evidencia de ligamiento. Valores de Z menores a -2, excluyen ligamiento en esa región. Estos análisis son generalmente realizados por programas de computador como LINKAGE (Lathrop et al. 1992). Este programa analiza la información y da una serie de resultados los cuales son interpretados por el investigador, para poder determinar si existe ligamiento o no entre el gen de la enfermedad y los marcadores utilizados.

### **2.6.2. Secuenciación**

Cuando se conoce la secuencia (orden de los nucleótidos en un gen), ésta se puede comparar con la secuencia del gen de la familia en estudio para determinar el cambio(s) o mutaciones en los nucleótidos que dieron lugar al gen anormal. En esta técnica se amplifica el DNA por PCR utilizando DNA de cadena sencilla, el cual sirve como template o molde para sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria utilizando la enzima taq polimerasa. Además de los dNTPs precursores, se agregan ddNTPs (dideoxynucleótidos), los cuales son análogos a los dNTPs pero no poseen grupo hidroxilo en las regiones 3'C y 2'C. Estos ddNTPs son incorporados en la cadena causando una terminación abrupta de la síntesis.

Se realizan cuatro reacciones paralelas utilizando en cada una de ellas un ddNTP diferente. Utilizando concentraciones bajas del ddNTP en relación con los dNTPs, ocurren terminaciones azarosas en las posiciones que poseen el nucleótido en cuestión. Como resultado se genera una colección de fragmentos de DNA de

diferentes tamaños. Estos fragmentos que difieren en tamaño hasta por un nucleótido pueden ser separados en geles de poliacrilamida en medio denaturante. La secuencia es leída de abajo hacia arriba, en la dirección 3'-5' de la cadena complementaria al template original (Dracopoli, 1995).

Anteriormente, los métodos de secuenciación enzimática (dideoxi), empleaban radioisótopos marcados. En dicha técnica, la mezcla o mix de dNTPs contiene una proporción de nucleótidos marcados radioactivamente, los cuales son incorporados dentro de las cadenas crecientes de DNA. Después de la electroforésis, el gel es secado y se coloca un papel autoradiográfico sobre el gel. Luego de una exposición de tiempo suficiente, el papel autoradiográfico es revelado, dando como resultado un patrón característico de bandas oscuras.

Los esfuerzos recientes de secuenciación a escalas mayores, dependen del mejoramiento de la eficiencia del proceso, mediante la automatización parcial de las técnicas involucradas. Un progreso importante, en años recientes ha sido el desarrollo de procedimientos automatizados, mediante la secuenciación por fluorescencia del DNA. Estos procedimientos generalmente usan dideoxinucleótidos a los cuales se pegan fluoroforos (grupos químicos que tienen la propiedad de fluorescencia). Durante la electrofóresis, un monitor detecta y graba la señal fluorescente a medida que el DNA pasa a través de un punto determinado en el gel. El uso de diferentes fluoroforos en las cuatro reacciones base- específicas, significa que, a diferencia de la secuenciación convencional de DNA, todas las cuatro reacciones pueden ser montadas en una sola línea. La señal de salida resultante, es en la forma de perfiles de intensidad para cada uno de los diferentes fluoroforos coloreados, pero la información resultante, es simultáneamente guardada de manera electrónica. Esto evita y excluye los errores de transcripción de datos, cuando una secuencia interpretada es digitada a mano dentro de un archivo de computador. Estos avances recientes en la tecnología significan que la exactitud y la eficiencia en la secuenciación de DNA, usando métodos automatizados, es bastante alta. (Strachan, 1999).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer y evaluar un modelo de abordaje para el estudio del Síndrome de Usher, que abarca el diagnóstico clínico de los pacientes, establecimiento y confirmación del subtipo mediante estudios moleculares y posterior correlación genotipo-fenotipo; en dos familias colombianas.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.** Clasificar a los individuos afectados, dentro de los tipos clínicos del Síndrome de Usher I, II o III; mediante la realización de una evaluación clínica completa que incluya valoraciones oftalmológica, audiológica, vestibular y genética en cada paciente de las dos familias estudiadas.
- 2.** Determinar el subtipo al que pertenece cada afectado, mediante la realización de estudios de ligamiento génico, utilizando marcadores altamente polimórficos para los 9 loci responsables del Síndrome de Usher, descritos hasta el momento.
- 3.** Identificar el tipo de mutación presente en cada familia.
- 4.** Establecer una correlación fenotipo-genotipo en los individuos afectados de las dos familias incluidas en este estudio.
- 5.** Resaltar la importancia de la asesoría genética a los individuos afectados y a sus familias.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. TIPO DE ESTUDIO**

Este es un estudio de tipo descriptivo y analítico. La metodología propuesta constó de 3 fases principales que fueron:

- . *Valoración Clínica y genética:* En la cual se realizaron los exámenes oftalmológicos, audiológicos y vestibulares, así como también se realizó la evaluación genética y la elaboración de los árboles genealógicos de cada familia, los cuales son indispensables para los estudios moleculares.

- . *Estudios Moleculares:* Para cuya realización se tomaron muestras de sangre a los individuos afectados y a sus familiares, para la extracción de DNA, el cual se utilizó para los análisis de ligamiento y la detección de mutaciones.

- . *Correlación Fenotipo- Genotipo* y análisis del resultados obtenidos, para comprobar la eficacia del modelo de estudio propuesto.

### **4.2. POBLACION OBJETO DE ESTUDIO**

Se evaluaron 6 personas afectadas de Síndrome de Usher y pertenecientes a dos informativas familias colombianas. Para la realización del análisis de ligamiento se evaluaron además a los padres y hermanos sanos de los afectados.

Los casos estudiados hacen parte de familias detectadas por el Programa de Estudios Genéticos en Enfermedades Visuales y Auditivas del Instituto de Genética Humana y la Fundación Oftalmológica Nacional mediante la realización de estudios de tamizaje en 1715 individuos sordos institucionalizados en Colombia. Se escogieron los individuos afectados pertenecientes a grupos familiares grandes, informativos y con 2 o 3 generaciones, pues estos grupos son de mayor valor para la detección del ligamiento genético.

### **4.3. VALORACION FENOTIPICA**

La valoración clínico-genética de los pacientes se llevó a cabo en la ciudad de Bogotá.

#### **4.3.1. Evaluación Oftalmológica**

La evaluación oftalmológica comprendió un examen externo del globo ocular y sus anexos. También se aplicaron exámenes de biomicroscopia y tonometría.

Una vez hecha esta valoración, se dilató la pupila para realizar el examen de Fondo de Ojo. A los individuos afectados se les realizaron exámenes especiales como el Electroretinograma (ERG), Campimetría de Goldman, Fotos a color de fondo de ojo y Angiografía fluoresceínica.

Los datos del examen ocular quedaron debidamente registrados en la hoja de historia oftalmológica de cada paciente. El examen oftalmológico completo se realizó en las instalaciones de la Fundación Oftalmológica Nacional.

#### **4.3.2. Evaluación Audiológica y Vestibular**

La pérdida auditiva de cada individuo afectado fue cuantificada mediante la realización de una Audiometría tonal completa. Este examen se llevó a cabo en el Departamento de Otorrinolaringología y Fonoaudiología del Hospital San Ignacio.

La sordera se clasificó como: Leve (20dB- 40dB), moderada (40dB- 70dB), severa (70dB- 90dB) o profunda (más de 90dB), según los rangos en que se encontrara la audición de cada uno de los afectados.

Para evaluar la función vestibular se realizaron vestibulares como Electronistagmograma y Test de Romberg.

### **4.3.3. Evaluación Clínico-Genética**

El médico genetista realizó una evaluación clínico-genética general a todos los individuos involucrados. Se les aplicó un formato de historia clínica y un completo interrogatorio donde se tomaron los datos correspondientes a la historia familiar y personal. Se realizó un examen físico haciendo énfasis en los aspectos que pudieran tener relevancia genética. Estas evaluaciones fueron realizadas en el consultorio de genética de la Fundación Oftalmológica Nacional. En esa consulta, el genetista organizó la información obtenida para elaborar el árbol genealógico de cada grupo familiar particular, ubicando al o a los individuos afectados dentro de cada grupo, haciendo énfasis en las relaciones de parentesco e indagando si existe consanguinidad entre los padres y el grado de ésta.

Cada paciente fue debidamente informado acerca de los objetivos del trabajo, y recibió junto a su familia una asesoría genética inicial sin costo alguno. Cada individuo participante firmó un consentimiento, donde constata su participación voluntaria en el estudio.

## **4.4. VALORACIÓN GENOTÍPICA**

### **4.4.1. Toma de Muestras**

A todos los individuos afectados y a algunos de sus familiares (padres y hermanos sanos), se les tomó muestra de sangre para los estudios moleculares. Todas las personas a quienes se les tomó muestra de sangre firmaron previamente el informe de consentimiento (Anexo 1), en donde se explica el propósito del estudio y el manejo adecuado de la muestra. A ningún individuo se le tomó muestra de sangre sin previa autorización. Se tomaron aproximadamente 14 ml de sangre mediante punción en la vena.

#### **4.4.2. Extracción de DNA**

A partir de 14cc de sangre periférica. Se centrifuga para separar la capa de leucocitos; se lisan las células y se hace extracción de DNA utilizando el protocolo estándar de extracción con Fenol-Cloroformo, precipitación con etanol y resuspensión con Tris-EDTA (Sambrook, 1989). Se realizó chequeo en geles de agarosa (0,8%), se ajustó la concentración y se almacenaron los DNAs extraídos a – 20°C hasta su análisis.

La extracción de DNA se realizó en los laboratorios del Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana.

#### **4.4.3. Estudios de Ligamiento Génico**

Se realizaron estudios de ligamiento génico con marcadores microsatélite altamente polimórficos cercanos a los 9 loci conocidos para el Síndrome de Usher, en el laboratorio del Dr. William Kimberling (Boys Town National Research Hospital. Omaha, Nebraska). Dichos marcadores son los universalmente aceptados por el Consorcio del Síndrome de Usher y representan aquellos que más probablemente flanquean los genes Usher (Tabla 2).

De acuerdo a la clasificación fenotípica obtenida para cada familia en la fase anterior, se comenzó la genotipificación con los marcadores para los loci respectivos del tipo clínico previamente determinado. Tomando en consideración, que los subtipos más comunes de Síndrome de Usher y que cuentan para un alto porcentaje de todos los casos son: El subtipo USH1B y el subtipo USH2A; la genotipificación para el Tipo I y el Tipo II comenzó con los marcadores para estos dos loci (11q13.5 y 1q41 respectivamente). La información concerniente a estos marcadores y la secuencia de primers usados se muestran en las tablas 3 y 4.

Los marcadores altamente informativos fueron amplificados por PCR utilizando pares de primers específicos para cada marcador microsatélite. La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las temperaturas y ciclos requeridos para

cada marcador. Una vez amplificados estos marcadores, los productos fueron denaturados y corridos en geles de poliacrilamida al 4.25% en el secuenciador automático ABI PRISM 377. El análisis de los fragmentos se llevó a cabo usando el software que provee el equipo, GENESCAN 2.1. Los datos de la genotipificación fueron colectados y analizados con el uso de GENOTYPER 2.0.

Se llevó a cabo un análisis de ligamiento multipunto, que analiza más de dos marcadores simultáneamente. Los LOD score multipunto fueron generados mediante la opción LINKMAP del programa LINKAGE para cada una de las familias. El análisis de ligamiento multipunto requiere hacer supuestos acerca de las distancias entre los loci marcadores y su orden relativo dentro del cromosoma. Esta información fue obtenida en Genome Data Base (GDB- Johns Hopkins y Whitehead Data Base <http://gdb.weizmann.ac.il/>)

Para todos los análisis se asumió el patrón de herencia recesivo para el Síndrome de Usher, con penetrancia completa para los homocigotos. Y se utilizó una frecuencia génica para el alelo mutante de 0.001.

La genotipificación fue realizada por el grupo del Dr. William Kimberling en los laboratorios del Boys Town National Research Hospital (Omaha, Nebraska), como parte de una asesoría y colaboración internacional .

**Tabla 2.** Marcadores utilizados para el análisis de Ligamiento en Síndrome de Usher

Locus	Crom	Marcador	Longitud (Tamaño)	Referencia
USH1A	14q	D14S78 D14S250 D14S51 D14S292 D14S260	211-233 157-179 131-149 110-118	(Kaplan, 1992)
USH1B	11q	D11S527 D11S4186 D11S911 D11906	142-166  159-203 291-303	(Kimberling, 1992)
USH1C	11p	D11S902 D11S921 D11S4160 D11S899	145-163 243-303  87-111	(Smith, 1992)
USH1D	10q	D10S529 D10S195 D10S202 D10S573	144-160 170-184 83 - 93 169-175	(Wayne, 1996)
USH1E	21q	D21S1905 D21S1913 D21S1914 D21S265	177-199 105-121 203-221 244-258	(Chaib, 1997)
USH1F	10q	D10S199 D10S225 D10S539 D10D596	173-200 262-278 96-114 262-274	(Wayne, 1997)
USH2A	1q	D1S245 D1S556 D1S237 D1S229 D1S227 TGFB2 PPOL		(Kimberling, 1990)
USH2b	5q	D5S426 D5S424 D5S433 D4S436	183-209 116-146 192-220 234-254	(Pieke-Dahl, 1998)
USH3	3q	D3S1299 D3S1555 D3S1279 D3S1308	218-228 221-237 264-282 104-112	(Sankila, 1995)

**Tabla 3.** Marcadores para Análisis de Ligamiento a USH1B (MYO7A)

MARCADOR	LOCUS	HETEROG. GENETICA MAXIMA	NUMERO DE ALELOS	LONGITUD (TAMAÑO)	PRIMERS
<u>D11S527</u> (Dinucleotido)	11q 13.5	0.8830	12	142-166	GCCCCTCTACTTGTCTGGAG ATGCGGCTCCAAGACAAGTTC
<u>D11S4186</u> (Dinucleotido)	<u>11pter-</u> <u>11qter</u>	0.7929	13	154 - 175	ATTCTCCCAATCTATCGCTC GGGCAGTAATGATGATGTG
<u>D11S911</u> (Dinucleotido)	11q13- 11q23	0.8621	13	159- 203	CTTCTCATGCTTGACCATTT CTTCTGAACAATTGCCACAT
<u>D11S906</u> (Dinucleotido)	11q14.3- 11q21	0.7462	7	291-303	AGCTGGGCACCGATAGTAGT GCACAGGCAAAGANGAGGTA

**Tabla 4.** Marcadores para Análisis de Ligamiento a USH2A

MARCADOR	LOCUS	HETEROG. GENETICA MAXIMA	NUMERO DE ALELOS	LONGITUD (TAMAÑO)	PRIMERS
D1S245 (Dinucleotido)	1q41	0.83	10	235-253	GACCCCTTTACCTGAGGC CGCTTTGATAGATTTAGCACTG
D1S556 (Dinucleotido)	<u>1pter-</u> <u>1qter</u>	0.83	12	198	CTGTACCTTGTTGGCTTATGAT TATACAGTATTTCCCTTTGAAGC
<u>D1S237</u> (Dinucleotido)	1q32- 1q41	0.7668	10	109-139	AGGTCCAGGTTTGAATCTTGCC TACACCGAGGTAAGTGGTTGCG
D1S229 (Dinucleotido)	1q38- 1q44	0.78	8	191-207	TTAGAAATGCAGGANCTATTC GCCATTCTGATGAGGTCNTAG
D1S227 (Dinucleotido)	1q41	0.68	7	111-125	GCTTCTGGCCTCTGTCA AATTTTGCCTGTGTGTGC
TGFB2	1q41- 1q41	0.52	5	156-168	ACCCGACCGAGTACCGAGCG TGAGAGCAGGAGCAGCAGCA
PPOL	1q41- 1q42	0.63	6	85-99	TGTCCAACAGCAGATAAGTG CAATTCATTCATGTTACTGTCA

#### 4.4.3. Detección de Mutaciones

La detección de mutaciones presentes en los afectados de estas dos familias se realizó en el laboratorio del Dr. William Kimberling (Boys Town National Research Hospital, Omaha, Nebraska).

