

Nueva mutación en GPR98 en familia holguinera con Síndrome Usher tipo II

New mutation in GPR98 in Holguin family with Usher Syndrome type II

Elayne Esther Santana Hernández^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-0476-9792>

Paulina Araceli Lantigua Cruz² <https://orcid.org/0000-0002-8549-2571>

José María Millán Salvador³

¹Centro Provincial de Genética Médica de Holguín. Cuba.

²Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

³Hospital Universitario La Fe. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Valencia, España.

*Autor encargado de la correspondencia. Correo electrónico: elsantana@infomed.sld.cu

Resumen

Introducción: El síndrome Usher tipo II es una enfermedad genética caracterizada por hipoacusia neurosensorial bilateral congénita de moderada a severa, inicio pospuberal de la retinosis pigmentaria y función vestibular normal. Con un patrón de transmisión autosómico recesivo, se presenta con gran heterogeneidad clínica y genética. El tipo II es el más frecuente en todas las regiones.

Objetivo: Caracterizar molecularmente a enfermos de una familia en la provincia de Holguín con diagnóstico clínico de síndrome Usher tipo II.

Métodos: Se realizó estudio molecular mediante un panel de genes de secuenciación de nueva generación, que incluye todas las regiones codificantes de los 11 genes responsables de síndrome de Usher descritos hasta la fecha. La presencia de las mutaciones detectadas mediante esta tecnología, se confirmó mediante secuenciación directa por el método Sanger.

Resultados: Tras el análisis se detectó la presencia de una mutación en homocigosis en el gen GPR98 (NM_032119.3): c.15446_15447 del CT (exón 74) no descrita con anterioridad. Adicionalmente, se identificó la mutación c.3242 G > A en el exón 28 del gen CDH23 (exón 28) en heterocigosis. Según el programa Polyphen este cambio es probablemente patológico, por lo que podría estar modificando el fenotipo causado por las mutaciones en GPR98.

Conclusiones: Se conoce nueva mutación en GPR98 no descrita anteriormente y otra en CDH23, lo que muestra variabilidad genética. Esta investigación ayudará a diseñar estudios similares que caractericen molecularmente la enfermedad en las familias cubanas, lo cual beneficiará la prevención y facilitará la realización de un asesoramiento genético adecuado.

Palabras clave: síndrome Usher; pérdida auditiva; genética; GPR98; retinosis pigmentaria asociada a sordera; caracterización molecular.

ABSTRACT

Introduction: Usher type II syndrome, a genetic disease characterized by moderate to severe congenital bilateral sensorineural hearing loss, onset of postpubertal pigmentary retinitis and normal vestibular function. With autosomal recessive transmission pattern, it presents with great clinical and genetic heterogeneity. Type II is the most common in all regions.

Objectives: to characterize molecularly the patients of a family with clinical diagnosis of syndrome Usher type II, in the province of Holguín.

Methods: We performed a molecular study using a panel of new generation sequencing genes, which includes all the coding regions of the 11 genes responsible for Usher's syndrome described to date. The presence of mutations detected by this technology was confirmed by direct sequencing by the Sanger method.

Results: the presence of a mutation in homozygosis in the GPR98 gene (NM_032119.3): c.15446_15447delCT (exon 74) not previously described was detected after the analysis. In addition, the c.3242 G> A mutation was found in exon 28 of the CDH23 gene (exon 28) in heterozygosity. According to the Polyphen program this change is probably pathological so it could be modifying the phenotype caused by the mutations in GPR98.

Conclusions: new mutation is known in GPR98 not previously described and another in CDH23 showing genetic variability. This research will help design similar studies in order to molecularly characterize this disease in Cuban families, which will benefit prevention and facilitate proper genetic counseling.

Key words: Usher syndrome, hearing loss, genetics, GPR98, pigmentary retinitis associated with deafness, molecular characterization.

