

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

**“ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DEL GEN GJB2 EN
HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA EN
UNA MUESTRA DE POBLACIÓN MEXICANA”**

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DULCE MARÍA CASTRO COYOTL

JEFE DE SERVICIO: DR. SERGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS

ASESOR DE TESIS: DRA. MA. DEL REFUGIO RIVERA VEGA

MÉXICO, D. F.

JULIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA
MÉDICA ADSCRITA AL SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
ASESORA DE TESIS

“ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DEL GEN GJB2 EN
HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA EN UNA
MUESTRA DE POBLACIÓN MEXICANA”

PRESENTA:

DULCE MARÍA CASTRO COYOTL

ASESOR:

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

COLABORADORES:

M. EN C. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

DRA. MARIANA ARELLANO SÁNCHEZ

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA, HOSPITAL GENERAL DE
MÉXICO.

MÉXICO, D. F.

JULIO 2009

*La gente es a menudo insensata, ilógica y egoísta;
Perdónalos de todas maneras.*

Si eres noble, la gente te puede acusar de egoísta, Sé noble de todas maneras.

*Si eres exitoso, ganarás algunos amigos falsos y algunos enemigos;
Sé exitoso de todas maneras.*

*Si eres honesto y franco la gente te puede engañar;
Sé honesto y franco de todas maneras.*

*Cuando pases años construyendo alguien podría destruirlo de la noche a la mañana;
Construye de todas maneras.*

*Si encuentras serenidad y felicidad Ellos podrían volverse envidiosos;
Sé feliz de todas maneras.*

*El Bien que hagas hoy la gente a menudo lo olvidará mañana;
Haz el bien de todas maneras.*

*Dale al mundo lo mejor que tengas y podría no ser suficiente;
Dale al mundo lo mejor que tengas de todas maneras.*

*Verás, el análisis final Es entre tú y Dios;
Nunca fue entre tú y ellos de todas maneras.*

*"No podemos hacer grandes cosas
Sólo cosas pequeñas con Gran Amor"*

Madre Teresa de Calcuta

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la oportunidad de cumplir esta meta.

A mi esposo José David porque siempre ha estado a mi lado apoyándome.

A mis hijas María José y María Itzel porque ellas son mi mayor fuente de inspiración y de amor.

A mis padres Mercedes y Efrén por su ayuda incondicional.

A mis hermanos Nohemí, Conrado, Efrén y Alfredo por su solidaridad.

A la Dra. Rivera y la Maestra Alicia porque compartieron conmigo sus conocimientos.

A Jaime y Miguel por su amistad

A todos los que de una u otra forma contribuyeron a la obtención de este grado académico.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	6
II.	ANTECEDENTES	7
	1. Mecanismo de la audición normal	8
	2. Gen <i>GJB2</i>	11
	3. Conexina 26	13
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	18
IV.	OBJETIVO	19
V.	HIPÓTESIS	19
VI.	DISEÑO DEL ESTUDIO	20
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	1. Poblaciones incluidas en el estudio	21
	2. Estudio molecular	22
VIII.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
IX.	ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	30
X.	RESULTADOS	31
XI.	DISCUSIÓN	38
XII.	CONCLUSIONES	41
XIII.	ANEXOS	
	1. Anexo 1: Consentimiento informado.	42
	2. Anexo 2: Secuencia del gen <i>GJB2</i> .	43
XIV.	REFERENCIAS	44

I. RESUMEN

La hipoacusia es el más frecuente de los defectos sensoriales, con una incidencia de aproximadamente 1 en 500 niños, de etiología diversa, con implicaciones clínicas, sociales y en la calidad de vida.

La mitad de los casos de hipoacusia congénita se debe a factores genéticos, de éstos 70% se clasifican como no sindrómicos siendo la transmisión autosómica recesiva la más frecuente.

El descubrimiento de diferentes mutaciones que conducen a hipoacusia ha llevado a aclarar las bases moleculares de la fisiología coclear. Un elemento fundamental en el funcionamiento normal del órgano de Corti es el reciclaje del potasio, algunas alteraciones en este mecanismo son las causas más frecuentes de sordera de origen genético, destacándose la mutación en el gen *GJB2* el cual codifica para la conexina 26, una proteína de las uniones gap, responsable de más de la mitad de casos de sordera no sindrómica.

Debido a la variabilidad racial, es importante conocer las mutaciones genéticas más relevantes en nuestra población.

En el presente estudio se realizó el análisis molecular del gen *GJB2* en 16 familias mexicanas, 39 individuos en total, 23 afectados y 16 asintomáticos. Se identificó mutación en 86.95% de los casos. Cinco diferentes mutaciones fueron halladas, la más frecuente V27I, además se identificó una no reportada en estudios previos, la V63A. Un dato importante es la alta prevalencia de heterocigotos encontrados, lo que podría ser explicado por la presencia de dobles heterocigotos con alteraciones en el gen de la conexina 30.

II. ANTECEDENTES

La hipoacusia es el defecto neurosensorial más común en humanos. La incidencia varía de 1 en 300 a 1 en 1000 niños. Es causada por factores genéticos en aproximadamente la mitad de los casos, el resto es secundaria a factores ambientales tales como infecciones, traumatismos y causas iatrogénicas.^{1,2,3}

La hipoacusia se clasifica de acuerdo a diferentes criterios, que son: por la severidad del defecto, a) leve de 26 a 40 dB, b) moderada de 41 a 55 dB, c) moderadamente severa de 56 a 70 dB, d) severa de 71 a 90 dB y e) profunda >90 dB. En cuanto a la edad de inicio se clasifica en prelingual, o postlingual. Por el sitio anatómico puede ser conductiva, caracterizada por anomalías del oído externo y/o de los huesecillos del oído medio; neurosensorial, debida a la alteración de estructuras del oído interno tales como la cóclea; mixta, la combinación de hipoacusia conductiva y neurosensorial y central, causada por daño o disfunción a nivel del octavo nervio craneal, del tallo o la corteza cerebral.^{4,5}

La hipoacusia de origen genético tiene gran heterogeneidad, se estima que aproximadamente 1% de todos los genes humanos están involucrados en el proceso de audición.^{4,6}

Las hipoacusias genéticas pueden ser divididas en sindrómicas y no sindrómicas. La sordera sindrómica se caracteriza por presentar manifestaciones clínicas adicionales, como en el síndrome de Usher que se asocia a retinosis pigmentosa; el síndrome de Pendred que presenta bocio eutiroideo y malformaciones del oído interno; el síndrome de Treacher-Collins dismorfias craneofaciales, el síndrome de Stickler habitus marfanoide, el síndrome de Alport anomalías renales y el síndrome de Jervell y Lange-Nielsen intervalos QT largos.^{5,7} Se han descrito más de 400 síndromes en los cuales la hipoacusia es un componente clínico.⁸

La sordera no sindrómica no está asociada a otras manifestaciones clínicas, representa 70% de las hipoacusias hereditarias, e involucra más de 100 genes diferentes.³

La hipoacusia neurosensorial no sindrómica (HNNS) puede presentar un patrón de herencia autosómica recesiva (~80%), autosómica dominante (~15-20%), ligada al X (~1%) y mitocondrial ($\geq 1\%$).⁴