El abordaje para detectar las mutaciones fue diferente dependiendo del subtipo de Síndrome de Usher establecido previamente mediante el análisis de ligamiento.

En el caso de mutaciones en el gen MYO7A (USH1B), se realizó secuenciación automática de cada uno de los exones para identificar los posibles cambios o mutaciones presentes. El grupo del Dr. Kimberling, ha encontrado que es más eficiente el no recurrir al uso de heteroduplex o SSCP y en cambio si, pasar directamente a la secuenciación como una alternativa efectiva para la detección de mutaciones.

La secuenciación se realizó en el secuenciador automático ABI PRISM 310, usando el kit de secuenciación ABI PRISM diseñado para secuenciación con fluorescencia, que incluye la Ampli TAQ DNA Polymerasa, los dNTPs y los ddNTPs terminadores. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software de secuenciación ABI PRISM Sequence Module. Las secuencias de los primers usados para secuenciación, han sido previamente determinadas por el grupo colaborador en el Boys Town National Research Hospital en Omaha.

En cuanto a la detección de mutaciones en el gen USH2A, se procedió en primer lugar a realizar un tamizaje con enzimas de restricción para la mutación 2299delG, ya que es la mutación más común y cuenta para la mayoría de los casos del Síndrome de Usher USH2A.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ESTUDIOS FAMILIARES

El interrogatorio detallado y los estudios clínicos en los miembros de las dos familias permitieron la elaboración de los árboles genealógicos que se muestran en las figuras 10 y 11. En ellos se evidencia el patrón de herencia Autosómica recesiva que caracteriza al Síndrome de Usher.

En la familia 1, se encontró una mujer y dos hombres afectados, con edades entre los 31 y 41 años, cuyos padres no son consanguíneos.

En la familia 2, se encontraron 3 mujeres afectadas cuyas edades oscilan entre los 31 y 46 años. Se ve claramente que existe consanguinidad entre los padres de las afectadas.

Las dos familias son numerosas y cuentan también con hermanos sanos de los afectados.

### 5.2. HALLAZGOS FENOTIPICOS- EVALUACION CLINICA

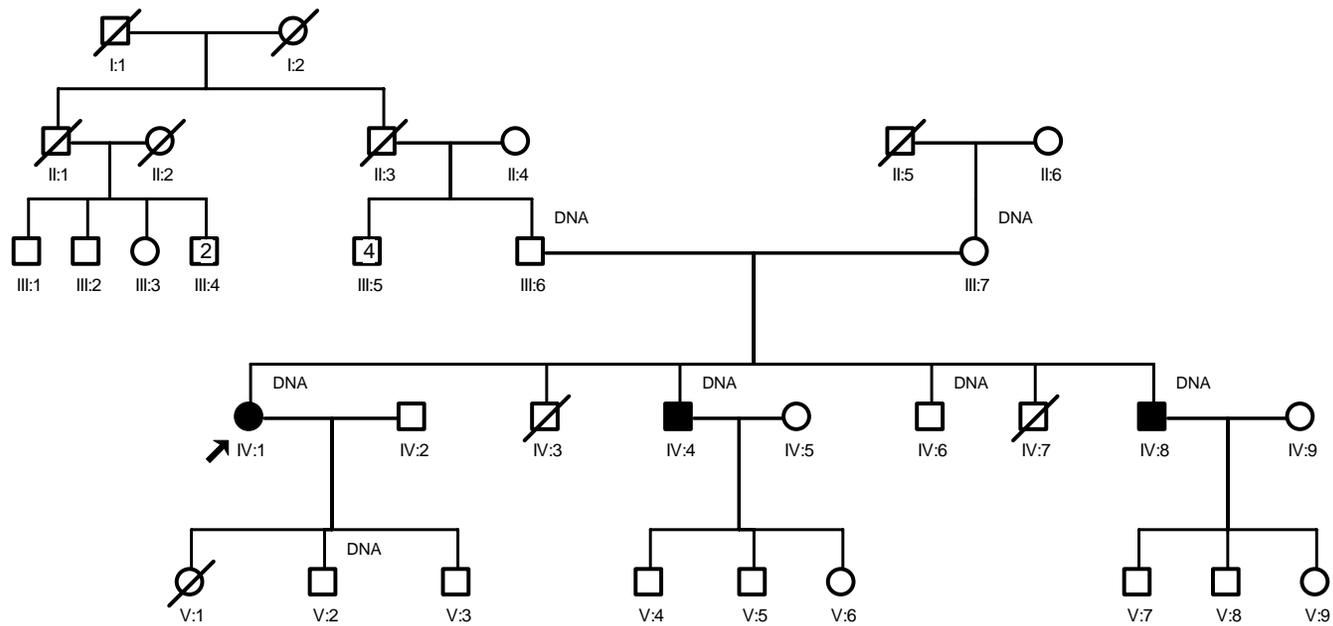
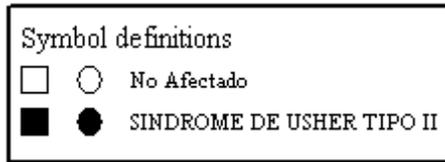
#### 5.2.1. FAMILIA 1

##### 5.2.1.1. Antecedentes Personales

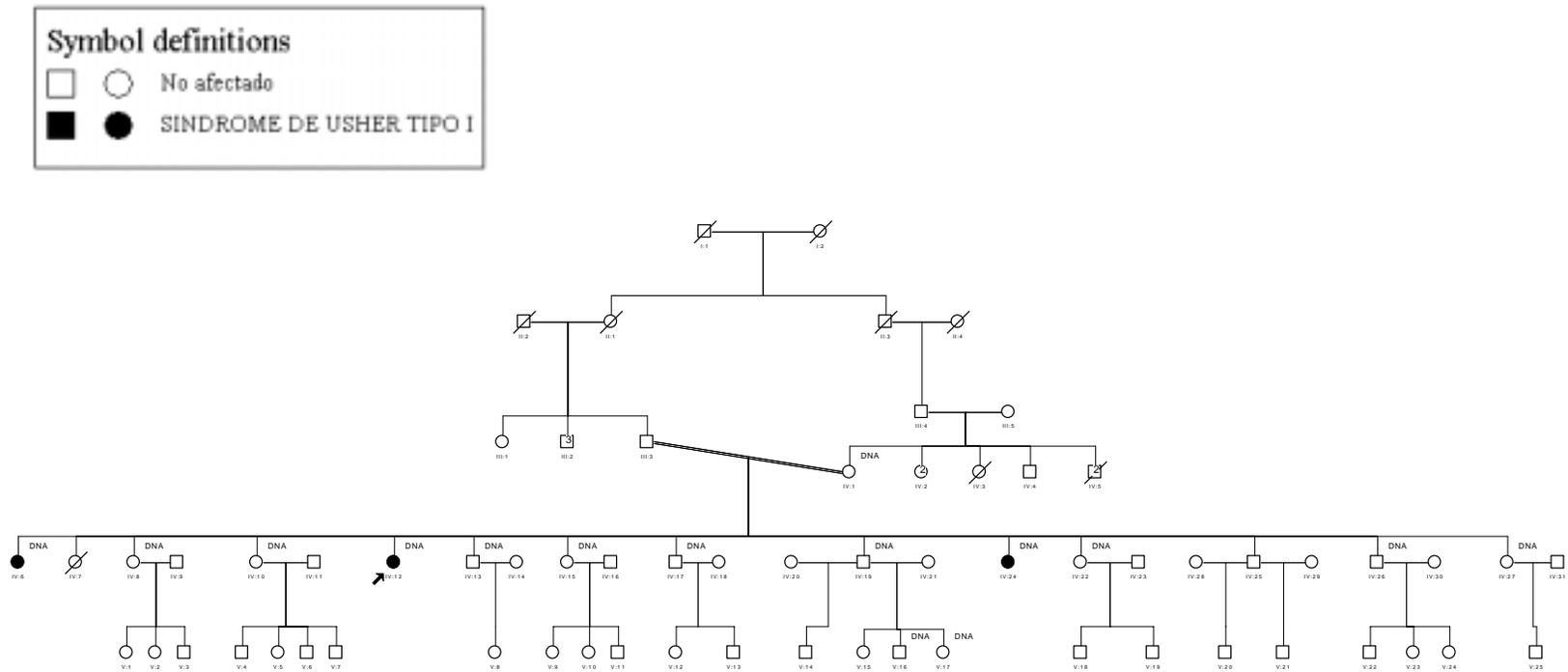
*AFECTADO 1 (Mujer de 41 años):* Hipoacusia neurosensorial severa bilateral congénita. Trastorno visual progresivo y Nictalopía desde los 20 años.

*AFECTADO 2 (Hombre de 37 años):* Hipoacusia neurosensorial severa bilateral congénita. Alteración visual progresiva y Nictalopía desde los 18 años.

*AFECTADO 3 (Hombre de 31 años):* Hipoacusia neurosensorial severa bilateral congénita. Trastorno visual progresivo desde los 17 años.



**Figura 10.** Arbol Genealógico de la Familia 1



**Figura 11.** Arbol Genealógico de la Familia 2

### **5.2.1.2. Examen Oftalmológico**

#### *FONDO DE OJO:*

Los 3 afectados presentaron un patrón de Retinitis Pigmentosa Típica. Los hallazgos de fondo de ojo fueron bastante homogéneos en los afectados, encontrando como únicas diferencias una menor a mayor atenuación de los vasos acorde con la edad del afectado y una mayor acumulación de pigmento en forma de espículas de hueso también directamente proporcional a la edad. Estas diferencias se deben al carácter progresivo de la Retinitis Pigmentosa.

En los 3 afectados se encontró: Palidez del nervio óptico, atenuación de vasos (de leve a marcada de acuerdo con la edad), trastorno del Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR) en espículas de hueso. Coloración normal de la mácula. (Figura 12).

#### *ELECTRORETINOGRAMA (ERG):*

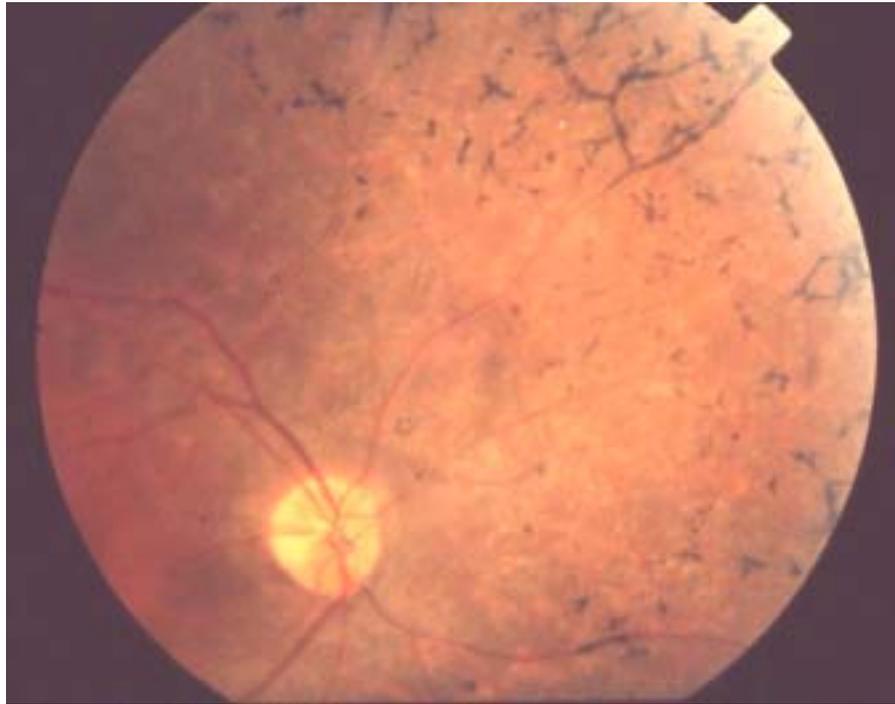
El estudio electrorretinográfico de los 3 afectados mostró amplitudes para las ondas A y B disminuidas tanto en la porción fotópica como escotópica. Estos resultados representan una alteración generalizada y avanzada de fotorreceptores en ambos ojos que es compatible con Retinitis Pigmentosa.

#### *CAMPOS VISUALES:*

En los 3 afectados se encontró una constricción marcada del campo visual. La constricción se hace más severa dependiendo de la edad, debido al carácter progresivo de la RP. Esta constricción es menor a 10, 50 y 60 grados centrales respectivamente en cada uno de los afectados.

#### *ANGIOGRAFIA:*

El estudio angiográfico de los 3 afectados muestra la presencia de palidez del nervio óptico en ambos ojos, con atenuación de los vasos sanguíneos en espículas de hueso en periferia media. No se observa presencia de espículas de hueso a nivel del polo posterior. Estos hallazgos son compatibles con RP.



**Figura 12.** Fondo de Ojo de un afectado de la Familia 1.  
Se observa el patrón de Retinitis Pigmentosa Típica, con acúmulos de pigmento en forma de espículas de hueso, atenuación de vasos y palidez del nervio óptico.