Recibido: 16/01/2018

Aceptado: 04/09/2018

INTRODUCCIÓN

El síndrome Usher (USH) es un heterogéneo grupo de enfermedades hereditarias, autosómicas recesivas, caracterizadas por hipoacusia neurosensorial bilateral congénita, retinosis pigmentaria (RP) y se acompaña en ocasiones de alteración vestibular.^(1,2)

El síndrome Usher tipo II (USH2) es el más frecuente de los tipos descritos. Por su doble discapacidad, esta enfermedad tiene un impacto social y representa un problema de salud en algunos países.^(3,4,5)

Se considera que el USH2 constituye la primera causa de sordo-ceguera hereditaria a nivel mundial, y provoca entre 3-6 % de los casos de niños con sordera y entre 8-33 % de los pacientes con RP. Su prevalencia es variable, oscila entre 2,2 x 100 000 habitantes en Dinamarca y 4,4 x 100 000 habitantes en Estados Unidos. Para España se ha estimado en 4,2 x 100 000 habitantes, aunque estudios recientes consideran que pudiera ser el doble.⁽⁶⁾

El USH es clínica y genéticamente heterogéneo. Hasta la fecha se han descrito 11 genes responsables del síndrome Usher: MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G, CIB2, USH2A, GPR98, DFNB31, CLRN1 y HARS. Desde el punto de vista clínico se puede dividir en 3 tipos bien caracterizados y un cuarto tipo atípico, atendiendo al carácter estable o

progresivo de la sordera, al momento de aparición de la RP y a la existencia o no de disfunción vestibular.⁽²⁾

En Cuba se realiza detección de dos mutaciones: 2299delG y C759F en el laboratorio de biología molecular del Centro Nacional de Genética Médica. En la actualidad, desde el punto de vista asistencial, no se dispone de la detección de otras mutaciones responsables de esta enfermedad en familias cubanas.

Este estudio permitirá diseñar protocolos para estandarizar nuevas mutaciones para el diagnóstico molecular de esta enfermedad en Cuba, con vistas a poder efectuar prevención secundaria en las familias caracterizadas a través del diagnóstico prenatal molecular. Por otra parte, los resultados de esta investigación contribuyen al conocimiento de las mutaciones causante de esta afección en el país, posibilitando un adecuado asesoramiento genético a cada familia.

Se realiza esta investigación con el fin de caracterizar molecularmente a enfermos de una familia con diagnóstico clínico de síndrome Usher tipo II, que residen en la provincia de Holguín.

MÉTODOS

Se realizó estudio molecular analizando ADN de cuatro enfermos de una familia con diagnóstico clínico de USH2. Se obtuvo 20 mL de sangre venosa periférica de cada individuo siguiendo procedimientos estandarizados y las normas de bioseguridad establecidas. La sangre se depositó en tubos cónicos de 50 mL, junto con 200 µL de ácido etilendiamino tetraacético como anticoagulante. Las muestras se conservaron en frío a 4 °C hasta el momento de la extracción. Se obtuvo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica, el último paso de centrifugación produjo dos fases separadas; la fase superior correspondió al ADN genómico. Este ADN fue precipitado con etanol absoluto glacial y luego lavado tres veces con etanol al 70 %. El etanol fue eliminado y el ADN fue secado en una estufa durante una hora a 55 °C. Una vez seco, el ADN fue disuelto con una solución de tris-EDTA (*buffer TE*).^(6,7,8)

Se realizó este estudio a través de un proyecto de colaboración internacional entre el Hospital Universitario de La Fe, Valencia, España con la Universidad de Ciencias Médicas de la provincia de Holguín desde el 2015. El estudio de las muestras se efectuó en el laboratorio de biología molecular del mencionado hospital. Para su análisis se diseñó un panel *AmpliSeq* personalizado utilizando la herramienta (*Ion AmpliSeq Designer de Thermo Fisher Scientific Inc.*) (www.ampliseq.com). La presencia de las mutaciones detectadas mediante esta tecnología se confirmó en ese mismo laboratorio, mediante secuenciación directa por el método de Sanger.⁽⁹⁾

La amplificación de los objetivos se realizó de acuerdo con el protocolo *Ion AmpliSeq™* (*Library Kit 2.0 Thermo Fisher Scientific Inc.*) para la secuenciación *Ion Torrent*. La secuenciación se llevó a cabo con una cobertura mínima teórica de 500x en el sistema PGM o *Ion Proton*.⁽¹⁰⁾