La HNNS es usualmente, prelingual, severa a profunda, y permanece relativamente estable.⁹

En la mayoría de las poblaciones, la causa más común (aproximadamente 50% de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva) es por mutaciones en el gen *GJB2* (Gap Junction Beta-2), el cual codifica para la Conexina 26, una proteína de las uniones gap. Se considera que las mutaciones en este gen son la etiología más frecuente de sorderas hereditarias.^{3,9,10} Una mutación específica, 35delG, es responsable de ~50-70% de las mutaciones patológicas del gen de la Cx26.^{11,12,13,14,15}

La nomenclatura internacional utilizada para denominar a los diferentes loci para sordera no sindrómica son designados como DFN (DeaFNess), y se le agrega un sufijo que indica la forma en que el alelo mutante está segregando, DFNA: autosómico dominante, DFNB: autosómico recesivo, DFN: ligado al X, adicionalmente se coloca un número consecutivo, según el orden cronológico de su descripción. El locus del gen *GJB2* es designado como DFNB1.^{6,16,17}

1. Mecanismo de la audición normal

El sistema auditivo consiste del oído externo, el cual incluye el pabellón auricular y el conducto auditivo externo, el oído medio y el oído interno, cóclea o caracol. Las ondas sonoras pasan a través del pabellón auricular y del conducto auditivo externo hacia la membrana timpánica, las vibraciones de ésta son transmitidas a través del oído medio al oído interno por una cadena de tres huesecillos, el martillo, el yunque y el estribo. La

base del estribo está adyacente a la ventana oval de la cóclea, su movimiento trasmite las ondas sonoras al oído interno.⁶

La cóclea (*Figura 1*) es el sitio en donde la energía mecánica de los ondas sonoras es convertida en potenciales de acción del nervio coclear, iniciando así la transmisión de la información auditiva hacia los centros del tronco cerebral y a centros superiores en la corteza cerebral, proceso necesario para la comprensión e interpretación de los sonidos. La cóclea está localizada en la porción petrosa del hueso temporal, tiene forma de espiral o caracol y mide aprox. 35mm, en su longitud está dividida en tres compartimentos: la escala vestibular, la escala media y la escala timpánica. La escala vestibular y la timpánica, están llenas de un líquido, la perilinfa, de composición diferente a la endolinfa. La escala media, contiene endolinfa con altas concentraciones de potasio y bajas concentraciones de sodio; esta discrepancia en la composición electrolítica de los líquidos del oído interno genera una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de las células ciliadas, que juega un papel central en el proceso de transducción de la información que se lleva a cabo en la cóclea.¹⁸

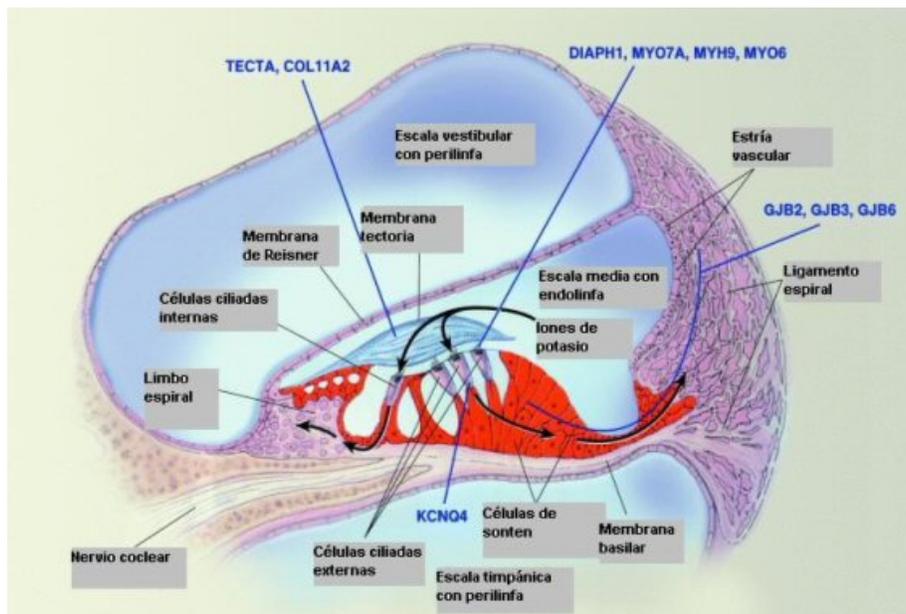


Figura 1. La cóclea.

Los receptores auditivos son las células ciliadas del órgano de Corti, las cuales son de dos tipos: internas y externas. El extremo de los estereocilios de las células ciliadas externas están embebidas en la membrana tectoria, estos cilios tienen un esqueleto de actina y formas no convencionales de miosina que están fijadas a una lámina cuticular rica en actina que a su vez sujeta el estereocilio al citoesqueleto celular. Los estereocilios están anclados unos a otros cerca de su ápice de forma tal que se mueven en conjunto. Las células ciliadas internas son los receptores primarios y reciben la mayoría de las fibras aferentes del nervio coclear; las células ciliadas externas, reciben la mayor parte de la información eferente del mismo nervio, tienen por función promover la discriminación de frecuencia y amplificación de la señal, de forma que modulan el funcionamiento del receptor primario.

Las ondas retransmitidas desde la membrana timpánica hacia la escala vestibular de la cóclea mueven la membrana basilar causando la deflexión de los estereocilios contra la membrana tectoria. La deflexión de los estereocilios conduce a la apertura de canales iónicos que permiten la entrada de potasio al interior de la célula ciliada induciendo su despolarización. La despolarización celular genera la activación de canales de calcio conllevando a la movilización de vesículas sinápticas y posterior liberación del neurotransmisor en el espacio sináptico; de esta forma se inicia la activación del nervio coclear.

Las moléculas de miosina no convencionales juegan un papel importante en el proceso de transducción manteniendo la tensión entre las uniones de los ápices de los estereocilios.^{18,19}

Para mantener el funcionamiento de la célula ciliada, los iones de potasio que entran en su interior deben salir, además debe mantenerse una alta concentración a nivel de la endolinfa. Con el fin de mantener este proceso se lleva a cabo un mecanismo de reciclaje del potasio mediante el cual estos iones salen de la célula ciliada a nivel de su membrana basolateral por un canal de potasio, alcanzando las células de soporte del órgano de Corti. Posteriormente difunden en forma pasiva de célula a célula a través de

uniones gap, compuestas por una proteína multimérica, denominada conexina 26, presente en las células de soporte del órgano de Corti, células del limbo y del ligamento espiral. Una vez que los iones de potasio alcanzan la estría vascular son activamente bombeados hacia la endolinfa por canales de potasio dependientes de voltaje.^{6,18,19,20}

La membrana tectoria es una estructura acelular con una función mecánica en el proceso de transducción de la señal. Esta conformada por una matriz proteica de varios tipos de colágena en más de la mitad de su estructura, predominando la colágena tipo II, y menores cantidades de tipo IX y XI. La proteína no colágeno más abundante es la α tectorina.²¹