### 5.2.1.3. Evaluación Audiológica y Vestibular

#### AUDIOMETRIA

Los datos de las audiometrías muestran una Hipoacusia Neurosensorial Severa bilateral en los 3 afectados. La pérdida es mayor en las frecuencias altas que en las frecuencias bajas, mostrando un patrón típico en declive. (Figura 13)

#### PRUEBAS VESTIBULARES (ELECTRONISTAGMOGRAMA)

Los resultados de los electronistagmogramas presentan una adecuada respuesta a la estimulación calórica, lo cual representa un adecuado funcionamiento del sistema vestibular.

### 5.2.1.4. Evaluación Neurológica:

#### AFECTADO 1

##### Examen Neurológico:

- Marcha: Anormal. Atáxica. Alteración del equilibrio.
- Coordinación: Anormal .
- Romberg negativo
- Estado Mental: Desorden depresivo

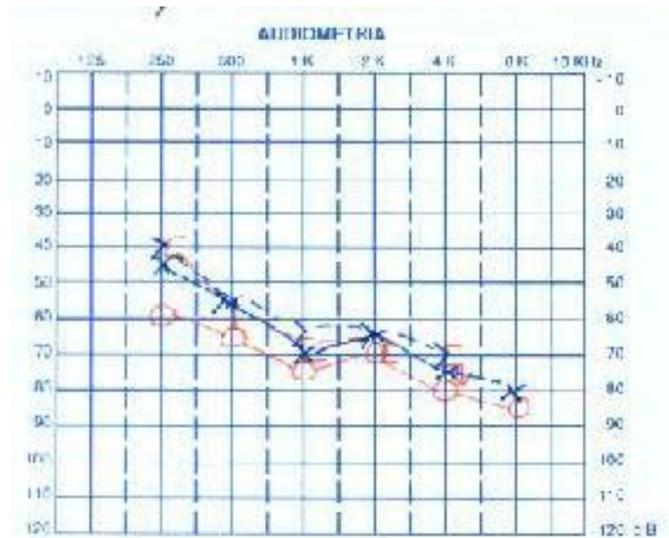
##### Resonancia Magnética Cerebral (RMC):

Ligeros cambios atróficos en el vermis superior del cerebelo, con prominencia de las folias.

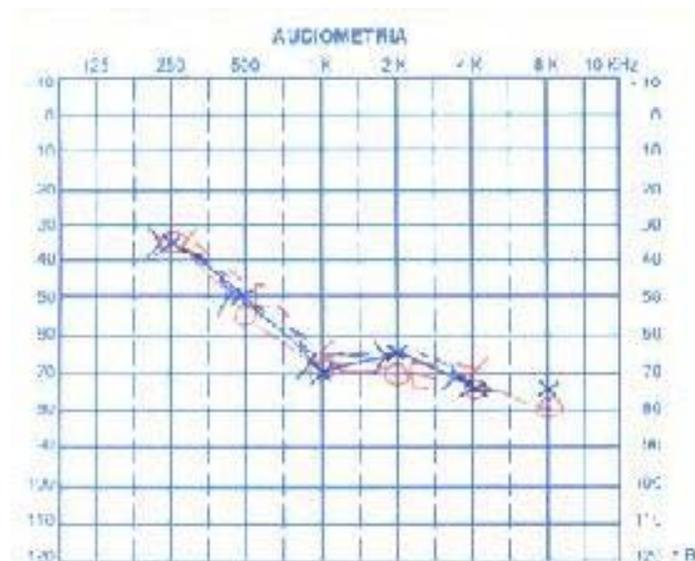
#### AFECTADO 2

##### Examen Neurológico:

- Marcha: Normal sin aumento del polígono de sustentación, ni lateropulsiones. Balanceo de brazos simétrico.
- Coordinación: Prueba dedo- nariz normal. No disimetría.
- Romberg negativo con ojos abiertos y cerrados.



a)



b)

**Figura 13.** Audiometría de dos afectados de la Familia 1, con Hipoacusia Neurosensorial Severa Bilateral y mayor pérdida en las frecuencias altas

- Movimientos Oculares: Movimientos completos. Pupilas reactivas
- Estado Mental: Normal

Resonancia Magnética Cerebral (RMC):

NORMAL

AFECTADO 3

Examen Neurológico:

- Marcha: Normal
- Movimientos Oculares: Normal
- Tono y Trofismo Muscular: Normal

Resonancia Magnética Cerebral (RMC):

Leves signos de atrofia del cerebelo, con aumento en la amplitud de las folias del vermis superior. Ligero aumento en la amplitud del espacio subaracnoideo de la cisterna magna y en la vallécula. Ligera prominencia del IV ventrículo.

### **5.2.1.5. Clasificación Fenotípica de la Familia 1**

De acuerdo con los resultados de las anteriores evaluaciones, la Familia 1 muestra un fenotipo concordante con el reportado como Síndrome de Usher Tipo II típico. La sordera es Neurosensorial, bilateral, severa (puede estar entre moderada a severa) y congénita. La función vestibular es normal. La Retinitis Pigmentosa se manifestó a finales de la segunda década de vida.

## 5.2.2. FAMILIA 2

### 5.2.2.1. Antecedentes Personales

Tres mujeres afectadas de 46, 41 y 31 años respectivamente.

En las 3 afectadas se presenta Hipoacusia neurosensorial Profunda bilateral simétrica congénita. Disminución de la agudeza visual en la primera década de vida, pero la Retinitis Pigmentosa típica se diagnostica en la segunda década. Nictalopía franca a partir de los 15 años.

### 5.2.2.2. Examen Oftalmológico

#### FONDO DE OJO:

Tal como se muestra en la figura 14, las tres afectadas mostraron un patrón característico de Retinitis Pigmentosa, presentando:

- Palidez del nervio óptico
- Atenuación marcada de vasos.
- Lesiones hipopigmentadas en Mácula.
- Gran cantidad de cúmulos de pigmento en el patrón característico de espículas de hueso, con hiperpigmentación alrededor del disco en el cuadrante nasal, en las 3 hermanas.

El cuadro encontrado en cuanto al fondo de ojo de las tres hermanas es básicamente igual. En las 3 hermanas se encontró además desprendimiento del vítreo y presencia de catarata subcapsular posterior en ambos ojos. Estos hallazgos coinciden con los encontrados en pacientes que presentan un grado avanzado de RP.



**Figura 14.** Fondo de Ojo. Retinitis Pigmentosa Típica de una mujer afectada de la familia 2.

ELECTRORETINOGRAMA:

Se realizaron electroretinogramas en las 3 mujeres afectadas. Los resultados muestran que en general la porción de la onda A correspondiente al ERG Escotópico y Fotópico no fue registrable. Sólo se registraron respuestas para la porción de la onda B correspondiente al ERG escotópico. Esto demuestra un compromiso generalizado de fotorreceptores donde su función esta casi totalmente abolida. Los resultados del ERG se presentan en la figura 15



**Figura 15.** ERG. Mujer afectada, familia 2.

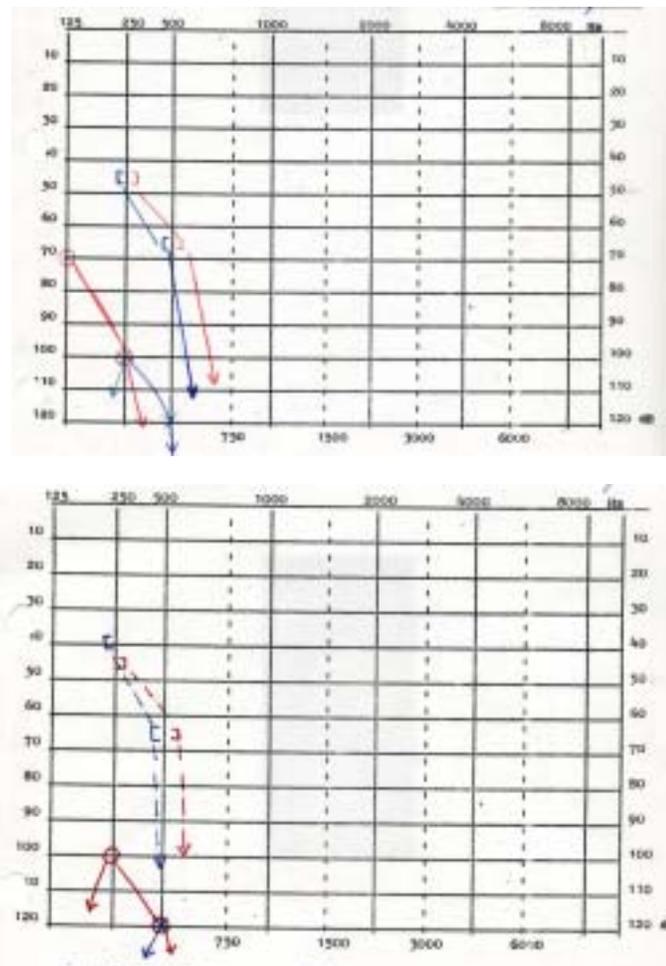
CAMPOS VISUALES:

Marcada constricción en los campos visuales de las tres afectadas, de 30° o menos, con islas de visión.

**5.2.2.3. Evaluación Audiológica y Vestibular**

AUDIOMETRIAS

Los datos de las audiometrías muestran una sordera profunda neurosensorial, siendo mayor la pérdida en las frecuencias altas, con restos de audición en las frecuencias bajas (Figura 16).



**Figura 16.** Audiometría de dos mujeres afectadas de la Familia 2, que presentan Hipoacusia neurosensorial profunda Bilateral.

PRUEBAS VESTIBULARES:

No hay franca respuesta vestibular al realizar el electronistagmograma en las 3 afectadas, lo que concuerda con un diagnóstico de alteración vestibular.

**5.2.2.4. Evaluación Neurológica**AFECTADA 1Examen Neurológico:

- Marcha: Anormal, atáxica. Marcha en tandem difícil de valorar, la marcha espontánea es inestable.
- Coordinación: Normal
- Movimientos oculares: Pares craneanos 2º, 3º y 6º, normales. Pupila isocórica. Nistagmus rotatorio espontáneo bilateral.
- Estado mental: Desorden afectivo bipolar. Retardo mental moderado.
- Tono y trofismo muscular: Normal

Resonancia Magnética Cerebral (RMC):

Atrofia del vermis del cerebelo en su mitad superior, con prominencia del espacio subaracnoideo en las folias y aumento en la amplitud de la cisterna cerebelosa superior, de la vallécula y de la cisterna magna

AFECTADA 2Examen Neurológico:

- Marcha: Anormal. Marcha en tandem inestable con lateropulsión indiferente.
- Coordinación: Normal. Prueba Dedo –náriz normal.
- Movimientos oculares: Pares 2º, 3º y 6º normales. Pupilas isocóricas reactivas a la luz. No nistagmus espontáneo ni provocado.
- Estado mental: Normal
- Tono y trofismo muscular: Normales

Resonancia Magnética Cerebral (RMC):

Normal.

### AFECTADA 3

#### Examen Neurológico:

- Marcha: Anormal. Marcha en tandem inestable con lateropulsión indiferente.
- Coordinación: Normal.
- Movimientos oculares: Normales. No nistagmus.
- Estado mental: Elaboración patológica de duelo de pérdida visual y auditiva.  
Depresión.
- Tono y trofismo muscular: Normales

#### Resonancia Magnética Cerebral (RMC):

Pérdida del parénquima nervioso en el vermis superior y hemisferios cerebelosos, con prominencia del espacio subaracnoideo en las folias, en la cisterna cerebelosa superior y en el espacio subaracnoideo que circunda el cerebelo. Mínimo aumento de tamaño del IV ventrículo

#### **5.2.2.5. Clasificación Fenotípica de la Familia 2**

De acuerdo con los resultados de las anteriores evaluaciones, la Familia 2 se clasifica fenotípicamente con Síndrome de Usher Tipo I. La sordera es Neurosensorial, bilateral, congénita y profunda. No hay oralidad. La respuesta vestibular es ausente o alterada.

La baja visión inicia en la primera década, pero se hace mucho más evidente hacia la mitad de la segunda década.

En la tabla 5, se muestra un resumen de los hallazgos clínicos de las 2 familias con su correspondiente clasificación fenotípica

**Tabla 5.** Caracterización Fenotípica y Diagnóstico Clínico de las dos Familias

FAMILIA	#	ED AD	SEX O	EVALUACIÓN OFTALMOLOGICA				EVALUACIÓN AUDIOLOGICA Y VESTIBULAR		EVALUACION NEUROLOGICA		DIAGNOSTIC O CLINICO
				Fondo de Ojo	ERG	Campo Visual	Angiografía	Audiometría	Electronis tagmograma	Examen Neurológico	Resonancia Magnética Cerebral	
Familia 1	1	41	F	RP Típica Palidez del nervio óptico. Atenuación de vasos. Trastorno EPR en espículas de hueso	Alteración generalizada de Fotorreceptores Compatible con RP	Constricción menor de 50 grados AO	Atenuación de vasos Trastorno EPR	Hipoacusia NS de moderada a severa, con mayor pérdida en frecuencias altas	Normal en los 3 afectados	Marcha: Anormal. Atáxica. Coordinación: Anormal. Romberg (-) Estado Mental: Desorden depresivo	Ligeros cambios atróficos en el vermis superior del cerebelo, con prominencia de las folias.	Síndrome de Usher Tipo II
	2	37	M							Marcha: Normal Coordinación: normal. Romberg (-) Movimientos Oculares: Normal Estado Mental: Normal	Normal	
	3	31	M							Marcha: Normal Movimientos Oculares: Normal Tono y Trofismo Muscular: Normal Romberg: Estado Mental: Depresión	Leves signos de atrofia del cerebelo,	

FAMILIA	#	ED AD	SEX O	EVALUACIÓN OFTALMOLOGICA				EVALUACIÓN AUDIOLOGICA Y VESTIBULAR		EVALUACION NEUROLOGICA		DIAGNOSTICO CLINICO
#	IND			Fondo de Ojo	ERG	Campo Visual	Angiografía	Audiometría	Electronis tagmograma	Examen Neurológico	Resonancia Magnética Cerebral	
Familia 2	1	46	F	RP Típica: Palidez del nervio óptico. Atenuación de vasos. Trastorno EPR en espículas de hueso .	No registrable Compatible con RP	Constricción menor de 30 grados AO	Atenuación de vasos Trastorno EPR	Hipoacusia NS Profunda Bilateral con mayor pérdida en frecuencias altas y restos de audición en frecuencias bajas	Respuesta vestibular ausente	Marcha: Anormal, atáxica. Coordinación: Normal Movimientos oculares: Nistagmus rotatorio espontáneo. Estado mental: Desorden afectivo bipolar <b>Tono y trofismo muscular: Normal</b>	Ligeros cambios atróficos en el vermis superior del cerebelo, con prominencia de las folias.	Síndrome de Usher Tipo I
	2	41	F							Marcha: Anormal. Coordinación: Normal. Movimientos oculares: Normales Estado mental: Normal Tono y trofismo muscular: Normales	NORMAL	
	3	31	F							Marcha: Anormal. Coordinación: Normal. Movimientos oculares: Normales Estado mental: Depresión. Tono y trofismo muscular: Normales	Pérdida del parénquima nervioso en el vermis superior y hemisferios cerebelosos	

**RP:** Retinitis Pigmentosa ; **AO:** Ambos Ojos; **EPR:** Epitelio Pigmentario de la Retina; **NS:** Neurosensorial

### 5.3. HALLAZGOS GENOTÍPICOS- ESTUDIOS MOLECULARES

#### 5.3.1. FAMILIA 1

En el estudio de ligamiento para la familia 1, se analizaron un total de 8 individuos, incluyendo 1 mujer y 2 hombres afectados, 1 mujer no afectada y 4 hombres no afectados. La segregación de los alelos identificados para los 7 marcadores microsatélite se muestra en cada uno de los individuos en la figura 18.