Los datos de secuenciación resultantes se analizaron con la herramienta de (*software Ion Reporter™*) (www.ionreporter.thermofisher.com/) con respecto a la secuencia consenso de genoma humano (*Human Ensemble GRCh37*) (también conocido como hg19). Las variantes anotadas se filtraron según un valor de frecuencia de alelo menor (MAF) de 0,01; su anotación en dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), su descripción en la base de datos (https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/) de mutación del síndrome Usher y el tipo de mutación.^(10,11)

La nueva variante encontrada en la cohorte de probandos se categorizó según las pautas de la Sociedad de Genética Clínica y Molecular (<https://www.emqn.org/emqn/Best+Practice>) con el sistema de clasificación de variantes desconocidas (https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/), se utilizaron herramientas de predicción bioinformáticas (*PolyPhen-2*). Este programa establece tres clasificaciones basadas en un puntaje que varía de 0,0 (benigno) a 1,0 (dañino): Probablemente patógena (se predice que la sustitución es dañina con alta confianza), Posiblemente patógena (se predice que la sustitución es perjudicial con poca confianza) y “Benigno” (se predice que la sustitución es benigna).^(12,13) Se solicitó por escrito, conforme con el carácter exclusivamente científico de la investigación, el consentimiento informado a la familia, la que estuvo de acuerdo en participar. Se realizó la

investigación respetando los principios de la Declaración de Helsinki. Se revisaron las historias clínicas de los enfermos recolectando datos de interés para este estudio.

RESULTADOS

Se estudió una familia holguinera con varios de sus miembros afectados con diagnóstico clínico de USH2. Entre las variables clínicas analizadas estuvieron la función vestibular, la hipoacusia, su severidad y la edad al momento del diagnóstico. Los exámenes audiológicos reflejados en las historias clínicas corroboran que los 4 hermanos presentaban hipoacusia neurosensorial bilateral congénita, de forma severa los tres varones y la paciente femenina, aunque con el mismo tipo de hipoacusia, tenía una forma moderada que le permitió desarrollar lenguaje. Los primeros síntomas de afectación del órgano de la visión se presentaron en la paciente femenina a los 12 años y la retinosis pigmentaria (RP) se le diagnosticó a los 17 años. Los varones, fueron diagnosticados con RP a los 14, 16 y 19 años respectivamente.

La función vestibular se exploró a través de prueba calórica y los resultados aparecen en las historias clínicas de cada uno. Este examen permitió confirmar que los cuatro tuvieron respuesta ante el estímulo calórico con movimientos oculares (nistagmo), resultando normal, quedando clasificados por sus características clínicas como síndrome USH2.

Sin embargo, la evolución de la RP se ha comportado de forma variable entre los cuatro hermanos, llamando la atención que en los tres varones la evolución de la degeneración retiniana por RP ha sido más rápida, encontrándose ya en estadio IV de RP los dos primeros varones enfermos, el tercero en estadio III y la fémica en estadio II.

En la figura 1 se muestra el árbol genealógico de la familia, donde se aprecian cuatro generaciones. En la tercera generación se observan los cuatro enfermos (dos parejas de hermanos), todos estos contrajeron matrimonio con personas sin síntomas auditivos, ni visuales por RP y sus descendientes todos son oyentes y no se recoge aún ninguna alteración visual.

Tras el análisis molecular se detectó en los cuatro afectados la presencia de una mutación en homocigosis en el gen GPR98 (NM_032119.3): c.15446_15447delCT (exón 74), como se observa en la figura 2.

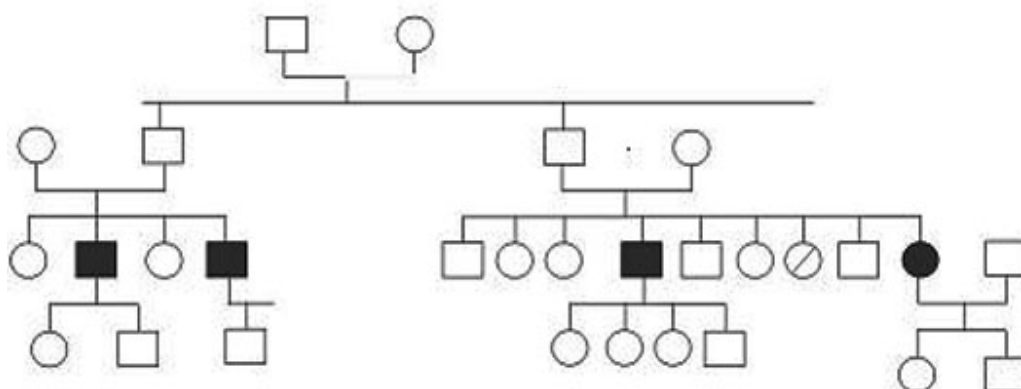


Fig. 1. Árbol genealógico de familia holguinera con USH2A, en el que se ha destacado los individuos objeto de estudio (III-2, III-4, III-8, III-13)