El estudio genético de los pacientes con hipoacusia neurosensorial ha ayudado a aclarar y ampliar el conocimiento de la fisiología del oído interno en su porción coclear, incluso se han descrito procesos no sospechados hasta encontrar su alteración.¹⁸

2. Gen *GJB2*

A la fecha han sido mapeados 52 loci asociados con hipoacusia neurosensorial no sindrómica (HNNS) autosómica recesiva, y 23 diferentes genes han sido identificados.²²

El primer locus definido para sordera recesiva (DFNB1) fue identificado por mapeo de homocigosidad en familias consanguíneas de Tunisia en 1994. Un estudio posterior de Maw et al. en 1995 en 19 familias de origen Céltico sugirió una importante contribución de este locus en la población caucásica, mientras que un estudio en familiares consanguíneos de Pakistán reporto únicamente una familia ligada a DFBN1. Otro estudio realizado por Gasparini et al. en 1997 en 48 familias de Italia y España subrayó la importancia de este locus en hipoacusia en la población mediterránea y además ubicó a DFNB1 por análisis de ligamiento en la región entre los marcadores D13S175 y D13S115 separados por aproximadamente 14 cM.²³

Zelante et al. en 1997 en un enfoque independiente de clonación posicional y análisis de genes candidatos del locus DFNB1, observo varias combinaciones las cuales

limitaron la región candidata para este locus a aproximadamente 5 cM entre D13S141 y D13S232. Desde entonces los datos del mapa genómico han ubicado al gen *GJB2* dentro del intervalo definido por los estudios de ligamiento. El gen *GJB2* fue analizado en muestras de sujetos afectados, una mutación, la delección de una G dentro de un tramo de seis Gs en la posición 30 a 35 de *GJB2*, llamada 35delG, fue encontrada en 63% de los cromosomas con ligamiento al cromosoma 13. Otro paciente tuvo una delección de una T en la posición 167 (167delT). Por lo tanto los datos de Zelante confirman que *GJB2* esta en el locus DFNB1 y define la mutación más frecuente en pacientes de origen caucásico.^{23,24}

En el locus DFNB1 se encuentra además el gen *GJB6* que codifica a la conexina 30. Una delección de 342 KB en este gen, es la segunda mutación mas frecuente en conexinas, después de la 30delG en algunas poblaciones.²⁵

El gen *GJB2* es el responsable del 20% al 50% de hipoacusia no sindrómica en niños y de un 40% de las hipoacusias no sindrómicas severas a profundas.²⁶ Esta situado en 13q11-q12, tiene una estructura genómica simple compuesta de dos exones, el exón 1 codifica la región 5' no traducida, y el exón 2 contiene todo el marco de lectura abierto, el cual codifica para una proteína de 226 aminoácidos llamada conexina 26.^{6,27,28}

Se han descrito más de 90 mutaciones para el gen *GJB2*,^{22,29} entre las más frecuentes se encuentran la 35delG, la cual es la más común, particularmente en población Caucásica, con una frecuencia de portadores de 1/31 a 1/35. La 167delT ha sido encontrada comúnmente en Judíos Askenazis con una frecuencia de portadores de 4%, mientras la frecuencia de 35delG en esta población es de 0.7%. La 235delC ha sido detectada en la población China y Japonesa, la frecuencia para esta mutación en la población Japonesa ha sido determinada en 2/203, ningún estudio en esta población identifico la mutación 35delG. La M34T es también frecuente en algunas poblaciones, la frecuencia de portadores en la población Belga es de 2.4%, en población Caucásica se reporta una frecuencia de 3/192.^{23,30,31,32,33} La relativa frecuencia de alguna de estas

mutaciones en una población particular es relevante para el desarrollo de sistemas de análisis específicos.²³

Hasta ahora no existe una relación genotipo-fenotipo de las mutaciones de *GJB2*, debido a que es común la expresividad variable, que a su vez se refleja en variabilidad intrafamiliar e interfamiliar.^{13,34} En general, mutaciones homocigotas en *DFNB1* producen hipoacusia prelingual no progresiva, con compromiso preferente de frecuencias agudas, y de diferentes grados de severidad. El desarrollo psicomotor y la función vestibular son normales, raras excepciones incluyen niños con sobrecrecimiento óseo de la cóclea, vértigo, migraña y debilidad unilateral.³⁵ Los heterocigotos para 35delG generalmente presentan una hipoacusia no sindrómica de menor grado de severidad, sin embargo, también se describen portadores heterocigotos de la mutación 35delG con audición normal.²¹

Mutaciones bialélicas en el gen *GJB2* son causa de HNNS autosómica recesiva en aproximadamente 50% de los casos, sin embargo 10%-50% de individuos tienen solo un alelo mutado, lo cual no se puede explicar solo con el estudio de este gen. El gen *GJB6* mapea adyacente a *GJB2* en el locus *DFNB1*, dos grandes deleciones, una de 309 Kb, del(*GJB6*-D13S1830) y otra de 232 kb, del(*GJB6*-D13S1854) río arriba de *GJB2* son frecuentemente encontradas entre individuos sordos. Esto podría explicarse por deleciones de *GJB6* en trans con mutaciones en el gen *GJB2*. Alternativamente esta deleción podría afectar la expresión de la conexina 26 por deleción de un elemento regulatorio río arriba, de esta forma inactivando al segundo alelo (herencia monogénica), o bien que las conexinas 26 y 30 mutadas actúen separadamente en el desarrollo de la sordera (herencia digénica). La frecuencia de estas deleciones va del 5 al 15% en individuos con solo una mutación detectada en *GJB2*.^{22,36,37,38,39}

3. Conexina 26

Hace poco más de una década, las mutaciones en las conexinas fueron las primeras en ser relacionadas con hipoacusia hereditaria. A pesar de un extenso análisis clínico y funcional de los efectos de las mutaciones en estas proteínas en la función auditiva,

aún no esta totalmente entendido cual es el papel que juegan las uniones gap en el oído interno y como las mutaciones en las conexinas causan sordera.⁴⁰

Las conexinas son una familia de proteínas de membrana que se unen para formar canales intercelulares o uniones gap. Son codificadas por una familia de genes homólogos. En la base de datos del genoma humano se han reportado 20 genes para conexinas. Todas tienen la misma topología en la membrana plasmática, el amino y carboxilo terminal y un asa intracelular, cuatro dominios transmembrana, y dos asas extracelulares (*Figura 2*). A pesar de que la homología entre las conexinas es alta, diferencias importantes entre estas proteínas se han encontrado en el asa intracelular y el dominio carboxilo terminal, donde actúan elementos regulatorios, cinasas, y proteínas de unión al citoesqueleto.^{41,42}