Se realizó un análisis de ligamiento multipunto, dando como resultado un ligamiento a los marcadores dinucleótidos D1S245, D1S556, D1S237, D1S229, D1S227, TGFB2 y PPOL para el cromosoma 1q41, que corresponde al subtipo de Síndrome de Usher USH2A. Se obtuvo un LOD score multipunto positivo de  $Z_{\text{máx}}=1.329$  (Tabla 6).

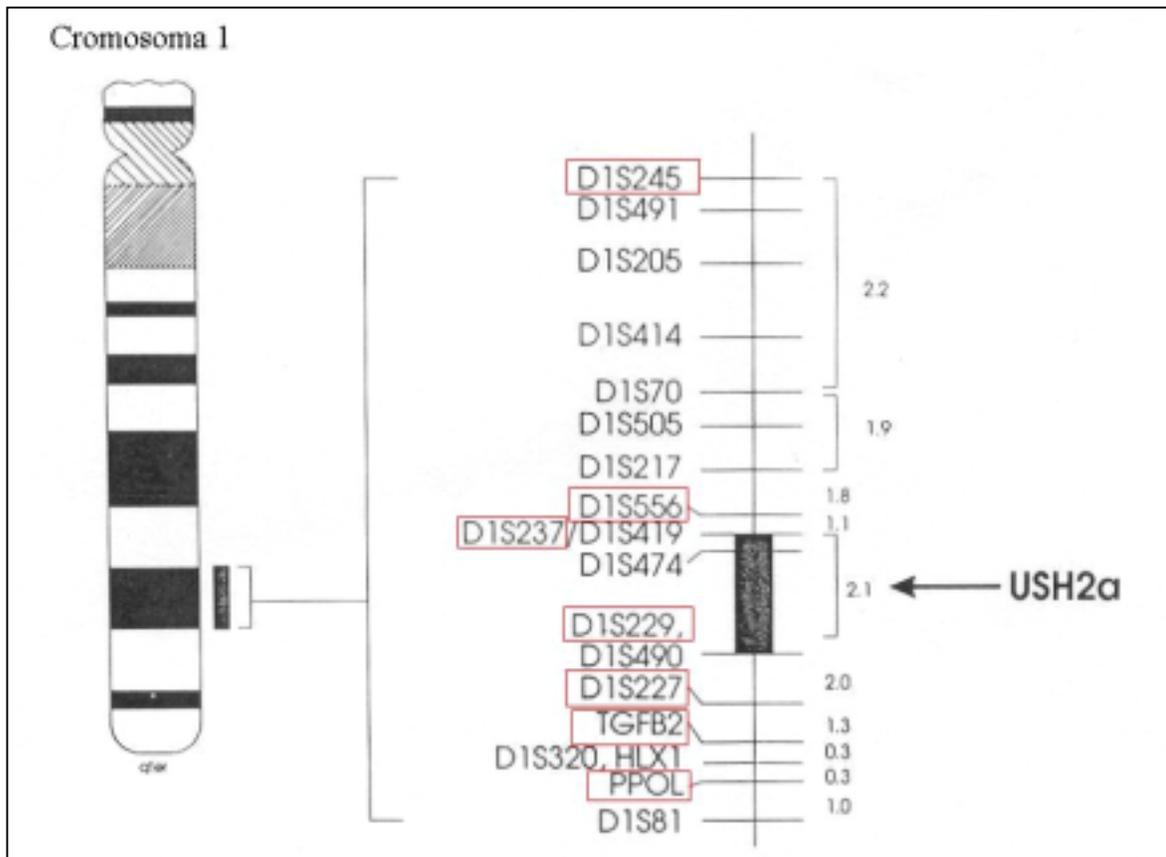
**Tabla 6.** Caracterización Genotípica y Determinación del Subtipo en la Familia 1

FAMILIA No	# de Afectados	DIAGNOSTICO CLINICO	LIGAMIENTO	LOD SCORE (Z)	SUBTIPO GENETICO	MUTACIÓN
1	3	Síndrome de Usher Tipo II	Análisis multipunto con ligamiento a marcadores para el locus 1q41	$Z_{\text{máx}}=1.329$	<b>USH2A</b> (Usherina)	<b>2299delG</b>

El análisis de ligamiento multipunto requiere hacer supuestos acerca de las distancias entre los loci marcadores y su orden relativo dentro del cromosoma. Esta información se presenta de manera gráfica en la figura 17. El gen USH2A, se localiza aproximadamente entre los marcadores D1S237 y D1S229.

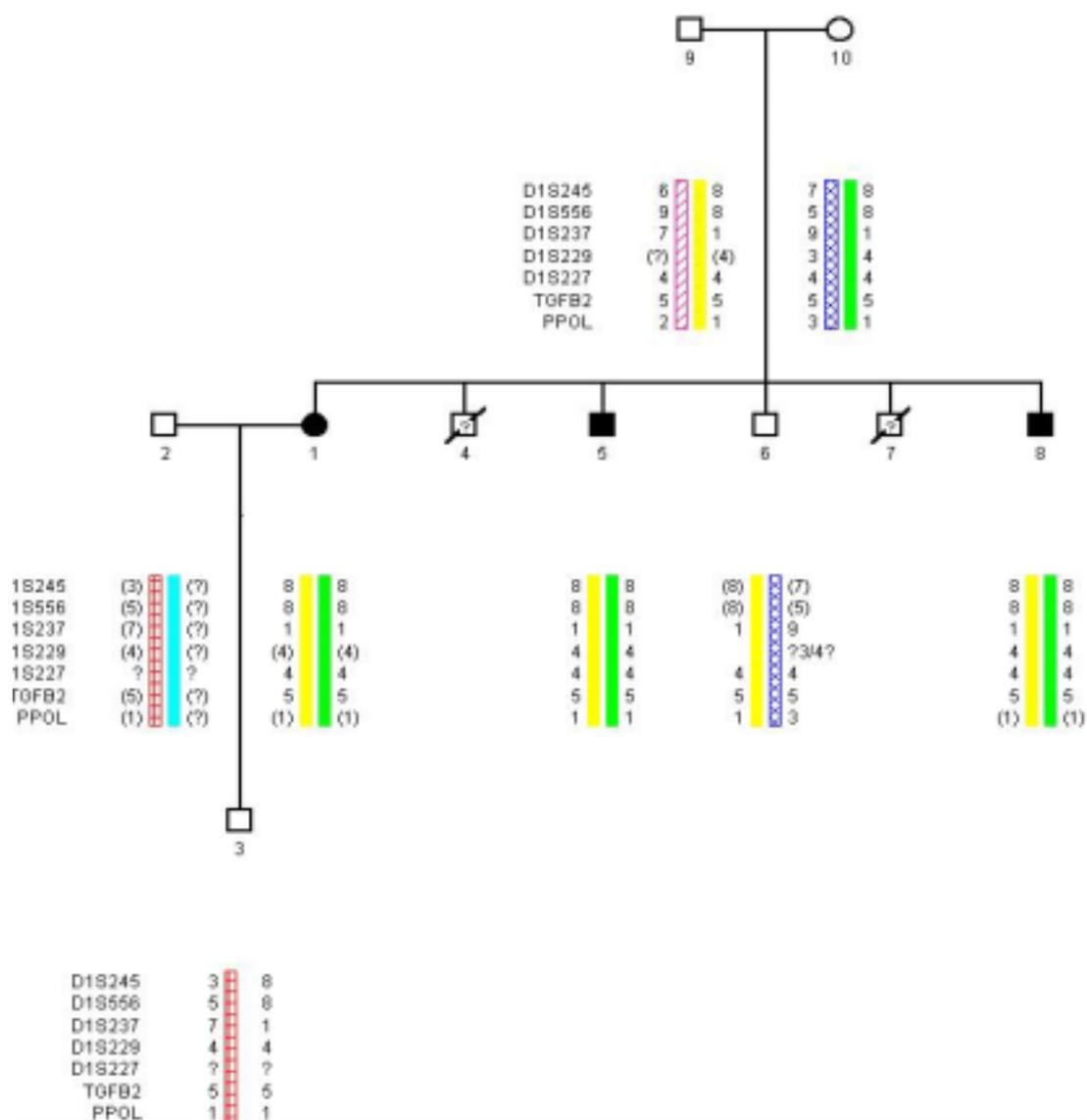
El estatus de afectado, portadores y no portadores se muestra en la figura 18 junto con los resultados de los haplotipos

La mutación detectada fue la 2299delG, en el exón 12 del gen USH2A (que codifica para la proteína Usherina). La mutación 2299delG (delección de una guanina en la posición 2299), es una mutación frameshift que ocasiona un cambio en el marco de lectura (ORF) en el codón 772 y un codón de parada prematuro TAG, situado 20 codones después de la delección



**Figura 17.** Localización de los marcadores para el cromosoma 1q. Los marcadores usados en este estudio se muestran dentro de un recuadro rojo. Se observa también la localización del gen USH2A

FAMILIA 1  
SINDROME DE USHER TIPO II- SUBTIPO USH2A  
Cromosoma 1



**Figura 18.** Resultados de Haplotipos Familia 1. Se observa la segregación de los alelos para los marcadores microsatélite en cada individuo, así como el estatus de afectado, portador y no portador.

### 5.3.2. FAMILIA 2

En el estudio de ligamiento para la familia 2, se analizaron un total de 14 individuos, incluyendo 3 mujeres afectadas, 5 mujeres no afectadas y 6 hombre no afectados. La segregación de los alelos identificados para los 4 marcadores microsatélite se muestra en cada uno de los individuos en la figura 19.

Se realizó un análisis de ligamiento multipunto dando como resultado un ligamiento a los marcadores D11S527, D11S911, D11S906, D11S4186 para el cromosoma 11q13.5, que corresponde al subtipo de Síndrome de Usher USH1B. Se obtuvo un LOD Score multipunto de  $Z_{max} = 3.782$ , que nos indica que existe una evidencia de ligamiento /no ligamiento mayor de 1000:1 (Tabla 7).

Las fracciones de recombinación para los cuatro marcadores del cromosoma 11q fueron:

0.5 cM entre el primero y el segundo marcador (D11S527 y D11S911)

0.1 cM entre el segundo y el tercer marcador (D11S911 y D11S906)

0.5 cM entre el tercero y el cuarto marcador (D11S906 y D11S4186)

1.0 cM entre el primero y el cuarto marcador. (D11S527 y D11S4186)

El gen MYO7A, se localiza aproximadamente entre el segundo y el tercer marcador.

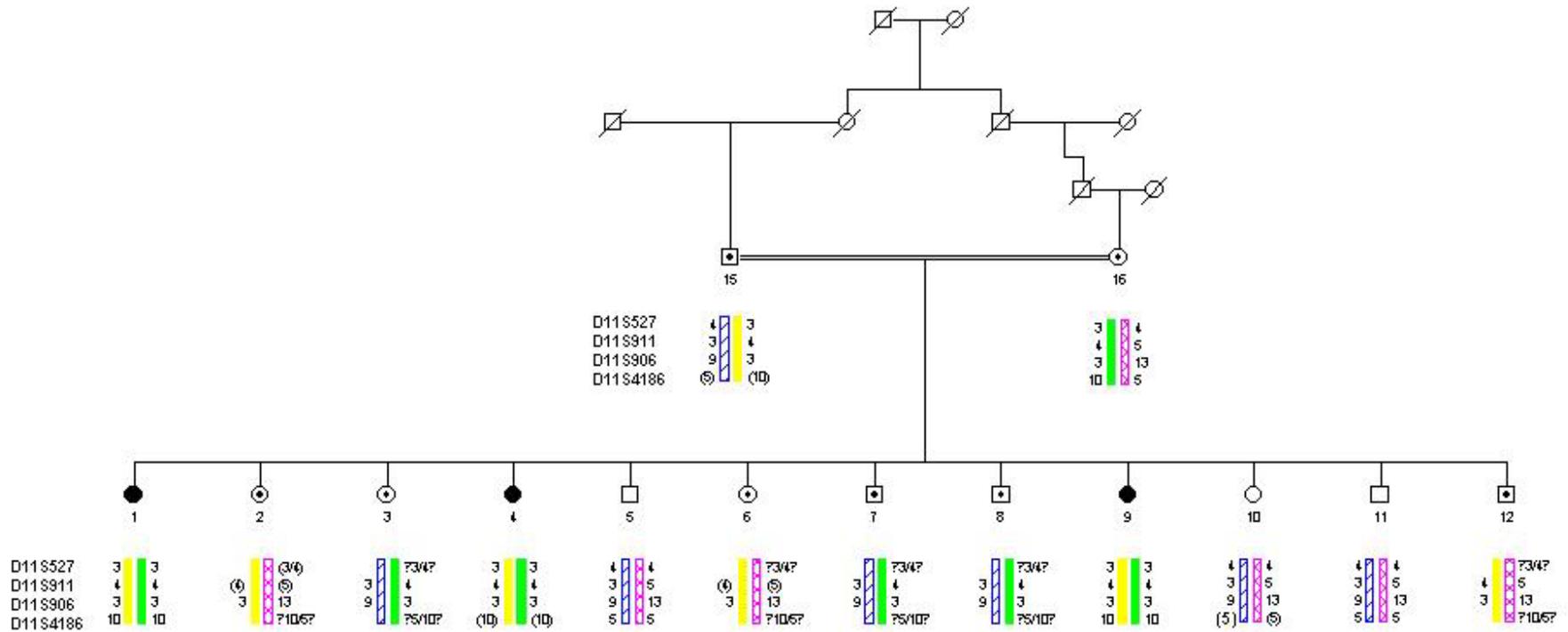
El estatus de afectado, portadores y no portadores se muestra en la figura 20 junto con los resultados de los haplotipos.