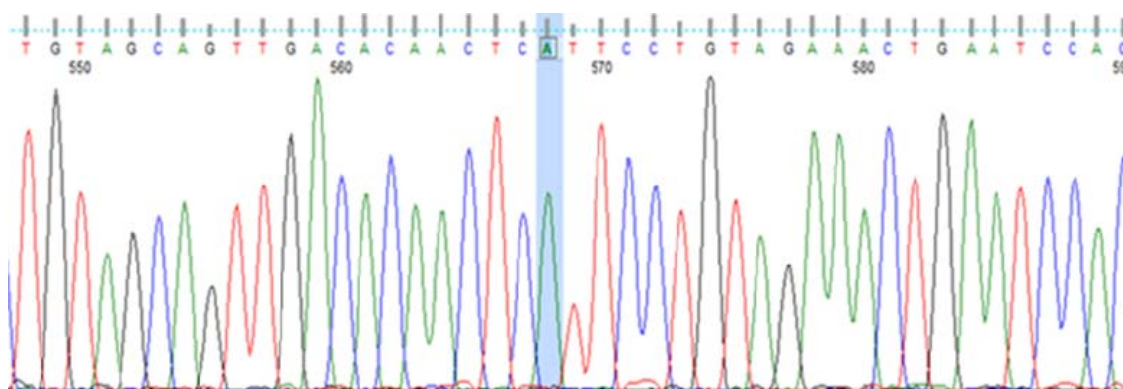


Fig. 2. Electroferograma de la mutación encontrada en el gen GPR98

Adicionalmente, se encontró la mutación (c.3242G>A) en el exón 28 del gen CDH23 (exón 28) en heterocigosis. Sometida al análisis de predictores bioinformáticos como el programa Polyphen-2 que resuelve este cambio como probablemente patógena.

DISCUSIÓN

El gen GPR98, conocido anteriormente como gen VLGR1, está localizado en el cromosoma 5q13 y contiene 90 exones y, al menos, 600 kb. Se describió por primera vez su implicación en

la aparición del USH2 en 2004.^(1,4) Se han identificado varias mutaciones en GPR98 entre los pacientes con sordo-ceguera y varios estudios informan esta mutación en retina fetal humana y en la cóclea.^(7,8)

El gen GPR98 codifica una de las proteínas más grandes encontradas en humanos. Esta proteína pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G, también conocidos como receptores transmembrana de 7 dominios, específicamente a la familia B, que se caracterizan por su gran dominio N-terminal extracelular. La proteína se compone de varios dominios, cada uno con una función específica. Se han descrito múltiples isoformas de la proteína codificadas por este gen. Tres isoformas GPR98 en RNAm humanos son conocidos, de los cuales la isoforma b es la más grande y contiene 90 exones. Las tres isoformas se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso central y se encuentran en la retina fetal.⁽⁹⁾

Otros estudios también han declarado varias mutaciones para el gen GPR98, como: c.6901C>T (p.Gln2301*), c.8713_8716dup (p.Ile2906Lysfs*6), c.8790del (p.Met2931Trpfs*11), c.18732_18750del (p.Tyr6244*) y c.18131A>G (p.Tyr6044Cys). Se describió una gran delección (g.371657_507673del), en los exones 84 y 85, lo que presumiblemente condujo a una mutación de desplazamiento del marco de lectura en una familia iraní afectada.⁽⁴⁾