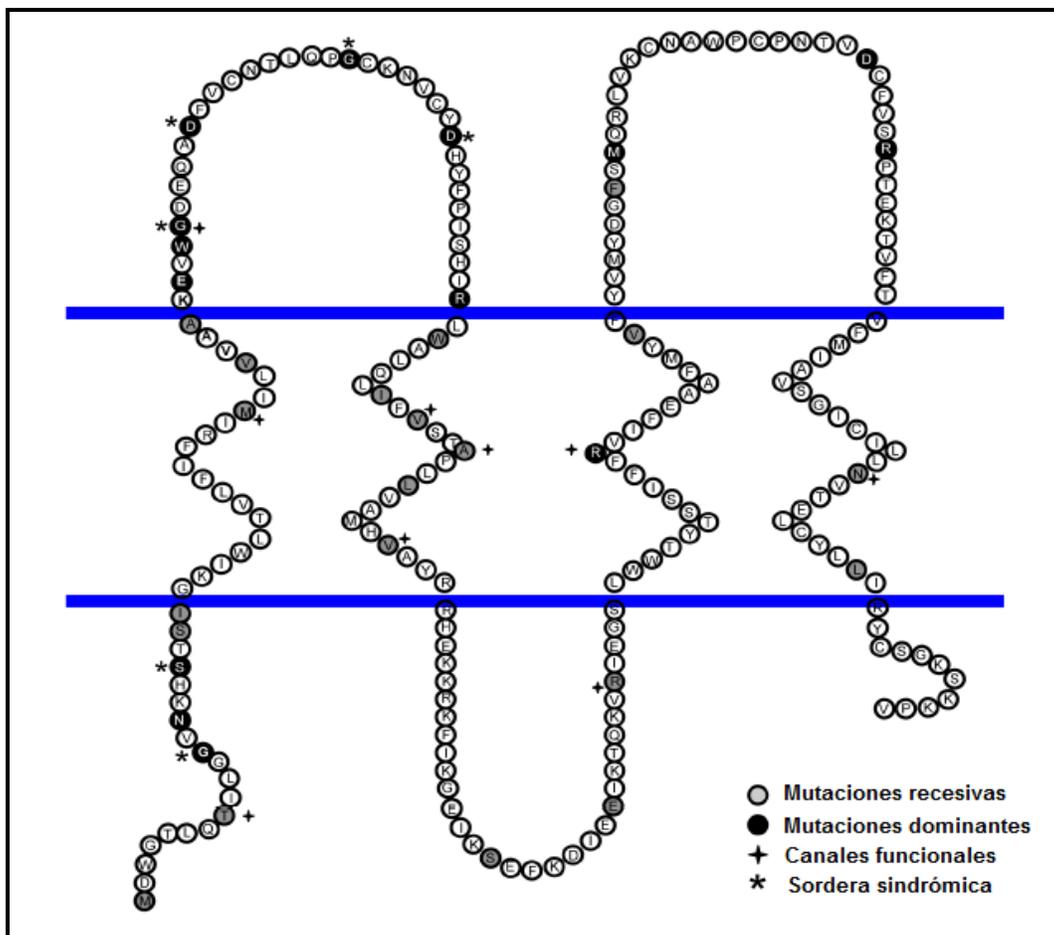


Figura 2. Estructura de la conexina 26 y sus principales sitios de mutación.

Nueve genes para conexinas se han implicado en diversos desordenes hereditarios, tales como cataratas, enfermedad de Charcot Marie Tooth, displasia oculodentodigital y sordera sindrómica y no sindrómica. De todas las enfermedades asociadas a conexinas, la sordera es la más importante en términos de frecuencia. Aunque la sordera es genéticamente heterogénea, mutaciones en el gen que codifica la conexina 26 representan la mayor parte de los casos en las poblaciones evaluadas, otras cuatro conexinas, Cx30, Cx31, Cx32 y C43 también han sido relacionadas con sordera.⁴³

Las conexinas son las subunidades proteicas que constituyen los canales gap junction (CGJ), una de las más importantes vías de comunicación intercelular que media la regulación iónica y metabólica de células adyacentes. Las uniones gap son estructuras de la membrana plasmática formadas por cientos o miles de CGJ. Cada CGJ es constituido por el acoplamiento de dos canales independientes o conexones (*Figura 3*) presentes en las membranas plasmáticas opuestas de las dos células en contacto. Seis subunidades de conexinas oligomerizan en el complejo retículo endoplásmico-aparato de Golgi, para constituir un hemicanal o hemiconexon que es enviado a la membrana plasmática por la vía secretora ayudado probablemente por microtúbulos unidos a vesículas. En los sitios de oposición celular los hemicanales deben unirse con su hemicanal complementario formando un CGJ, que constituye un poro acuoso que conecta el citoplasma de las células adyacentes.⁴⁴

Los canales son permeables a iones y pequeñas moléculas como segundos mensajeros (IP₃, cAMP, cGMP, ATP, etc.) o diversos metabolitos (azúcares, aminoácidos, glutatión, etc.), con un tamaño de aproximadamente 1KDa. Existe evidencia que sugiere que los canales mal acoplados pueden abrirse para permitir la comunicación entre el interior de la célula con el espacio extracelular bajo condiciones fisiológicas y patológicas.⁴⁵

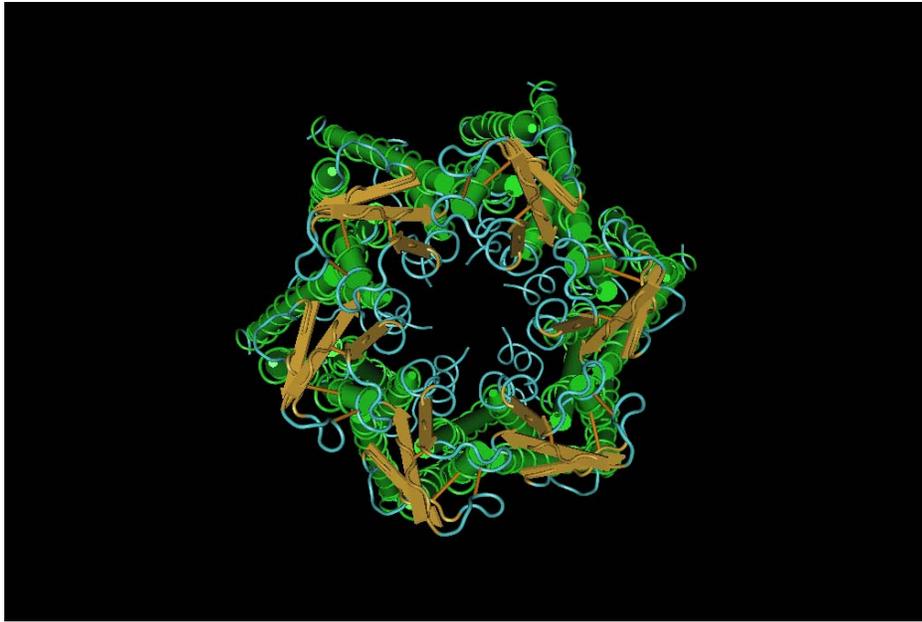


Figura 3. Estructura de un conexon.