La mutación detectada fue R634X, que ocasiona un cambio del codón CGA por TGA, y está localizada en el exón 16 del gen MYO7A.

**Tabla 7.** Caracterización Genotípica y Determinación del Subtipo en la Familia 2

FAMILIA No	# de Afectados	DIAGNOSTICO CLINICO	LIGAMIENTO	LOD SCORE (Z)	SUBTIPO GENETICO	MUTACION
2	3	Síndrome de Usher Tipo I	Análisis multipunto con ligamiento a marcadores para el locus 11q13.5	$Z_{max} = 3.782$	<b>USH1B</b>	R634X (CGA-TGA)

FAMILIA 2  
SINDROME DE USHER TIPO I- SUBTIPO USH1B  
Cromosoma 11



**Figura 19.** Resultados de Haplotipos Familia 2. Se observa la segregación de los alelos para los marcadores microsatélite en cada individuo, así como el estatus de afectado, portador y no portador.

#### **5.4. CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO**

La correlación de los hallazgos clínicos con los resultados de los análisis moleculares, de las dos familias estudiadas, se muestran en la Tabla 8. En el caso de la Familia 1, cuyo fenotipo nos permitió clasificarla dentro del tipo II, los análisis de ligamiento génico mostraron que corresponde al subtipo genético USH2A, excluyendo el ligamiento a los demás loci conocidos para el Síndrome de Usher.

La Familia 2 mostró un fenotipo característico del Síndrome de Usher tipo I, que es más severo y un ligamiento a los marcadores para el cromosoma 11q, que corresponden al subtipo genético USH1B. También se excluyó en este caso el ligamiento a los demás loci reportados hasta el momento.

**Tabla 8. CORRELACION FENOTIPO –GENOTIPO**

FAMILIA Y TIPO CLINICO	# IND.	EDA D	SEXO	PERDIDA AUDITIVA	FUNCION VESTIBULAR	ALT. RETINIANA	EVALUCION NEUROLOGICA	LIGAMIENTO GENICO	SUBTIPO GENETICO	MUTACION
1 TIPO II	1	39	F	Hipoacusia Neurosensorial severa bilateral Inicio: Congénita	Normal	Compatible con RP Típica. Detección: 17-21 años de edad	Marcha: Anormal RMC: Atrofia cerebelosa	Ligamiento a marcadores para 1q41	USH2A (Usherina)	2299delG Exón 12
	2	32	M				Marcha: Normal RMC: Normal			
	3	35	M				Marcha: Normal RMC: Atrofia cerebelosa			
2 TIPO I	1	46	F	Hipoacusia Neurosensorial Profunda bilateral Inicio: Congénita	Ausencia de respuesta vestibular	Compatible con RP Típica Detección: 15 años de edad	Marcha: Anormal RMC: Atrofia cerebelosa	Ligamiento a marcadores para 11q13.5	USH1B (Miosina)	R634X (CGA-TGA) Exón 16
	2	41	F				Marcha: Anormal RMC: Normal			
	3	31	F				Marcha: Anormal RMC: Atrofia cerebelosa			

*RP*: Retinitis Pigmentosa ; *AO*: Ambos Ojos; *EPR*: Epitelio Pigmentario de la Retina; *NS*: Neurosensorial

## 6. DISCUSIÓN

Los árboles genealógicos de las dos familias estudiadas (Figuras 10 y 11) muestran claramente que se trata de una entidad genética y se evidencia el patrón de herencia autosómica recesiva que caracteriza al Síndrome de Usher.

### 6.1. HALLAZGOS FENOTÍPICOS

El primer paso al establecer y evaluar un modelo de abordaje para el estudio del Síndrome de Usher, es realizar una completa y cuidadosa evaluación clínica que permita una acertado diagnóstico.

La evaluación oftalmológica muestra un patrón típico de Retinitis Pigmentosa en las dos familias (Figuras 12, 14y 15). La edad de aparición de la alteración retiniana es la principal diferencia entre los tipos clínicos de Síndrome de Usher, que ha sido reportada en cuanto a los hallazgos oftalmológicos. La aparición de la alteración retiniana es prepuberal (primera década de vida) en el Tipo I y durante la adolescencia en el tipo II. Recientemente, otros estudios, han tratado de establecer rangos de diferencias para los tiempos de respuesta y en los patrones de amplitud de las ondas A y B del ERG, así como en los grados de constricción o presencia de escotomas (puntos de no visión) en el campo Visual, que pudieran servir como parámetros para establecer límites e identificar los tipos e incluso los subtipos del Síndrome de Usher, pero no se han logrado resultados conclusivos (Tsilou et al, 2002; Seeliger et al, 2001; Niemeyer, 1999; Grover y Fishman 1998).

El trastorno visual progresivo empieza a manifestarse más temprano en la familia 2 (Usher Tipo I), que en la familia 1 (Usher Tipo II).

En la familia 2, la pérdida de la agudeza visual ocurre en la primera década de vida, evoluciona hasta una nictalopía franca a los 15 años y el diagnóstico de RP se realiza en la segunda década de vida. Vale la pena anotar que muchas veces el diagnóstico de RP, se hace de manera tardía, cuando ya el deterioro de la retina es muy avanzado y se hace evidente que lleva un largo tiempo de evolución. Esto ocurre porque los afectados no reportan la nictalopía hasta que ya está muy avanzada y les dificulta en gran medida el desplazamiento en la oscuridad. Lo mismo ocurre con la constricción del campo visual que

es reportado cuando la visión en túnel ya está muy manifiesta. En estos casos es importante retomar la historia familiar, que en el caso de la familia 2, muestra que las 3 hermanas afectadas se aislaron, no salían de la casa y manifestaban dificultad y torpeza en el desplazamiento desde muy corta edad. El diagnóstico de RP y el reporte de la nictalopía es tardío, precisamente por su gran dificultad de comunicación con personas oyentes como sus padres y hermanos, adicional a una deprivación socio-afectiva. Así también, los signos clásicos presentes en el fondo de ojo tales como las espículas de hueso y el adelgazamiento de vasos, no siempre son evidenciables a corta edad, debido al carácter progresivo de la enfermedad que hace que la acumulación de pigmento en el Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR) y demás signos vayan haciéndose más claros mientras mayor sea la edad del afectado. Por el contrario, en la familia 1, con un Tipo II de Síndrome de Usher, la nictalopía fue reportada desde los 17 a 20 años, con constricción del campo visual aproximadamente a los 25 años. Esta diferencia de edades a las cuáles se reporta el trastorno visual es clara entre las dos familias, aunque no es tan notoria si no se realiza un adecuado análisis retrospectivo de los signos presentes.

La realización del Electrorretinograma es muy importante para el diagnóstico de la RP, especialmente en personas jóvenes, quienes aún no presentan alteraciones notorias en el Fondo de Ojo. Los resultados del ERG en la familia 1(Tipo II), muestran una disminución de la amplitud de las ondas Ay B, mientras que en la familia 2 (Tipo I), la onda A (que corresponde a la respuesta de los fotorreceptores) no es registrable, lo que nos muestra que el funcionamiento de los fotorreceptores retinianos y especialmente de los bastones (porción escotópica del ERG), se encuentra más alterado en los afectados de la familia 2; bien sea porque la RP comienza más temprano y al ser es un proceso progresivo-degenerativo, es lógico que es más severa en pacientes de mayor edad; o bien porque el proceso degenerativo ocurre de forma más rápida en estos pacientes Usher Tipo I.

Los resultados del Fondo de Ojo y del ERG son bastante similares entre los miembros de cada familia, pero no ocurre lo mismo con los campos visuales en los cuales las diferencias intrafamiliares son notorias especialmente en la familia 1. Esto es entendible, por el carácter progresivo de la enfermedad, lo que ocasiona que se presente una mayor constricción en los campos visuales de los afectados de mayor edad.

Estos hallazgos son imprescindibles para confirmar que efectivamente se trata de Síndrome de Usher, pero no son suficientes para discernir a cuál tipo clínico pertenece cada familia. Por el contrario, las evaluaciones audiológicas y vestibulares sí muestran diferencias conclusivas que permiten determinar el tipo clínico. Los afectados de la familia 2 (Usher Tipo I), presentan Sordera Profunda Neurosensorial congénita razón por la cual no poseen lenguaje oral. Mientras que los de la familia 1 (Usher Tipo II) presentan Sordera Neurosensorial de Moderada a Severa, poseen lenguaje oral y pueden mantener una conversación si se les habla fuerte. En las figuras 13 y 16 se observa la clara diferencia de la severidad de la sordera y las claras similitudes intrafamiliares.. En la familia 1 se observa el patrón de audiometría en declive clásico del Síndrome de Usher Tipo II, con sordera moderada en las frecuencias bajas ( 250, 500 y 1000 dB) y sordera más severa en las frecuencias altas. En el caso de la familia 2, a pesar de presentar una sordera profunda, también se observa una mayor pérdida en las frecuencias altas, que en este caso es total, como suele ocurrir en el Síndrome de Usher Tipo I. Esta diferencia puede deberse a que las células ciliadas internas del cóclea que son las que captan estas frecuencias parecen ser las primeras afectadas. Ninguno de los casos de sordera en las dos familias fue progresiva, lo que descarta de plano un posible Síndrome de Usher Tipo III en los afectados.

A su vez el electronistagmograma muestra la diferencia en la respuesta vestibular que es normal en la familia 1 (Usher Tipo II) y ausente en la familia 2, como era de esperarse dado que el Tipo I del Síndrome carece de respuesta del sistema vestibular.

Luego, el diagnóstico clínico es Síndrome de Usher Tipo II en el caso de la familia 1 y Síndrome de Usher Tipo I para la familia 2 (Tabla 5). Este diagnóstico se convierte en una guía para los estudios moleculares, dado que muestra por donde debe comenzar la búsqueda, del locus involucrado, mediante análisis de ligamiento.

## **6.2. HALLAZGOS GENOTÍPICOS**

Algunas enfermedades pueden tener manifestaciones clínicas muy similares pero ser ocasionadas por distintos genes, lo cual origina la denominada heterogeneidad genética. En general en estos casos, distintos genes participan en una cascada de eventos secuenciales necesarios para que un proceso determinado se lleve a cabo, o bien participan en la conformación estructural de tipos celulares en regiones específicas, como ocurre con los

estereocilios de las células ciliadas en la cóclea y los fotorreceptores en la retina. El mantenimiento de dicha estructura es imprescindible para asegurar un funcionamiento adecuado.

Diferentes mutaciones en los distintos genes que intervienen en la conformación de estas estructuras pueden tener como resultado el mismo cuadro clínico. Para determinar la región del genoma responsable del fenotipo en estas dos familias y contribuir a la localización de los genes de la enfermedad, se llevaron a cabo estudios de ligamiento a los 9 loci conocidos hasta el momento que pueden ocasionar un cuadro clínico compatible con el Síndrome de Usher.

En estos casos, el análisis molecular entra a jugar un papel muy importante en el reconocimiento de la heterogeneidad genética y por ende, de la correcta determinación del subtipo al que está asociado cada afectado. Además, el análisis molecular y particularmente el análisis de ligamiento y la conformación de haplotipos resultante, brindan la posibilidad, en el caso de las enfermedades autosómicas recesivas, de identificar a los heterocigotos o portadores sanos, lo cual constituye una herramienta valiosísima en la asesoría genética de los afectados y sus familias.

Los resultados de los haplotipos ( figuras 19 y 20) muestran la segregación de los alelos para cada marcador analizado, así como el estatus de afectado (homocigotos), portadores (heterocigotos) y no portadores. En la familia 1 (Usher Tipo II), del total de 8 individuos estudiados, 3 son afectados, 4 son portadores y un individuo es no portador. En la familia 2 (Usher Tipo I), del total de 14 individuos estudiados, 3 mujeres son afectadas, 8 son potadores (4 mujeres y 4 hombres) y 3 son no portadores.

Los análisis moleculares permitieron establecer que el locus causante de la enfermedad se encontraba en la región 1q41, en el caso de la familia 1 y en la región 11q14 en el caso de la familia 2. Estas regiones son las mismas en las cuales estudios de ligamiento realizados con otras familias a nivel, mundial habían localizado los loci causantes de los subtipos USH2A Y USH1B respectivamente.

En el caso de la familia 1 (USH2A), el lod Score obtenido fue de 1.329, que podría ser considerado como un lod Score que se encuentra en la zona no-conclusiva (valores que se encuentra en el intervalo comprendido entre  $-2$  y  $+3$ ), en la cual no podemos confirmar con total certeza el ligamiento, pero tampoco podemos descartar que de hecho exista

ligamiento. A pesar de que el resultado del lod Score no es muy alto, si es un valor que puede considerarse positivo, por lo tanto, no permite excluir el ligamiento a esa región. Por otra parte, el ligamiento a los marcadores para los restantes 8 loci fue negativo y menor a  $-2$ , con lo que se excluye definitivamente el ligamiento a esas otras regiones.

Además, se debe tener en cuenta que se realizó un ligamiento multipunto, en el cual se analizaron en conjunto todos los marcadores microsatélite utilizados (7 en total), siendo el valor del Lod Score un promedio de todos los marcadores utilizados, ya sean informativos o no. El análisis de ligamiento multipunto tiene una ventaja y es que ayuda a salvar los problemas causados por la limitada informatividad de algunos de los marcadores. Algunas meiosis en una familia pueden ser informativas con un marcador A y otras no informativas con un marcador cercano B. Solamente un análisis de ligamiento simultáneo de la enfermedad con los marcadores A y B aporta la información completa. Los marcadores usados fueron los que en el momento de la realización del ligamiento se conocían. En la figura 18, se muestran los 7 marcadores usados y la distancia genética entre ellos. Recientemente se han definido nuevos marcadores que se encuentran a una distancia genética menor (cM) e incluso se encuentran dentro del gen, haciendo que la fracción de recombinación (RF) disminuya, estos marcadores serán usados en estudios futuros en el Síndrome de Usher.