En el 2013 se identificaron algunas mutaciones nuevas, c.17368_17369delinsTTAT (p.Ser5790Leufs*6), c.18261delA (p.Gln6088Serfs*20), c.17204+4_17204+7del, c.6932_6939dup (p.Glu23140Thrfs*13) y c.125281G>T.⁽⁶⁾ Otro estudio,⁽⁷⁾ realizado en el 2014 por la misma investigadora, aplicó una técnica de amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA) combinada con un análisis de hibridación genómica comparativa (aCGH) basado en matriz personalizada; detectaron seis grandes delecciones que involucran a USH tipo II. Tres de los pacientes eran homocigotos para la delección y los tres restantes eran heterocigotos compuestos con una mutación puntual previamente identificada.⁽⁷⁾

En el 2017 se identificó una nueva mutación en homocigosis en una familia cubana, ocasionada por un desplazamiento del marco de lectura; producto a una delección de dos bases citosina y timina (CT) en la posición desde 15448 hasta 15449 (c.15448_15449delCT) en el exón 74. Esta mutación por desplazamiento del marco de lectura en el codón 5150 resultó un codón de parada y causó un cambio de aminoácido (p.Leu5150Hisfs*6) alterando la función de la proteína.

Adicionalmente se detectó otra mutación (c.3242G>A), un cambio de glicina por adenina, en la posición 3242 el exón 28, del gen CDH23 en heterocigosis. Estas mutaciones fueron analizadas por las herramientas predicción bioinformáticas, que permiten detectar variantes de un solo nucleótido, inserciones cortas y deleciones,^(10,11,12,13) específicamente el programa Polyphen-2. Este programa informó la primera mutación como patogénica y la segunda como probablemente patogénica. Esto permitió caracterizar molecularmente esta familia afectada con USH2.

Otro trabajo reportó una mutación producto de una gran deleción (g.371657_507673del) de los exones 84 y 85, que presumiblemente condujo a un cambio de marco de lectura. Una gran eliminación en el gen GPR98 de 136017 pares de bases en una familia iraní, con USH2; estudio muy similar al realizado en esta familia cubana, hace sospechar que el tamaño de este gen favorece continuamente estos sucesos. Todas estas mutaciones anteriormente mencionadas están publicadas en los genes USH, registrado en la base de datos (https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/USHbases.html).⁽¹⁴⁾

En otra investigación efectuada en el 2015 con 194 pacientes con pérdidas de la audición, se identificaron en dos hermanos nuevas mutaciones causales que eran una mutación de cambio de marco de lectura y una mutación *missense* en GPR98. La primera mutación correspondió a c.16604_16611delGTACCCAG (NM_032119) y dio lugar a la mutación de cambio de marco y truncar (p.Ser5535Argfs*6). La segunda mutación fue c.9464C>A (p.Ala3155Asp). También se realizó la secuenciación de Sanger para el estudio de la segregación de la familia; reveló la secuenciación de Sanger que los padres tenían cada uno una mutación de forma heterocigoto por que se diagnosticaron como portadores sanos y sus hijos tenían mutaciones bialélicas.⁽¹⁵⁾ Este estudio también es muy semejante al presente, con la diferencia que no se han estudiado los padres, pero lo reportado es lo que generalmente se espera encontrar en los progenitores.

Nuestra investigación estudió cuatro hermanos con la misma mutación; sin embargo, llama la atención cómo la hipoacusia se mostró de forma variable, así como el grado o estadio clínico de la RP, esta variabilidad clínica observada en otras investigaciones, permiten sospechar la existencia de genes modificadores de la expresión clínica. Estos aspectos clínicos también fueron evaluados en otro artículo,⁽¹⁶⁾ pero con la diferencia que se identificaron tres mutaciones

distintas, observándose también similitudes y diferencias del fenotipo auditivo entre varios hermanos, que varió desde una hipoacusia leve hasta una profunda.⁽¹⁶⁾

Todos los estudios revisados muestran la variabilidad clínica y genética de esta enfermedad; que tiene gran heterogeneidad clínica y genética alélica y no alélica de *locus*, como lo refiere otra investigación publicada en el 2014, que reportó once de las mutaciones detectadas como novedosas y causantes de proteínas truncadas, incluida una reorganización compleja en GPR98. Estos datos resaltan la diversidad genética del síndrome de Usher en la población libanesa y el enfoque de secuenciación completa del exoma para el análisis de mutaciones de afecciones genéticamente heterogéneas causadas por genes grandes.⁽¹⁷⁾