La difusión de potasio mediada por uniones gap ha sido considerado un mecanismo esencial para el reciclamiento de K^+ perilinfa-endolinfa generando de esta forma el potencial endococlear. Las alteraciones en la permeabilidad causadas por algunas mutaciones de la Cx26 indican que la circulación de metabolitos tales como IP3 es crítica para la función o supervivencia de las células ciliadas y el flujo de potasio puede no ser la única función de la Cx26.⁴⁶

Por obvias razones la mayoría de la información con respecto a la distribución de las conexas en el oído interno ha sido obtenida de modelos animales, mayormente roedores, suponiendo que debe ser similar en humanos. Las conexas (Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 y Cx43) se expresan en el tejido conectivo y epitelial de la cóclea formando sincitios de uniones en estos tejidos. La Cx26 y la Cx30 co-oligomerizan en el órgano de Corti, formando CGJ heteroméricos, estos canales tienen diferentes propiedades de permeabilidad que sus respectivos canales homoméricos.⁴³

Las mutaciones más frecuentemente encontradas en la conexina 26 asociadas a enfermedad son deleciones en dos regiones de *GJB2*, 35delG y 235delC en

Caucásicos y Asiáticos respectivamente. Estas mutaciones resultan en un corrimiento del marco de lectura y terminación prematura de la proteína. La mutación 35delG es causada por errores en la replicación del ADN, e implica la deleción de una guanina dentro de una secuencia de guaninas en la posición 35, la cual provoca la sustitución de una glicina por una valina en el codón 12 seguido por un paro prematuro en el codón 13.^{25,47,48}

Las mutaciones de la Cx26 pueden ser clasificadas, en términos de la formación y función de CGJ en cuatro tipos:

- 1) Mutaciones que afectan el flujo de los hemicanales hacia la membrana plasmática o el acoplamiento de los CGJ.
- 2) Mutaciones que producen uniones gap, pero los canales no son funcionales.
- 3) Mutaciones que producen CGJ funcionales que presentan alteraciones en la permeabilidad.
- 4) Mutaciones que producen hemicanales funcionales en la membrana plasmática, que se pueden abrir bajo condiciones fisiológicas, afectando el balance iónico o la homeostasis de metabolitos vitales que disminuyen la viabilidad celular.

Otras mutaciones menos comunes de Cx26 asociadas con sordera han sido bien caracterizadas, la mayoría son de pérdida de función resultado de una falla en el desplazamiento de los hemicanales hacia la membrana plasmática, o en la formación de canales normales.⁴³ La mayoría de las mutaciones funcionales están localizadas en los dominios transmembrana, especialmente agrupados en el segundo dominio, que también está implicado en el recubrimiento del poro. Las mutaciones no funcionales están localizadas en cualquier parte de la proteína, sugiriendo que la estructura de los CGJ de Cx26 son muy sensibles a cambios mínimos en la secuencia de aminoácidos, independientemente del dominio de la proteína donde se ubiquen (*Figura 2*).⁴⁰

Las mutaciones en el gen de la Cx26 resultan en una función alterada de las uniones gap, un disturbio en la homeostasis del potasio, y alteraciones en el transporte de otras moléculas como segundos mensajeros, provocando hipoacusia.⁴

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta frecuencia y gran impacto clínico de individuos con pérdida congénita de la audición, la detección temprana ha sido recomendada por el National Institutes of Health y el Joint Committee on Infant hearing Screening, basándose en que el diagnóstico y la intervención temprana influye significativa y positivamente la capacidad de un niño en su comunicación y por lo tanto en el aprendizaje.

No existen informes publicados sobre la genética de la sordera en México, por lo que no se cuenta con una estadística que indique si en la población mestiza de nuestro país se encuentran las mismas o diferentes mutaciones que en la población anglosajona europea o americana en la hipoacusia neurosensorial no sindrómica en el gen *GJB2*.

El conocimiento de la etiología de la hipoacusia neurosensorial no sindrómica es de gran valor en el asesoramiento genético a los padres en los casos familiares y en aquellos casos esporádicos con este tipo de sordera y con historia familiar negativa. Además el hallazgo de que una mutación en el gen de Cx26 sea responsable de un caso particular disminuye la extensión de pruebas de diagnóstico, resultando en reducción de costos médicos.

Ante este panorama es indudable que se hace necesario realizar estudios tendientes a aclarar la situación de nuestro país con respecto a las causas de sordera congénita de origen genético.

IV. OBJETIVO

Realizar el análisis del gen GJB2 en pacientes mexicanos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica, tanto en casos familiares como esporádicos, y determinar el tipo y la frecuencia de las mutaciones.

V. HIPÓTESIS

Las mutaciones en el gen GJB2 en la población mestiza mexicana probablemente no sean las mismas que las reportadas en la población Anglosajona europea o americana.

VI. DISEÑO DEL ESTUDIO

1. Tipo de investigación:

Se trata de un estudio prospectivo, descriptivo y transversal.

2. Universo:

Se convoco al estudio a casos familiares y esporádicos identificados clínicamente con sordera neurosensorial no sindrómica prelingual, de nuestro hospital, así como de otras instituciones.

3. Criterios de Selección:

a) Inclusión:

1.- Familias con dos o más hijos con sordera neurosensorial no sindrómica prelingual.

2.- Casos aislados de sordera neurosensorial no sindrómica prelingual.

b) Exclusión:

1.- Pacientes en los que se tuvo sospecha que la sordera era de causa no hereditaria.

2.- Pacientes con sordera asociada a algún síndrome específico.

c) Eliminación

1.- Familias en las que no se completaron los estudios genético y/o audiológicos.

4. Variables del estudio:

a) Dependiente:

Tipo de mutación encontrada

b) Independiente:

Pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Poblaciones incluidas en el estudio:

Miembros de 16 familias mestizas Mexicanas con casos familiares y aislados de sordera no sindrómica prelingual:

- a) Sintomáticos.
- b) Asintomáticos.

Previo consentimiento informado (anexo 1) sobre su participación en este protocolo, cada familia y/o caso fue sometido a los siguientes estudios:

Evaluación audiológica de los afectados:

- a) Audiometría tonal
- b) Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral
- c) Emisiones otoacústicas

Evaluación genética:

- a) Historia clínica
- b) Árbol genealógico
- c) Toma de muestra de 10 ml de sangre periférica a los afectados, y en quienes fue posible a sus padres, para la obtención de DNA y el análisis de las mutaciones, mediante la técnica de PCR y secuenciación directa.

A todas las familias se les entrego copias de sus resultados de todos los estudios, se proporcionó asesoramiento genético y se les oriento sobre la mejor opción terapéutica audiológica y de desarrollo del lenguaje para los afectados.

2. Estudio molecular

Extracción de sangre periférica.

Se extraen de forma aséptica 10 ml de sangre periférica que se colocan en un tubo de ensayo con EDTA como anticoagulante. Se identifica el tubo con el nombre completo del paciente y el diagnóstico.

Extracción de DNA.

Se utilizó el método salino para la extracción de DNA.