También debe tenerse en cuenta que la heterogeneidad genética máxima y el número de alelos posibles para cada marcador, han sido establecidos en otras poblaciones; luego marcadores que parecieran ser muy informativos, pueden tener una informatividad reducida en nuestra población.

En cuanto a los resultados del análisis de ligamiento, la familia 1 mostró ligamiento a los marcadores para el cromosoma 11q, que corresponde al subtipo USH1B y la familia 2 a los marcadores para el cromosoma 1q que corresponde al subtipo USH2A. Para la familia 2, el lod Score obtenido fue de 3.782, lo cual plenamente confirma el ligamiento a esa región cromosómica.

Lo interesante del trabajo en este punto, es el hecho de que a partir de haber obtenido en una de las familias (familia 1-USH2A), un lod Score dudoso, se confirmó el ligamiento positivo, mediante la detección de una mutación específica, la 2299delG, en el exón 12 del gen USH2A (que codifica para la proteína Usherina). La mutación 2299delG (delección de

una guanina en la posición 2299), es una mutación frameshift que ocasiona un cambio en el marco de lectura (ORF) en el codón 772 y un codón de parada prematuro TAG, situado 20 codones después de la deleción (Eudy et al., 1998). Weston y colaboradores en 1998, determinaron que la mutación más frecuente en el gen USH2A era precisamente la mutación 2299delG, encontrando que estaba presente en 31/192 alelos estudiados (16%). Otros estudios han confirmado estos hallazgos mostrando que la frecuencia de la mutación en la población escandinava es de 15% (Dreyer et al., 2000) y de 25% en población española (Najera et al., 2002).

Consecuentemente en la familia 2 (USH1B), se detectó una mutación en el gen que codifica para la miosina VIIA. Este estudio confirmó el diagnóstico de subtipo que se había inferido a través del análisis de ligamiento génico. La mutación detectada fue R634X, que causa la sustitución de la arginina 634 por un codón de parada (TGA), en el exón 16 del gen MYO7A. Como es evidente la proteína producida no es funcional, pues está siendo codificada sólo por 16 de los 49 exones del gen MYO7A. Esto hace que la miosina VIIA producida conste únicamente del dominio de cabeza motora y carezca del resto de sus dominios funcionales (Figura 8).

De esta forma, se cierra el círculo del plan de estudio propuesto, en el que se confirma el diagnóstico clínico y se clasifica cada familia en tipos y subtipos, Con estos datos precisos, sí es posible pasar a una adecuada correlación fenotipo-genotipo.

### **6.3. CORRELACION FENOTIPO- GENOTIPO**

Al realizar esta correlación se encontró una correspondencia entre los resultados clínicos y los moleculares. En la fase inicial del estudio se clasificaron las dos familias como Síndrome de Usher Tipo II en el caso de la Familia 1 y Síndrome de Usher Tipo I en el caso de la Familia 2. Al realizar el análisis de ligamiento se presentó una exacta correlación con los resultados clínicos correspondiendo las familias a los subtipos USH2A Y USH1B respectivamente y que confirmó con la detección de la mutación específica en cada caso. (Tabla 6).

Como ya se ha mencionado, el Tipo clínico I del Síndrome de Usher es más severo. Este es el caso de la Familia 2, que además al ser clasificada como subtipo USH1B, nos permite determinar que las manifestaciones fenotípicas en su caso se deben a mutaciones en

el gen MYO7A. Este gen codifica para la proteína Miosina VIIA, que se localiza en la retina, cóclea y sistema vestibular. Específicamente en el oído interno, el gen MYO7A se expresa en los esterocilios de las células ciliadas de la cóclea y del sistema vestibular (Figuras 1,2 y 3). Su función es estructural y ayuda a estabilizar los racimos de esterocilios. Por esta razón la sordera en esta familia es profunda y congénita ya que no hay un funcionamiento adecuado de las células ciliadas que son los mecanorreceptores que hacen la transducción de las ondas del sonido en impulsos nerviosos. Por otra parte su expresión en la retina está confinada al cilio que conecta los segmentos internos y externos de las células fotorreceptoras (figuras 4, 5 y 6). Se cree que la miosina VIIA participa en el transporte de la proteína fototransdutora Opsina a través del cilio conector, desde el segmento interno donde es producida hasta el segmento externo donde realiza su función. De esta forma la tasa de renovación de opsina en los discos del segmento exterior se ve disminuida lo cual explica los efectos deletéreos progresivos de la RP (Liu et al, 1999; Wolfrum et al 2000).

Entre los genes que se han identificado y caracterizado para los restantes 5 loci del Síndrome de Usher tipo I, se encuentran los genes USH1C, CDH23 Y PCDH15 (Tabla 1), todos estos se expresan también en la retina y oído interno, y se ha comprobado que su función en la cóclea y sistema vestibular se encuentra confinada también a darle estructura y organización a los estereocilios de las células ciliadas. Por esta razón y debido a las propiedades estructurales, estas proteínas que son codificadas por los genes que ocasionan el fenotipo del Síndrome de Usher Tipo I, la sordera es profunda y congénita.

Por su parte, la Familia 2 se ha clasificado como Tipo Clínico II y subtipo USH2A. Por lo tanto, las manifestaciones clínicas en esta familia se deben a mutaciones en el gen USH2A, que codifica para la proteína Usherina. Como ya se ha mencionado con anterioridad, en el tipo II la sordera es de moderada a severa y no presenta alteraciones del sistema vestibular. Usherina está presente en la retina y en la cóclea y por la homología que presentan sus dominios, con proteínas de la matriz extracelular y de la membrana basal, se cree que puede estar haciendo parte de este tipo de estructuras; en particular, en el laberinto membranoso o la membrana tectoria en la cóclea y en la matriz extracelular que rodea a los fotorreceptores y las células de Muller en la retina.

El Síndrome de Usher es un desorden clínica y genéticamente heterogéneo. A pesar de que los tres tipos clínicos en que se ha dividido el Síndrome de Usher son claramente diferenciables fenotípicamente, los subtipos que han sido reportados no han sido caracterizados desde el punto de vista auditivo, vestibular u oftalmológico y aún hace falta definir una correlación con los hallazgos moleculares, para determinar si es posible establecer patrones clínicos específicos para cada subtipo.

Este modelo de estudio es un acercamiento a este tipo de correlación y quedan abiertas multitud de posibilidades para estudios futuros a este respecto. En ese aspecto, para establecer una completa correlación fenotipo- genotipo, entre los diferentes subtipos sería necesario determinar todas las posibles diferencias en la presentación clínica, comparando entre los subtipos del tipo I y los subtipos del tipo II. Es decir, comparar los subtipos USH1A, USH1B, USH1C, USH1D, USH1E y USH1F, y los subtipos USH2A y USH2B. Este análisis, requiere un tamaño de muestra considerable.

En definitiva, los patrones clínicos que clasifican el tipo de Síndrome de Usher son muy claros, pero no podemos determinar si es igual para los subtipos. La literatura mundial lleva a pensar que sería factible establecer patrones clínicos definidos, no necesariamente para cada subtipo molecular, pero sí para el tipo de mutación presente dentro de un mismo locus. Pues diversos estudios mutacionales realizados en los genes que han sido identificados hasta el momento, muestran que hay gran cantidad de mutaciones en cada gen y se ha podido establecer en el caso del gen MYO7A (codifica para el subtipo USH1B), que dependiendo del lugar de localización de la mutación y del tipo de ésta, el fenotipo es diferente. De hecho, hay mutaciones en este gen que incluso pueden ocasionar únicamente sordera sin ningún tipo de falla visual (sordera no sindrómica). Estas mutaciones se han localizado en partes del gen que al parecer no afectan de manera tan notable la funcionalidad de la proteína codificada (Liu et al., 1997, Liu te al., 1998, Weil et al., 1997).

#### **6.4. DETERMINACION DE UN MODELO DE ESTUDIO**

Como previamente se ha mencionado, el objetivo principal de este trabajo era determinar una estrategia o modelo de estudio para el abordaje de enfermedades clínica y genéticamente heterogéneas, como es el caso del Síndrome de Usher. Todo esto con el fin de buscar una forma de abordaje correcta y eficiente para la realización de estudios

posteriores más detallados en el Síndrome de Usher. Esto nos llevó a proponer la realización de una secuencia de 3 fases o pasos:

- ***Fase I: Evaluación Clínica***

Realización de una detallada evaluación clínica que comprenda todos los criterios diagnósticos claves para la clasificación fenotípica del Tipo clínico de Síndrome de Usher al que pertenece cada afectado. Esto se constituye en el primer paso para dar una adecuada orientación a los estudios moleculares que determinan la clasificación genotípica en subtipos de cada afectado.

- ***Fase II: Análisis de Ligamiento Génico y detección de Mutaciones***

Análisis de ligamiento génico para identificar cuál de los loci es el involucrado y poder determinar el subtipo. Para estos estudios es necesario tener en cuenta el tipo clínico en el cual se ha clasificado previamente cada familia, para de esta forma comenzar el análisis con los marcadores correspondientes a cada tipo clínico. También, teniendo en cuenta que los subtipos más comunes que se han reportado en la literatura son el USH1B para el tipo clínico I, el USH2A para el tipo clínico II y el USH3 para el tipo clínico III, la genotipificación se comienza con los marcadores correspondientes a cada uno de estos subtipos, según fuera el tipo clínico ya determinado (previamente establecido).

Vale la pena aclarar que a pesar de ser los subtipos más comunes, no son los únicos, pero es importante descartar primero los más comunes con el fin de optimizar los estudios moleculares, tanto en tiempo como en gasto de reactivos.

Consideramos además que el análisis de ligamiento es la forma más idónea de comenzar con los estudios moleculares porque identifica el locus involucrado en una enfermedad genéticamente heterogénea como el Síndrome de Usher.

Hasta este punto del modelo de estudio, todos los afectados y sus familias ya han sido clasificados clínicamente en un tipo específico y, con el análisis de ligamiento ya se ha definido el subtipo de Síndrome de Usher al cual pertenece cada uno. Ya teniendo definido el locus involucrado se entra a realizar la detección de las mutaciones presentes.

Una de las formas de hacerlo es mediante la secuenciación automática. Recordemos que ésta técnica es utilizada como un estudio mutacional completo y exacto para detectar

cambios de hasta sólo una base en la secuencia de nucleótidos. En el caso del Síndrome de Usher se hace necesario el uso de la secuenciación para determinar el tipo de mutación presente en cada familia, ya que hay una gran cantidad de mutaciones detectadas. Tal es el caso del Síndrome de Usher 1B, en el cual han sido identificadas hasta el momento 56 mutaciones diferentes, sin un hot spot específico; además se ha comprobado que en estudios mutacionales en Síndrome de Usher otros métodos usados como heteroduplex y SSCP no han detectado todas las mutaciones posibles. De tal forma que un alto porcentaje de las mutaciones queda sin detectar, teniendo que recurrir de todas maneras a la secuenciación para verificar y definir los cambios específicos en la secuencia de nucleótidos (Kimberling et al., 2001. Comunicación personal).

Es el caso particular de los estudios realizados por el grupo colaborador del Boys Town National Research Hospital, dirigido por el Dr. Kimberling; los resultados obtenidos han mostrado que los heteroduplex y los SSCP no tienen la sensibilidad suficiente para detectar todas las mutaciones en USH. De hecho en el caso de la detección de mutaciones en el gen MYO7A, la tasa de detección de mutaciones de los heteroduplex es igual a la de los SSCP y sólo del 80% al 90% cuando se compara con la detección realizada por secuenciación. En cuanto a detección de mutaciones en USH2A, los heteroduplex sólo tuvieron cerca de 85% de efectividad cuando se compararon con la secuenciación.

Por otro lado si se conoce la existencia de una mutación específica y que cuente para un alto porcentaje de los casos como ocurre con la mutación 2299delG que se presenta en el gen de la Usherina, se buscan otras alternativas más eficientes como es el caso de las enzimas de restricción, que actúan sobre una secuencia específica o diana.

El enfoque elegido, depende de los recursos disponibles, tanto en dinero como en tecnología, del número de pacientes a evaluar, de que la mutación sea una mutación específica con una alta frecuencia poblacional o si por el contrario se han reportado un número elevado de mutaciones localizadas a lo largo de todo el gen.

- ***Fase III: Correlación Fenotipo- Genotipo:***

La correlación Fenotipo- Genotipo, mostró que el modelo de estudio propuesto, es una estrategia acertada para el abordaje del Síndrome de Usher. Y como ya se ha discutido

anteriormente, el estudio de una correlación genotipo- genotipo para cada subtipo, abre múltiples posibilidades de investigación futura.

El diseño este modelo de estudio para el abordaje de esta enfermedad clínica y genéticamente heterogénea, representó un aporte valioso tanto desde el punto vista de diagnóstico eficiente y por ende de asesoría genética, como desde el punto de vista de la orientación de los estudios moleculares.

## 7. CONCLUSIONES

- El primer paso al establecer y evaluar un modelo de abordaje para el estudio del Síndrome de Usher, es realizar una completa y cuidadosa evaluación clínica que permita un diagnóstico acertado. Si no se tiene bien caracterizado el fenotipo, no es posible tener éxito en los estudios moleculares o en una adecuada correlación Fenotipo-Genotipo posterior.
- El diagnóstico clínico es Síndrome de Usher Tipo II en el caso de la familia 1 y Síndrome de Usher Tipo I para la familia 2. Este diagnóstico se convierte en una guía para los estudios moleculares, dado que muestra por donde debe comenzar la búsqueda, mediante análisis de ligamiento, del locus involucrado.
- La familia 1 mostró ligamiento a los marcadores para el cromosoma 11q13.5, que corresponde al subtipo USH1B y la familia 2 a los marcadores para el cromosoma 1q41 que corresponde al subtipo USH2A.
- La mutación detectada en el caso de la familia 1 fue la 2299delG, en el exón 12 del gen USH2A (que codifica para la proteína Usherina). Y para la familia 2 la mutación detectada fue R634X en el gen que codifica para la miosina VIIA. El análisis mutacional confirmó el diagnóstico de subtipo que se había inferido a través del ligamiento génico.
- El análisis de haplotipos, es una herramienta útil en el caso de enfermedades autosómicas recesivas para definir el estatus de portador o no portador, información que es de vital importancia para la asesoría genética.
- La selección de los marcadores es muy importante y definitiva para el éxito del análisis de ligamiento génico; lo ideal es escoger los que se encuentren a una distancia genética menor o incluso que estén dentro del gen.