Otra investigación desarrolló y validó un enfoque de secuenciación de ADN de nueva generación para identificar variantes intrónicas profundas y evaluó sus consecuencias en el empalme. Fueron identificadas tres nuevas mutaciones intrónicas profundas novedosas.⁽¹⁸⁾

Por primera vez en el 2001 un estudio realizado en una familia cubana con 23 enfermos con USH1 identificó mutación en el gen CDH23. Este fue efectuado por *Bolz* y otros,⁽²⁰⁾ entre los que se encontraba el profesor *Orfilio Peláez*. La familia cubana portaba diferentes combinaciones de haplotipos. La secuenciación directa reveló dos alteraciones; una transición c.5237G>A en el exón 40 y una transversión c.4488G>C del último nucleótido del exón 35. La transición c.5237G>A desencadenó la sustitución de aminoácidos no conservativa R1746Q en una región enlazadora entre repeticiones de cadherina, se encontró en forma homocigótica en dos pacientes. En vistas de que c.4488G es el último nucleótido del exón 35, este cambio de nucleótidos puede interferir con el empalme normal, ya que el último nucleótido exónico es un residuo de guanina en aproximadamente el 80 % de los casos; en comparación con la citosina en esta posición (4 %). Esta es la segunda mutación en familias cubanas para el gen CDH23, transición c.3242G>A en el exón 28, presente en estado heterocigótico y declarada probablemente patógena.

Las mutaciones encontradas pudieran explicar en parte estas particularidades mostradas en estos enfermos, donde la mutación en cadherina 23, pudiera estar actuando como una mutación modificadora de la expresión fenotípica y de la mutación en homocigosis en el gen GPR98. También pudiera advertir la presencia de otros genes modificadores, con influencia de factores epigenéticos.

En el 2009 se especuló que las mutaciones GPR98 causan un fenotipo más severo y finalmente letal en los hombres, ya que hasta la fecha estas se habían estudiado solamente en fémimas y, por primera vez, se analizó en dos pacientes varones con USH2, con nuevas mutaciones GPR98. La caracterización clínica de un paciente masculino y su hermana afectada reveló un fenotipo USH2 típico en ambos sexos.⁽¹⁹⁾

Concluyendo, se logró caracterizar molecularmente a cuatro pacientes con diagnóstico clínico de USH2 en una familia holguinera. Se descubrió nueva mutación en el gen GPR98 en homocigosis y otra en heterocigosis en el gen CDH23. Es importante describir las mutaciones causantes en familias cubanas para poder trazar estrategias futuras que posibiliten efectuar prevención secundaria. El conocimiento de estas mutaciones facilita el adecuado asesoramiento genético y la posibilidad de estandarizar la detección de estas mutaciones encontradas para que estén disponibles para el diagnóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C: An update on the genetics of usher syndrome. J Ophthalmol [Internet]. 2011;417217. Acceso: 02/05/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3017948/>
- 2- Yan D, Liu XZ. Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. J Hum Genet. 2010;55(6):327-35. Acceso: 09/01/2017 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20379205>
- 3- Moteki H, Yoshimura H, Azaiez H, Booth KT, Shearer AE, Sloan CM, et al. USH2 caused by GPR98 mutation diagnosed by massively parallel sequencing in advance of the occurrence of visual symptoms. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2015;124(Suppl 1):123S-8S. Acceso: 12/03/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743181>
- 4- Kahrizi K, Bazazzadegan N, Jamali L, Nikzat N, Kashef A, Najmabadi H. A novel mutation of the USH2C (GPR98) gene in an Iranian family with Usher syndrome type II. J Genet. 2014;93(3):837-41. Acceso: 02/05/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572244>