- Se transfieren de 3 a 4 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y se agrega amortiguador TTS (tris 10mM con pH 7.6, tritón al 1% y sacarosa 300 mM) en relación 2:1. Se agita suavemente.
- Se centrifuga a 3,000 rpm por 6 minutos, después se decanta el sobrenadante para obtener el botón conformado por leucocitos.
- Agregamos al tubo 1 ml de amortiguador TTS y agitamos una vez para resuspender el botón, y se pasa a un microtubo eppendorf de 1.5 ml. Se agita hasta homogeneizar.
- Centrifugamos a 10,000 rpm por 4 minutos en microcentrífuga, posteriormente decantamos el sobrenadante.
- Una vez obtenido el botón, le agregamos 570 μ l de NaCl al 5mM. Agitamos 3 minutos, después colocamos 30 μ l de SDS (duodecil sulfato de sodio) al 10% y agitamos por 5 minutos. Finalmente agregamos 200 μ l de NaCl sobresaturado y agitamos por 10 minutos más. Dado que nuestro objetivo es romper la membrana celular y precipitar el exceso de proteínas, es importante la fuerza mecánica, por lo que es recomendable agitar vigorosamente.
- Centrifugamos el contenido del tubo eppendorf a 11,000 rpm por 30 minutos a 4 °C.

- Preparamos un tubo de ensayo con 4 ml de etanol al 100%. Después del centrifugado vaciamos el contenido del tubo eppendorf al tubo de ensayo, posteriormente podremos observar el DNA precipitado.

- Tomamos el DNA de los tubos con una pipeta Pasteur cuya punta sellamos con calor, y lo sumergimos brevemente en otro tubo de ensayo con etanol al 70% para retirar el exceso de proteínas.

- Dejamos la pipeta con el DNA secar cerca del mechero, y posteriormente lo resuspendemos en un tubo eppendorf de 500 μ l con 150 a 300 μ l de agua estéril.

Verificación de la calidad del DNA.

La cuantificamos de acuerdo a la cantidad aproximada de nanogramos de DNA por cada μ l de agua en el tubo. Es necesario saber que tanta calidad tiene el DNA utilizado, porque de ésta depende la cantidad que colocaremos en cada PCR.

- Colocamos los tubos eppendorf con el DNA en un termoblock a 50°C por aproximadamente dos horas. Esto para asegurar la homogeneidad de la mezcla y la desnaturalización del DNA.

- Preparamos un gel de agarosa al 0.8% con tantos pocillos como muestras de DNA tengamos.

- Mezclamos 3 μ l de DNA más 1 μ l de buffer de carga y lo colocamos en uno de los pocillos del gel. Lo dejamos correr en la cámara de electroforesis a 70 volts.

- Colocamos el gel en el transluminador ultravioleta para cuantificar de forma aproximada la calidad del DNA.

Diseño de los oligonucleótidos

Para que la región codificante (exón) sea secuenciada en su totalidad, los oligonucleótidos deben ser tomados desde la región no codificante (intrón). Típicamente un oligonucleótido mide de 15 a 25 pares de bases, entre más largo, más especificidad y homología con el gen deseado tiene. A más pares de bases, más temperatura de alineación se necesita, y la taq polimerasa podría no funcionar correctamente. Es por

esto que nosotros decidimos diseñar los oligonucleótidos con 17 a 20 pares de bases. Dividimos el gen en dos partes (a y b), y para cada una diseñamos un par de oligonucleótidos (*tabla 1*).

- Tomamos una parte de la secuencia del intrón de GJB2 al azar, de aproximadamente 20 pares de bases. De ser posible, la región elegida debe contener la misma cantidad de AT que de GC.

- Usamos la base de datos NCBI, cuyo encabezado “blast” nos permite escanear el genoma. De esta forma, la base de datos nos indica qué tan homóloga es la secuencia que elegimos con alguna otra secuencia del genoma.

- Se eligieron las secuencias que tenían casi nula homología con otra región que no perteneciera a GJB2.

- Los oligonucleótidos llegan leofilizados y se hidratan con agua inyectable estéril. Se llevan a una concentración de 100mM con base a la concentración de nanomoles que marca la etiqueta del proveedor.

Tabla 1. Primers de cada región de GJB2

Región Primers	
a	Forward 1 → 5'TCTTTTCCAGAGCAAACCGC3' Reverse 1 → 5'CTTTGTGTCCCGGCCCA3'
b	Forward 2 → 5'CGAAGCCGCCTTCATGTACG3' Reverse 2 → 5' CCACTGAGACCCCAGGCTGT3'

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cada una es realizada con un control y un blanco, con un volumen final 30 µl. A cada tubo se le agregan de 1 a 4 µl de DNA. La tabla 2 es un ejemplo de una PCR de 30 µl. Las muestras 1 y 2 son pacientes, la muestra 3 es un control sano, y la 4 es un tubo que no contiene DNA, esto para asegurarnos que la reacción no esté contaminada y reducir el riesgo de obtener falsos positivos.

Tabla 2. Ejemplo de una PCR de 30 μ l.

Muestra	H2O Buffer		dNTPs	DMSO	F1 R1		Taq
1) D25	16.61	3	3	3	0.1	0.1	0.1 5
2) D27	16.61	3	3	3	0.1	0.1	0.1 5
3) Control	16.61	3	3	3	0.1	0.1	0.1 5
4) Blanco	16.61	3	3	3	0.1	0.1	0.1 5

La PCR se introduce en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

30 ciclos

Temperatura inicial: 94 °C por 5 minutos

Desnaturalización: 94 °C por 1 minuto

Alineación: 60°C (región a) y 65°C (región b) por 1:15 minutos

Polimerización: 72 °C por 3 minutos

Extensión: 72°C por 2 minutos.

Obtuvimos la temperatura correcta de alineación para cada región mediante la siguiente fórmula (*tabla 3*):

$$T_m: 4^{\circ}\text{C} (\text{G+C}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{A+T})$$

$$T_m = \pm 5^{\circ}\text{C}$$

Tabla 3. Fórmulas para la temperatura de alineación

Región	Primer	Fórmula	Temperatura final
a	<i>Forward 1</i>	$4^{\circ}\text{C} (3+7) + 2^{\circ}\text{C} (5+5) = 40+10 = 60^{\circ}\text{C}$	60°C
	<i>Reverse 1</i>	$4^{\circ}\text{C} (4+7) + 2^{\circ}\text{C} (1+5) = 44+12 = 56^{\circ}\text{C}$	
b	<i>Forward 2</i>	$4^{\circ}\text{C} (5+7) + 2^{\circ}\text{C} (4+4) = 48+16 = 64^{\circ}\text{C}$	65°C
	<i>Reverse 2</i>	$4^{\circ}\text{C} (5+8) + 2^{\circ}\text{C} (4+3) = 52+14 = 66^{\circ}\text{C}$	

Dado que el resultado que nos provee la formula nos permite variar cinco grados la temperatura, simplemente tomamos el promedio para cada región.

Técnica de electroforesis.

Es la migración del DNA a través de un gel al aplicarse un campo eléctrico, en base a su carga y peso. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite analizar los productos de PCR por visualización de la banda deseada. Para cada producto de PCR del gen GJB2 se prepara un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio.