- Los patrones clínicos que permiten clasificar el tipo de Síndrome de Usher son muy claros, pero no podemos determinar si es igual para los subtipos. Aunque el análisis de ligamiento génico, es una herramienta muy útil en el abordaje de una enfermedad con alta heterogeneidad genética como el Síndrome de Usher, pues permite identificar el locus involucrado (determinación del subtipo); es evidente que no ofrece toda la información necesaria para una completa correlación fenotipo-genotipo, dado que lo ideal es llegar a determinar el tipo de mutación presente en cada individuo.
- El enfoque elegido para la detección de mutaciones, depende de los recursos disponibles, tanto en dinero como en tecnología, del número de pacientes a evaluar, de que la mutación sea una mutación específica con una alta frecuencia poblacional o si por el contrario se han reportado un número elevado de mutaciones localizadas a lo largo de todo el gen.
- El modelo de estudio propuesto y evaluado consta de 3 fases:  
*Fase I:* Detallada evaluación clínica y clasificación fenotípica del Tipo clínico al que pertenezca el afectado.  
*Fase II:* Análisis de ligamiento génico y detección de mutaciones.  
*Fase III:* Correlación Fenotipo-Genotipo.
- La correlación Fenotipo- Genotipo, mostró que el modelo de estudio propuesto, es una estrategia acertada para el abordaje del Síndrome de Usher.

## 8. RECOMENDACIONES

- Recientemente se han definido nuevos marcadores, para los análisis de ligamiento a los loci involucrados en el Síndrome de Usher, que se encuentran a una distancia genética menor (cM) e incluso se encuentran dentro del gen, haciendo que la fracción de recombinación (RF) disminuya. Estos marcadores son más recomendados para utilizar en el análisis de ligamiento en estudios futuros del Síndrome de Usher.
- La literatura mundial lleva a pensar que sería factible establecer patrones clínicos definidos, no necesariamente para cada subtipo molecular, pero sí para el tipo de mutación presente dentro de un mismo locus. De hecho hay mutaciones en el gen MYO7A que incluso pueden ocasionar únicamente sordera sin ningún tipo de falla visual (sordera no sindrómica). Esto ha llevado a plantear la importancia de la determinación de la mutación específica en cada caso. De hecho, después de localizar el locus involucrado mediante análisis de ligamiento, y teniendo determinado el subtipo es muy importante determinar las posibles mutaciones presentes. De manera que es importante la realización de un proyecto que busque la identificación de las mutaciones causales en cada caso y en cada familia para un tamaño de muestra mayor al estudiado en este trabajo. Este paso ya se dio y el Instituto de Genética Humana ya está adelantando un nuevo proyecto de análisis de ligamiento y estudios mutacionales en 10 familias colombianas, con la financiación de Colciencias, para el cual éste modelo de estudio sirvió como base.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, F.A., Cohen, D. & Sohmer H. (1977). Usher's syndrome: Electrophysiological tests of the visual and auditory systems. *Doc. Ophthalmol.* **44**, 435-444.
- Bolz, H; Brederlow, B. (2001). Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin family, causes Usher Syndrome Type 1D. *Nature Genetics.* **27**: 108-112.
- Bonne-Tamir, B., Korostishevsky, M., Kalinsky, H., Seroussi, E., Beker, R., Weiss, S. & Godel, V. (1994). Genetic mapping of the gene for Usher syndrome: Linkage analysis in a large Samaritan kindred. *Genomics* **20**, 36-42.
- Bork, J; Peters, L; Riazzuddin, S; Bernstein, S. (2001). Usher Syndrome 1D and nonsyndromic Autosomal Recessive Deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel Cadherin-like Gene CDH23. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 26-37.
- Boughman, J.A., Vernon, M. & Shaver, K.A. (1983). Usher syndrome: Definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J. Chron. Dis.* **36**, 595-603.
- Campbell, N.A. (1994). Biology. Third Edition. The Benjamin Cummings Publishing Company, Redwood City, California. Págs : 1015-1032.
- Chaib, H., Kaplan, J., Gerber, S., Vincent, C., Munnich, A., Weissenbach, J. & Petit, C. (1997). A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 27-31.
- De Haas, E.B.H., Van Lith, G.H.M., Rijnders, J., Rumke, A.M.L. & Volmer, C.H. (1970). Usher's syndrome with special reference to heterozygous manifestations. *Doc. Ophthalmol.* **28**, 166-190.
- Dracopoli, N.C. (1995). Current Protocols in Human Genetics. Jhon Wiley and Sons.
- Dreyer B., Tranedjaerg L., Nilssen O. (2000). Identification of novel USH2A mutations: implications for the structure of USH2A protein. *European Journal Of Human Genetics.* **8**, 500-506.
- Eudy, J.D., Ma-Edmonds, M., Yao, S.F., Talmadge, C.B., Kelley, P.M., Weston, M.D., Kimberling, W.J. & Sumegi, J. (1997). Isolation of a novel human homologue of the gene coding for echinoderm microtubule-associated protein (EMAP). from the Usher syndrome type 1a locus at 14q32. *Genomics* **43**, 104-106.
- Eudy, J.D., Weston, M.D., Yao, S.F., Hoover, D.M., Rehm, H.L., Ma-Edmonds, M., Yan, D., Ahmad, I., Cheng, J.J., Ayuso, C., Cremers, C., Davenport, S., Möller, C., Talmadge, C.B., Beisel, K.W., Tamayo, M.L., Morton, C.C., Swaroop, A., Kimberling, W.J. & Sumegi, J. (1998). Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* **280**, 1753-1757.
- Fishman, G.A., Kumar, A. (1983). Usher Syndrome: Ophthalmic and Neuro-otologic findings suggesting genetic heterogeneity. *Arch. Ophthalmol.* **101**: 1367- 1374
- Gerber, S., Bonneau, D., Rozet, J.M., Delrieu, O., Briard, M.L., Dollfus, H., Bhazi, I., Dufier, J.L., Frezal, J. & Munnich, A. (1992). A gene for Usher syndrome type 1 (USH1A). maps to chromosome 14q. *Genomics* **14**, 979-987.
- Grondahl, J. & Mjoen, S. (1986). Usher syndrome in four Norwegian counties. *Clin. Genet.* **30**, 14-28.
- Hallgren, B. (1959). Retinitis Pigmentosa combined with congenital deafness with vestibulo-cerebellar ataxia and neural abnormality in a proportion of cases. *Acta. Psychiat. Scand.* **138**, 1-101.
- Hasson, T. (1997). Unconventional myosins, the basis for deafness in mouse and man [editorial]. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 801-805.

- Hasson, T., Heintzelman, M.B., Santos-Sacchi, J., Corey, D.P. & Mooseker, M.S. (1995). Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9815-9819.
- Hasson, T., Walsh, J., Cable, J., Mooseker, M.S., Brown, S.D. & Steel, K. P. (1997). Effects of shaker-1 mutations on myosin-VIIa protein and mRNA expression. *Cell Motil. Cytoskel.* **37**, 127-138.
- Heckenlively, J.R. (1982). The frequency of posterior subcapsular cataract in the hereditary retinal degenerations. *Am. J. Ophthalmol.* **93**: 733- 738.
- Heckenlively, J.R., Chang, B., Erway, L.C., Peng, C., Hawes, N.L., Hageman, G.S. & Roderick, T.H. (1995). Mouse model for Usher syndrome, linkage mapping suggests homology to Usher type I reported at human chromosome 11p15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11100-11104.
- Higgins, M.J., Day, C.D., Smilinich, N.J., Ni, L., Cooper, P.R., Nowak, N.J., Davies, C., de Jong, P.J., Hejtmancik, F., Evans, G.A., Smith, R.J. & Shows, T.B. (1998). Contig maps and genomic sequencing identify candidate genes in the usher 1C locus. *Genome Res.* **8**, 57-68.
- Hmami, M., Ghorbel, A., Boulila, A., Zina, ZB, et al. (1999) A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**:363-367.
- Kanski, J.J. (1992). Oftalmología Clínica. Segunda edición. Ediciones Doyma, S.A. Barcelona. pág 239-269.
- Kaplan, J., Guasconi, G., Bonneau, D., Melki, J., Briard, M. L., Munnich, A., Dufier, J. L. & Frezal, J. (1990). Usher syndrome type I is not linked to D1S81 (pTHH 33) evidence for genetic heterogeneity. *Ann. Genet.* **33**, 105-108.
- Kaplan, J., Gerber, S., Bonneau, D., Rozet, J.M., Delrieu, O., Briard, .M.L., Dollfus, H., Ghazi, I., Dufier, J.L., Frezal, J. & Munnich, A. (1992). A gene for Usher syndrome type I (USH1A) maps to chromosome 14q. *Genomics* **14**, 979-987.
- Karjalainen, S., Pakarinen, L., Terasvirta, M. & Kaariainen, H.E.V. (1989). Progressive hearing loss in Usher's syndrome. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **98**, 863-866.
- Karjalainen, S., Terasvirta, M., Karja, J. & Kaariainen, H. (1985). Usher's syndrome type III: ENG findings in four affected and six unaffected siblings. *J. Laryngol. Otol.* **99**, 43-48.
- Keats, B.J., Todorov, A.A., Atwood, L.D., Pelias, M.Z., Hejtmancik, J.F., Kimberling, W.J., Leppert, M., Lewis, R.A. & Smith, R.J.H. (1992). Linkage studies of Usher syndrome type 1, exclusion results from the Usher syndrome consortium. *Genomics* **14**, 707-714.
- Keats, B.J., Nouri, N., Pelias, M.Z., Deininger, P.L. & Litt, M. (1994). Tightly linked flanking microsatellite markers for the Usher syndrome type I locus on the short arm of chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.* **54**, 681-686.
- Kelley, P.M, Weston, M.D., Chen, Z.Y., Orten, D.J., Hasson, T., Overbeck, L.D., Pinnt, J., Talmadge, C.B., Ing, P., Mooseker, M.S., Corey, D., Sumegi, J. & Kimberling, W.J. (1997). The genomic structure of the gene defective in Usher syndrome type Ib (MYO7A). *Genomics* **40**, 73-79.
- Kimberling, W.J., Moller, C.G., Davenport, S.L., Lund, G., Grissom, T.J., Priluck, I., White, V., Weston, M.D., Biscione-Halterman, K. & Brookhouser, P. E. (1989). Usher syndrome: Clinical findings and gene localization studies. *Laryngosc.* **99**, 66-72.
- Kimberling, W.J., Weston, M.D., Möller, C.G., Davenport, S.L.H., Shugart, Y.Y., Priluck, I.A., Martini, A., Milani, M. & Smith, R.J.H.. (1990) Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q. *Genomics* **7**, 245-249.
- Kimberling, W.J., Weston, M.D., Pieke Dahl, S., Kenyon, J.B., Shugart, Y.Y., Moller, C., Davenport, S.L., Martini, A., Milani, M. & Smith, R.J.H. (1991). Genetic studies of Usher syndrome. *Ann. NY Acad. Sci.* **630**, 167-175.
- Kimberling, W.J. & Smith, R.J.H. (1992). Gene mapping of the Usher syndromes. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* **25**, 923-934.

- Kimberling, W.J., Möller, C.G., Davenport, S., Priluck, I.A., Beighton, P.H., Greenberg, J., Reardon, W., Weston, M.D., Kenyon, J.B., Grunkemeyer, J.A., Pieke-Dahl, S., Overbeck, L.D., Blackwood, D.J., Brower, A.M., Hoover, D.M., Rowland, P. & Smith, R.J.H. (1992). Linkage of Usher Syndrome type I gene (USH1B) to the long arm of chromosome 11. *Genomics* **14**, 988-994.
- Kimberling, W.J. & Möller, C. (1995) Clinical and molecular genetics of Usher syndrome. *J. Am. Acad. Audiol.* **6**, 63-72
- Kimberling, W.J., Weston, M.D., Moller, C.G., van Aarem, A., Cremers, C.W.R.J., Sumegi, J., Ing, P.S., Connolly, C.J., Martini, A., Milani, M., Tamayo, M.L., Bernal, J.E., Greenberg, J. & Ayuso, C. (1995). Gene mapping of Usher syndrome type 2a, Localization of the gene to a 2.1 centimorgan segment on chromosome 1q41. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 214-223.
- Kumar, A., Fishman, G.A & Torok, N. (1984) Vestibular and auditory function in Usher's syndrome. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **93**, 600-608, 1984.
- Lathrop, G.M., Lalouel, J.M., Julier, C. & Ott, J. (1985). Multilocus linkage analysis in humans: Detection of linkage and estimation of recombination. *Am. J. Hum. Genet.* **37**, 482-498.
- Lathrop G.M., Lalouel J.M., Julier C., Ott J., (1992) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 81: 3443- 3446.
- Lewis, RA. et al. (1990): Mapping recessive ophthalmic diseases: Linkage of the locus for Usher syndrome type II to a DNA marker on chromosome 1q. *Genomics* **7**, 250-256.
- Lindenov, H. (1945) The etiology of deaf-mutism with special reference to heredity. *Op. Ex. Domo. Biol. Hered. Hum. Univ. Hafnienses* **8**, 1-268,
- Liu, X.Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M.J., Steel, K.P. & Brown, S.D. (1997a). Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* **16**, 188-190.
- Liu, X.Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K.P. & Brown, S.D.M. (1997). Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by mutation in the myosin VIIA gene. *Nat. Genet.* **17**, 268-269.
- Liu, X.Z., Hope, M.J., Steel, K.P., Walsh J., Newton V., Ke X., Liang, C., & Brown, S.D. (1998). Mutations in the myosin VIIA gene cause a Wide Phenotypic Spectrum, Including Atypical Usher Syndrome. *Am. J. Hum Genet.* **63**, 909-912.
- Liu, X., Udovichenko I., Steel, K.P., Brown, S.D.M., & Williams D. (1999). Myosin VIIa participates in Opsin Transport through The Photoreceptor Cilium. *The Journal of Neuroscience.* **19** (15): 6267-6274.
- Lynch, E.D. Lee, M.K., Morrow, J.E., Welsch, P.L., Leon, P.E. & King, M.C. (1997). Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* **278**, 1315-1318.
- Marietta, J., Walters, K.S., Burgess, R., Ni, L., Fukushima, K., Moore, K.C., Hejtmancik, J.F. & Smith, R.J.H. (1997). Usher's syndrome type IC, clinical studies and fine-mapping the disease locus. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **106**, 123-128.
- Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography (1994). *Doc. Ophthalmol.* 1995; 89: 199-210.
- Merin, S.F. Abraham, A. & Auerbach, E. (1974). Usher's and Hallgren's syndrome. *Acta Genet. Med. Gemellol. (Roma)* **23**, 49-55.
- Möller, C.G., Kimberling, W.J., Davenport, S.L., Priluck, I., White, V., Biscone-Halterman, K., Odkvist, L.M., Brookhouser, P.E., Lund, G. & Grissom, T.J. (1989). Usher syndrome: An otoneurologic study. *Laryngosc.* **99**, 73-79.
- Möller, C. (1990). [Usher syndrome II localized on chromosome 1]. *Lakartidningen* **87**, 1758.
- Morton, M.E. (1955). Sequential tests for detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, **7** : 277-318.
- Mooseker, M.S. & Cheney, R.E. (1995). Unconventional myosins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 633 -675.