- 5- Aparisi MJ, Aller E, Fuster-García C, García-García G, Rodrigo R, Vázquez-Manrique RP, et al. Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:168. Acceso: 06/02/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404053>
- 6- García-García G, Besnard T, Baux D, Vaché C, Aller E, Malcolm S, et al. The contribution of GPR98 and DFNB31 genes to a Spanish Usher syndrome type 2 cohort. *Mol Vis.* 2013;19:367-73. Acceso: 15/03/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441107>
- 7- García-García G, Aller E, Jaijo T, Aparisi MJ, Larrieu L, Faugère V, et al. Novel deletions involving the USH2A gene in patients with Usher syndrome and retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2014;20:1398-410. Acceso: 15/03/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352746>
- 8- Vaché C, Besnard T, le Berre P, García-García G, Baux D, Larrieu L, et al. Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy. *Hum Mutat.* 2012;33(1):104-8. Acceso: 02/05/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009552>
- 9- Licastro D, Mutarelli M, Peluso I, Neveling K, Wieskamp N, Rispoli R, et al. Molecular diagnosis of Usher syndrome: application of two different next generation sequencing-based procedures. *PLoS One.* 2012;7(8):e43799. Acceso: 06/02/2017. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043799>
- 10- Krawitz PM, Schiska D, Krüger U, Appelt S, Heinrich V, Parkhomchuk D, et al. Screening for single nucleotide variants, small indels and exon deletions with a next-generation sequencing based gene panel approach for Usher syndrome. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2(5):393-401. Acceso: 09/01/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333064>
- 11- Pedersen AG, Nielsen H. Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *ISMB.* 1997;5:226-33. Acceso: 06/02/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322041>

- 12- Liu H, Han H, Li J, Wong L. DNAFS Miner: a web-based software toolbox to recognize two types of functional sites in DNA sequences. *Bioinformatics*. 2005;21(5):671-3. Acceso: 02/05/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284102>
- 13- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67. Acceso: 15/03/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339519>
- 14- Hilgert N, Kahrizi K, Dieltjens N, Bazazzadegan N, Najmabadi H, Smith RJ, et al. A large deletion in GPR98 causes type IIC Usher syndrome in male and female members of an Iranian family. *J Med Genet*. 2009;46(4):272-6. Acceso: 02/05/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357116>
- 15- Moteki H, Yoshimura H, Azaiez H, Booth KT, Shearer AE, Sloan ChM, et al. USH2 caused by *GPR98* mutation diagnosed by massively parallel sequencing in advance of the occurrence of visual symptoms. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124(10):123S-8S. Acceso: 15/03/2017. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4441826/>
- 16- Sadeghi AM, Cohn ES, Kimberling WJ, Halvarsson G, Möller C. Expressivity of hearing loss in cases with Usher syndrome type IIA. *Int J Audiol*. 2013;52(12):832-7. Acceso: 06/02/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24160897>
- 17- Reddy R, Fahiminiya S, El Zir E, Mansour A, Megarbane A, Majewski J, et al. Molecular genetics of the Usher syndrome in Lebanon: identification of 11 novel protein truncating mutations by whole exome sequencing. *PLoS One*. 2014;9(9):e107326. Acceso: 02/05/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25211151>
- 18- Liquori A, Vaché C, Baux D, Blanchet C, Hamel C, Malcolm S, et al. Whole USH2A gene sequencing identifies several new deep intronic mutations. *Hum Mutat*. 2016;37(2):184-93. Acceso: 18/04/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629787>
- 19- Ebermann I, Wiesen MH, Zrenner E, Lopez I, Pigeon R, Kohl S, et al. GPR98 mutations cause Usher syndrome type 2 in males. *J Med Genet*. 2009;46(4):277-80. Acceso: 02/05/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357117>

20- Bolz H, von Brederlow B, Ramírez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, et al. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. Nat Genet. 2001;27(1):108-12. Acceso: 15/03/2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138009>

Conflicto de Intereses

Yo, la investigadora principal de este trabajo, declaro que no existen conflictos de intereses.

Contribuciones de los autores

Elayne Esther Santana Hernández: Investigador principal. Fue quien confeccionó el artículo, diseñó y realizó el estudio clínico a la familia, revisó literatura actualizada y de las historias clínicas de los enfermos que atiende en consulta. Revisó y aprobó la versión final del artículo.

Paulina Araceli Lantigua Cruz: Tutor de esta investigación. Ayudó a delinear e identificar los objetivos del estudio. Revisó y aprobó la versión final del artículo.

José María Millán Salvador: Segundo tutor de la investigación. Brindó la posibilidad de realizar en el laboratorio que dirige el estudio molecular de estos afectados libre de costo para el país. Redactó el apartado de los métodos de la investigación. Revisó y aprobó la versión final del artículo.