- En un matraz de erlenmeyer colocamos agarosa con TAE 1x (tris, ácido acético glacial y EDTA), se calienta la muestra para disolverla. Dejamos enfriar la solución y le agregamos bromuro de etidio en una cantidad equivalente a la cantidad de gel preparada.
- Vaciamos la mezcla en un portagel y colocamos un peine con el número de pocillos requeridos. Esperamos a que solidifique.
- Colocamos el gel en la cámara de electroforesis y vaciamos en ella suficiente TAE 1x como para cubrir totalmente el espesor del gel.
- A cada tubo de PCR obtenido le agregamos 2 µl de buffer de carga y mezclamos. Con una pipeta colocamos esta muestra en un pocillo. En el primer pocillo colocamos una escalera de 100pb como referencia.
- Conectamos los electrodos y dejamos correr el gel a 70 volts por aproximadamente 20 minutos.
- Después observamos en el transluminador de luz ultravioleta, donde todos los amplicones deben tener el peso requerido: 588pb para la región a y 512 para la b.

Purificación de muestras

Los fragmentos de PCR del gen GJB2 deben ser purificados antes de su secuenciación para remover dNTPs, oligonucleótidos, enzimas, DNA, etc.

Utilizamos resina y buffers Qiaex II.

- Una vez visualizada en el transluminador, cortamos la banda del gel y la colocamos en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Le agregamos de 3.5 a 4.5 μ l de resina Qiaex II, más 570 μ l de buffer Qx1.

- Dejamos incubar el tubo por 10 minutos a 50 °C. Lo centrifugamos a 10,000 rpm por 3 minutos.

- Decantamos y colocamos 570 μ l del mismo buffer, se homogeniza la muestra. Lo centrifugamos en las mismas condiciones. Decantamos con pipeta para quitar cualquier resto de buffer.

- Agregamos 570 μ l de buffer PE y disolvemos el botón. Centrifugamos en las mismas condiciones. Decantamos y repetimos el paso, retirando el buffer con pipeta.

- Colocamos el tubo con la tapa abierta en el termoblock a 50 °C por aproximadamente 15 minutos, para secar la muestra. Le agregamos de 15 a 20 μ l de agua inyectable dependiendo del tamaño del botón obtenido. Este tubo se dejará en reposo a temperatura ambiente por 24 horas.

- Centrifugamos el tubo a 10,000 rpm durante 3 minutos y retiramos el sobrenadante, sin tocar el botón. La colocamos en un tubo para PCR.

Reacción con BigDye terminator.

Revisamos la muestra (templado) en un gel de agarosa para verificar su calidad. Si se considera que es suficiente, se mete en una reacción con BigDye de la siguiente manera:

REACTIVO	CANTIDAD
Mezcla de reacción BigDye	3 μl
Templado	3.5 a 5 μl
Oligonucleótido (10 mm)	1 μl

La mezcla de BigDye contiene los siguientes reactivos:

- ddATP, ddTTP, ddGTP, y ddCTP marcados por fluorescencia.

- Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- Tris-HCL (pH 9.0)
- MgCl₂
- Mutante de una taq polimerasa

El BigDye se introduce en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

28 ciclos

Temperatura inicial: 94 °C por 5 minutos

- Segmento 1, desnaturalización: 94°C por 1 minuto
- Segmento 2, alineamiento: 55°C por 50 segundos
- Segmento 3, polimerización: 60°C por 3 minutos

Extensión: 60°C por 5 minutos.

Agregamos agua inyectable a la reacción final para aforarla a 20 µl.

Purificación

De esta manera eliminamos los dNTPs presentes en exceso, para permitir una secuencia más limpia y evitar errores en la interpretación de resultados.

- A las columnas Centri Sep con cephadex (0.06 gr) les agregamos 800µl de agua inyectable. Las homogeneizamos con vórtex, y las dejamos reposar por una hora.
- Retiramos el sobrenadante y centrifugamos las columnas durante 3 minutos a 3,000 rpm.
- Con pipeta introducimos la reacción de BigDye en la columna, centrifugamos de nuevo por 3 minutos a 3,000 rpm, colocando debajo de la columna un tubo de secuenciación. Esto con la finalidad de que el exceso de ddNTPs se eliminen en la columna de cephadex, mediante una cromatografía en columna a pequeña escala. De esta manera se deposita ya purificada en el tubo de secuenciación.
- Secamos la muestra colocando los tubos de secuenciación en un concentrador de vacío.

- Posteriormente se sometió a secuenciación automatizada utilizando un secuenciador AB 310.
- Se imprimieron los electroferogramas para ser analizados.

VIII. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Todos los procedimientos están de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Título segundo, capítulo 1, artículo 14, fracciones I-VIII).

Esta investigación se considera como de riesgo mínimo.

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico no es necesario para este tipo de estudio.

X. RESULTADOS

Se analizaron 16 familias, de las cuales 9 corresponden a casos familiares, y 7 a casos esporádicos (*Tabla 4*). En 39 pacientes analizados, la secuenciación de la región codificante del gen *GJB2* reveló cinco diferentes mutaciones (*Figuras 4, 5, 6, 7, 8*).

Del total de individuos que presentaron mutaciones en *GJB2* (86.95%), 6 fueron homocigotos (18.18%), 14 heterocigotos afectados (42.42%), y 13 portadores heterocigotos asintomáticos (39.4%) (*Tablas 5 y 6*). Seis individuos no presentaron mutación en este gen (*Tabla 7*).

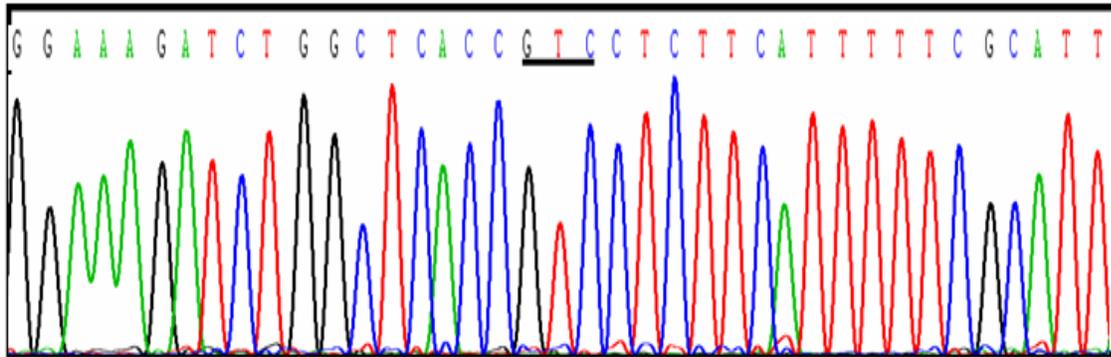
Tanto en pacientes afectados como en portadores, la mutación V27I fue la más frecuente constituyendo 53.84% de alelos mutados. La mutación 35delG fue responsable de 33.33% de alelos mutados, le siguió V63A con 7.7% y finalmente R143W y E47X con 2.56% cada una (*Tabla 8*).

Se encontró una mutación homocigota no reportada en estudios previos, la V63A, en un caso esporádico con ambos alelos mutados.