- Najera C., Ayuso C. (2002) Mutations in myosin VIIA (MYO7A) and usherin (USH2A) in Spanish patients with Usher Syndrome types I and II. *Human Mut.* **20** (1):76-77.
- Newton, et al., (1989) *Nuc. Acids Res.* **17**:2503-2516
- Nuutila, A. (1970). Dystrophia retinae pigmentosa-dysacusis syndrome (DRD): A study of the Usher or Hallgren syndrome. *J. Genet. Hum.* **18**, 57-58.
- Ott, J. (1991). *Analysis of Human genetic linkage*, Johns Hopkins Press, Baltimore.
- Ott J. (1992). *Analysis of Human Genetic Linkage*. Johns Hopkins university Press, Baltimore,MD.
- Pakarinen, L., Karjalainen, S., Simola, K.O.J., Laippala, P. & Kaitalo, H. (1995). Usher syndrome type 3 in Finland. *Laryngosc.* (in press).
- Pakarinen, L., Karjalainen, S., Simola, K. O., Laippala, P. & Kaitalo, H. (1995). Usher's syndrome type 3 in Finland. *Laryngosc.* **105**, 613-617.
- Pakarinen, L., Tuppurainen, K., Laippala, P., Mantyjarvi, M. & Puhakka, H. (1995). The ophthalmological course of Usher syndrome type III. *Int. Ophthalmol.* **19**, 307-311.
- Piazza, L., Fishman, G.A., Farber, M., Derlacki, D. & Anderson, R.J. (1986). Visual acuity loss in patients with Usher's syndrome. *Arch. Ophthalmol.* **104**, 1336-1339.
- Pieke-Dahl, S., Kimberling, W.J., Gorin, M.B., Weston, M.D., Furman, J.M.R., Pikus, A. & Möller, C.G.M. (1993). Genetic heterogeneity of Usher syndrome type II. *J. Med. Genet.* **30**, 843-848.
- Rispoli E, Iannaccone A, Vingolo EM. Low-noise electroretinogram recording techniques in retinitis pigmentosa. *Doc. Ophthalmol.* 1994; 88:27-37
- Rychlik, W. & Rhoads, R.E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing, and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8543-8551.
- Sambrook J., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning*. Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y.
- Sankila, E.M., Pakarinen, L., Kaariainen, H., Aittomaki, S., Karjalainen, P., Sistonen, P. & de la Chapelle, A. (1995). Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 93-98.
- Smith, H.O. & Birnsteil, M.L. (1976). A simple method for restriction site mapping. *Nucl. Acids Res.* **3**, 2387-2397.
- Smith, R.J.H., Pelias, M.Z., Daiger, S.P., Keats, B., Kimberling, W.J. & Hejtmancik, J.F. (1992). Clinical variability and genetic heterogeneity within the Acadian Usher population. *Am. J. Med. Genet.* **43**, 964-969.
- Smith, R.J.H., Lee, E.C., Kimberling, W.J., Daiger, S.P., Pelias, M.Z., Keats, B.J., Jay, M., Bird, A., Reardon, W., Guest, M., et al. (1992). Localization of two genes for Usher syndrome type I to chromosome 11. *Genomics* **14**, 995-1002.
- Smith, R.J.H., Berlin, C.I., Hejtmancik, J.F., Keats, B.J., Kimberling, W.J., Lewis, R.A., Moller, C.G., Pelias, M.Z. & Tranebjaerg, L. (1994). Clinical diagnosis of the Usher syndromes. Usher Syndrome Consortium. *Am. J. Med. Genet.* **50**, 32-38.
- Smith, R.J. (1996). Localization of the Usher syndrome type ID gene (Ush1D). to chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1689-1692.
- Strachan, T., Read, A:P: (1999). *Human Molecular Genetics*. Second Edition. Wiley-Liss. New York. Págs:269-282.

- Sumegi, J., Wang, J.Y., Zhen, D.K., Eudy, J.D., Talmadge, C.B., Li, B.F., Berglund, P., Weston, M.D., Yao, S.F., Ma-Edmonds, M., Overbeck, L., Kelley, P.M., Zabarovsky, E., Uzvolgyi, E., Stanbridge, E.J., Klein, G. & Kimberling, W.J. (1996). The construction of a yeast artificial chromosome (YAC) contig in the vicinity of the Usher syndrome type IIa (USH2A) gene in 1q41. *Genomics* **35**, 79-86.
- Tamayo, M.L., Bernal, J.E., Tamayo, G.E., Frias, J.L., Alvira, G., Vergara, O., Rodríguez, V., Uribe, J.I. & Silva, J.C. (1991). Usher syndrome, results of a screening program in Colombia. *Clin. Genet.* **40**, 304-311.
- Tamayo, M.L., Bernal, J.E., Tamayo, G.E., Frias, J.L. (1992). Study of the Etiology of Deafness in an Institutionalized Population in Colombia. *Am. J. Med. Genet.* **44**: 405-408.
- Tamayo, M.L., Plaza, S., Bernal, J.E., Maldonado, C., Alvira, G., Tamayo, G.E., Zambrano, M. (1993). Resonancia Magnética Cerebral en Síndrome de Usher. *Universitas Médica.* **34**: 25-31.
- Tamayo, M.L., Bernal, J.E., Tamayo, G.E., Vergara, O. (1993). Estudios Genéticos en una Población Sorda Institucionalizada en Colombia. *Universitas Médica.* **34**: 13-18.
- Tamayo, M.L., Bernal, J.E., Rodríguez, A., Molina, M., Martínez, M. (1995). Aspectos Familiares y Psicosociales en Pacientes Sordo- Ciegos. *Universitas Médica.* **36**: 7-13.
- Tamayo, M.L., Maldonado, C., Plaza, S.L., Alvira, G.M., Tamayo, G.E., Zambrano, M., Frias, J.L. & Bernal, J.E. (1996). Neuroradiology and clinical aspects of Usher syndrome. *Clin. Genet.* **50**, 126-132.
- Tamayo, M.L., Rodriguez, A., Molina, R., Martinez, M. & Bernal, J.E. (1997). Social, familial and medical aspects of Usher syndrome in Colombia. *Genet. Couns.* **8**, 235-240.
- Terwilliger JD, Ott J. (1994). Handbook of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore,MD.
- Thompson & Thompson (1996). Genética en Medicina. Cuarta Edición. Masso S.A. Barcelona. Págs: 159-189.
- Usher, C.H. (1935). The Bowman Lecture: On a few hereditary eye afflictions. *Trans. Ophthal. Soc. U. K.* **55**, 164.
- Vahava, O., Morrell, R., Lynch, E.D., Weiss, S., Kagan, M.E., Ahituv, N., Morrow, J.E., Lee, M.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Blumenfeld, A., Frydman, M., Friedman, T.B., King, M.C. & Avraham, K.B. (1998) Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* **279**, 1950-1954.
- Vernon, M. (1969). Usher's syndrome: Deafness and progressive blindness. Clinical cases, prevention, theory and literature survey. *J. Chronic. Dis.* **22**, 133-151.
- Verpy, E; Leibovici, M; Zwanepoel, I. (2000). A defect in Harmonin , a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies usher syndrome type 1C. *Nature Genet.* **26**: 51-55.
- Von Alberth (1961). Neue beobachtungen uber den zusammenhang der verringerung des Sch- und horvermogens an patienten mit degeneration pigmentosa retinae. *Arch. Klin. Exp. Ophth.* **163**: 575- 579.
- Von Graefe, A. (1858). Exceptionelles Verhalten des Gesichtsfeldes bei Pigmententartung der Netzhaut. *Von Graefe's Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **4**, 250-253.
- Wagenaar, M., Snik, A.F.M., Kimberling, W.J. & Cremers, C.W.R.J. (1996). Carriers of the Usher Syndrome Type IB: Is audiometric identification possible? *Am. J. Otol.* **17**, 853-858

- Wayne, S., Der Kaloustian, V., Schloss, M., Polomeno, P., Scott, D.A., Hejtmancik, J.F., Sheffield, V.C. & Smith, R.J.H. (1996). Localization of the Usher syndrome type ID gene (Ush1D) to chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1689-1692.99
- Wayne, S., Lowry, E.B., McLeod, D.R., Knaus, R., Farr, C. & Smith, R.J.H. (1997). Localization of the Usher syndrome type 1F (Ush1F) to chromosome 10. *Am. J. Hum. Genet.* **1752**, A300.
- Weil, D.S., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., Weston, M.D., Kelley, P.M., Kimberling, W.J., Wagenaar, M., Levi-Acobas, F., Larget-Piet, D., Munnich, A., Steel, K.P., Brown, S.D.M. & Petit, C. (1995). Defective myosin VIIa gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* **374**, 60-61.
- Weil, D., Levy, G., Sahly, I., Levi-Acobas, F., Blanchard, S., El-Amraoui, A., Crozet, F., Philippe, H., Abitbol, M. & Petit, C. (1996). Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome, a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3232-3237.
- Weil, D., Kussel, P., Blanchard, S., Levy, G., Levi-Acobas, F., Drira, M., Ayadi, H. & Petit, C. (1997). The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat. Genet.* **16**, 191-193.
- Weston, M.D., Kelley, P.M., Overbeck, L.D., Wagenaar, M., Orten, D., Hasson, T., Chen, Z.Y., Corey, D., Mooseker, M.S., Sumegi, J., Cremers, C., Möller, C., Jacobson, S.G., Gorin, M.B. & Kimberling, W.J. (1996). Myosin VIIa screening in 189 Usher syndrome type 1 patients. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 1074-1083.
- Weston, M.D., Eudy M.D., Fujita S., Yao S., Usami S., Cremers, C., Greenburg R., Ramesar R., Martini A., Moller C., Smith R.J., Sumegi, J.,, Möller, C., & Kimberling, W.J. (2000). Genomic Structure and Identification of Novel Mutations in Usherin, the gene Responsible for Usher Syndrome Type Iia.. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 1199-1210.
- Wolfrum, U., Schmitt, A. (2000). Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. **46**: 95-107.
- Zubair, M; Riazuddin, S. (2001). Mutations of the Protocadherin Gene PCDH15 cause Usher Syndrome Type 1F. *Am. J. Hum. Genet.* **69**:
- Zwaenepoel, I; Verpy, E; Blanchard,S. (2001). Identification of three novel mutations in the USH1C gene and detection of thirty-one polymorphisms used for haplotype analysis. *Hum. Mutat.* **17**:34-41.

**10. ANEXO 1*****CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN  
INVESTIGACIÓN***

*Estudio:*

***ESTUDIOS CLINICOS Y MOLECULARES EN EL SÍNDROME DE USHER***

Quisiéramos invitarlos a usted y a su familia a participar en un estudio investigativo propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana, con la colaboración de la Fundación Oftalmológica Nacional Bogotá, Colombia.

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Esta investigación nos permite clarificar muchos conceptos sobre la enfermedad y su mecanismo de herencia, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros. Tanto Ud. como su familia tendrán la satisfacción de haber colaborado para un mejor entendimiento de esta entidad genética, con lo cual se dará un paso en la búsqueda de una posible cura para beneficio de futuras generaciones. Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. Si tiene alguna pregunta por favor no dude en hacerla a alguno de los investigadores, quienes con mucho gusto le aclararán sus inquietudes.

## **EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO**

### **OBJETIVO:**

El objetivo principal de este estudio investigativo es el de clarificar conceptos y mejorar el entendimiento de esta enfermedad hereditaria que produce limitación visual, sabiendo que las causas de estos problemas en su mayoría son alteraciones en los genes. Estos genes son heredados de padres a hijos. Nuestra meta es encontrar el gen que causa esta enfermedad de entre los aproximadamente 30.000 genes que posee cada persona. Esto se hace obteniendo muestras de las familias que poseen la enfermedad para así buscar el gen en la familia utilizando marcadores específicos.

### **PROCEDIMIENTO:**

Se tomará una muestra de aproximadamente 7ml de sangre mediante punción en la vena, o mediante una pequeña punción en el dedo. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio en el Instituto de Genética Humana. Si usted decide retirarse del estudio, sus muestras dejarán de ser utilizadas de inmediato.

### **BENEFICIOS:**

Este estudio nos ayudará a entender las causas de su enfermedad genética. Tanto Ud. como su familia tendrán la satisfacción de haber colaborado para un mejor entendimiento de esta entidad genética, con lo cual se dará un paso en la búsqueda de una posible cura para beneficio de futuras generaciones. Puede darse el caso en el cual usted no se beneficie directamente del estudio, pero tanto su familia como otros individuos afectados sí pueden beneficiarse. En el caso donde se logre conocer el gen alterado, se le informará inmediatamente.

Es importante aclarar que ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras.

### **OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE:**

#### **Confidencialidad:**

Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas medicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana. Las historias medicas, resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado es absolutamente confidencial. De manera que solamente usted y el investigador tendrán acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

Dra. Martalucía Tamayo MD, MSc  
Unidad de Genética Clínica  
Programa de Estudios Genéticos en Enfermedades Visuales y Auditivas  
Instituto de Genética Humana Javeriana  
Tel (91) 3-20-83-20 ext. 2823, 2788.



**AUTORIZACION:**

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.**
  
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:**
  - En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, enviando la muestra al exterior a el(los) laboratorio(s) de el(los) instituto(s) antes mencionado(s). Si No
  
  - En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia : Si No
  
  - En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No
  
  - En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No
  
  - En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:**

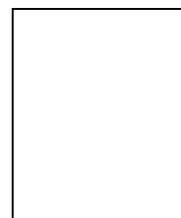
**ESTUDIOS CLINICOS Y MOLECULARES EN EL SÍNDROME DE USHER**

Yo, \_\_\_\_\_ identificado con documento de identificación: No. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre, o al menor \_\_\_\_\_, del que soy responsable, con el fin de realizar análisis de laboratorio. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

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

\_\_\_\_\_  
Paciente o Acudiente o Representante legal

Testigo



Huella Digital dedo índice derecho

\_\_\_\_\_  
Investigador