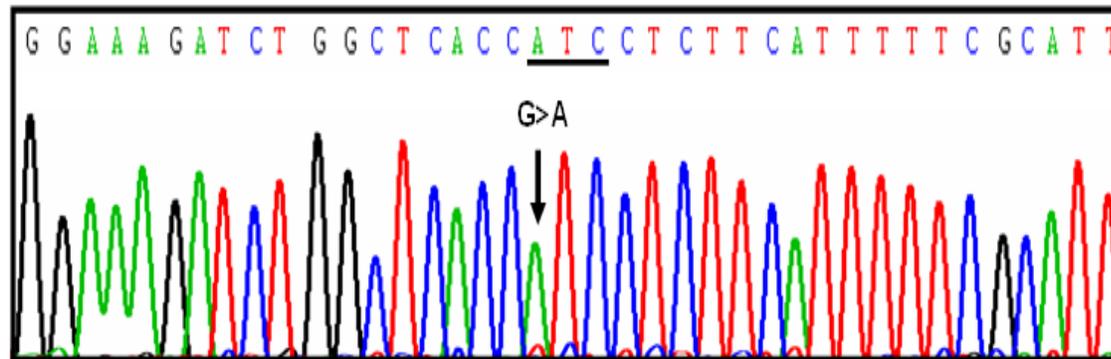
Tabla 4. Mutaciones en las familias analizadas

Casos familiares	Mutación	Casos esporádicos	Mutación
Familia 1	V27I	Familia 10	V27I
Familia 2	V27I	Familia 11	V27I
Familia 3	35delG, E47X	Familia 12	V63A
Familia 4	V27I	Familia 13	R143W
Familia 5	35delG	Familia 14	V27I
Familia 6	Sin mutación	Familia 15	35delG
Familia 7	V27I	Familia 16	35delG
Familia 8	V27I		
Familia 9	V27I, 1 afectado sin mutación		

A



B



C

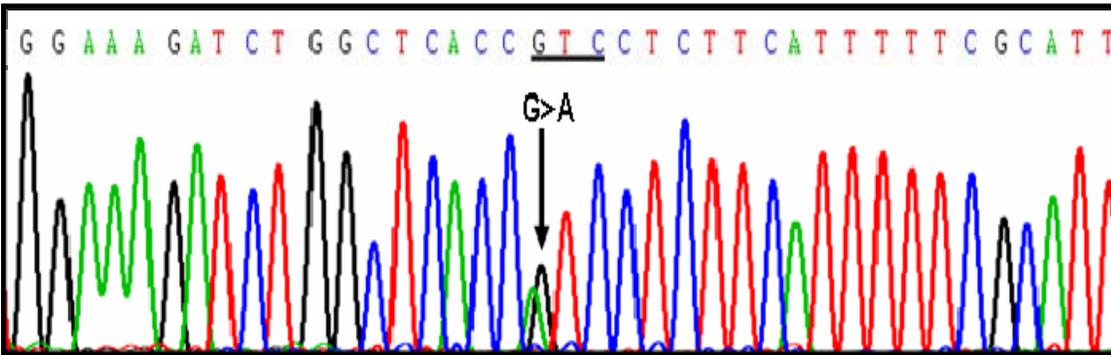


Figura 4. Mutación V27I. A) Control con secuencia GTC en el a.a. 27. Pacientes con un cambio homocigoto (B) y heterocigoto (C) de G por A en el nucleótido 79, ocasionando el cambio de valina por isoleucina.

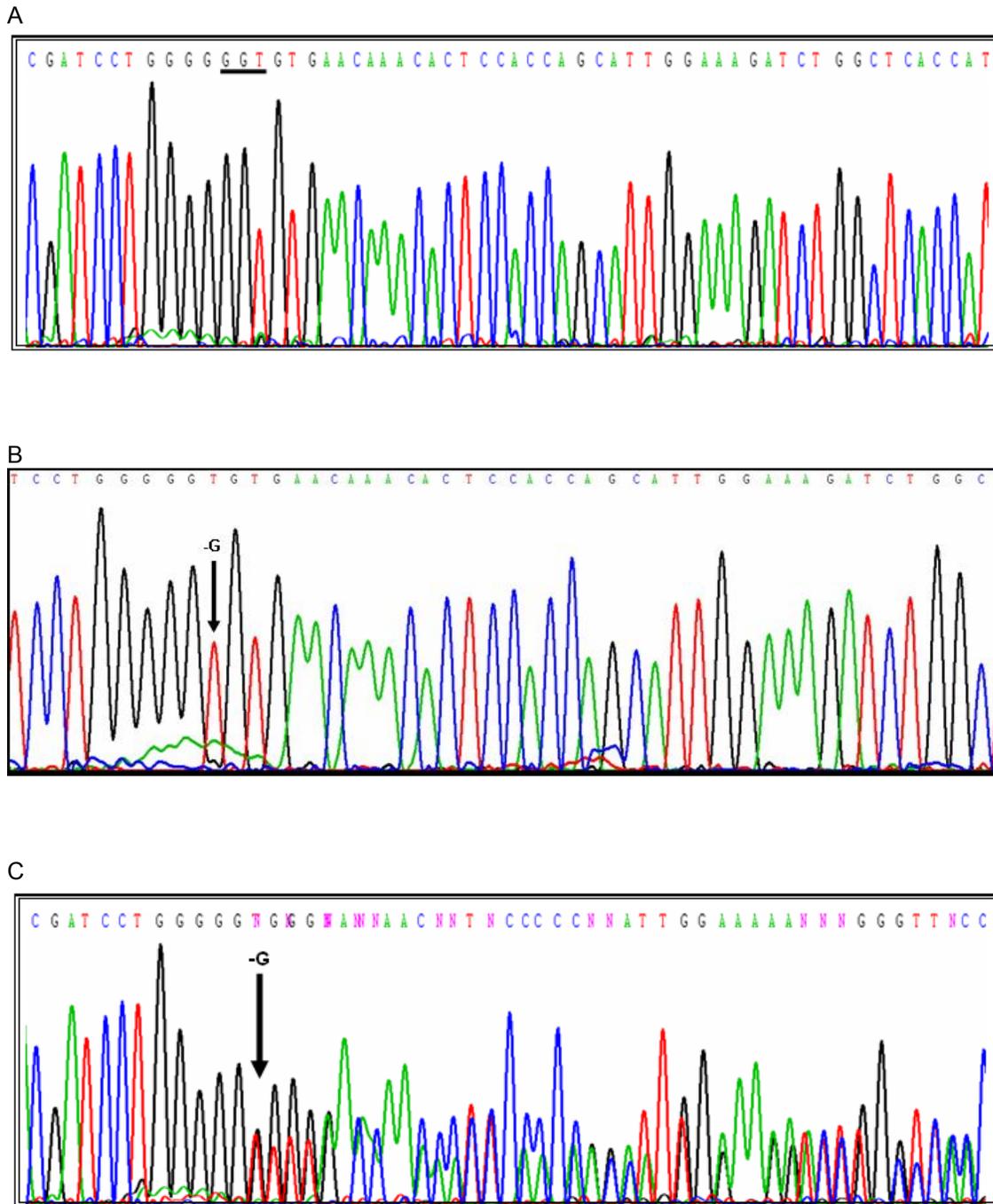
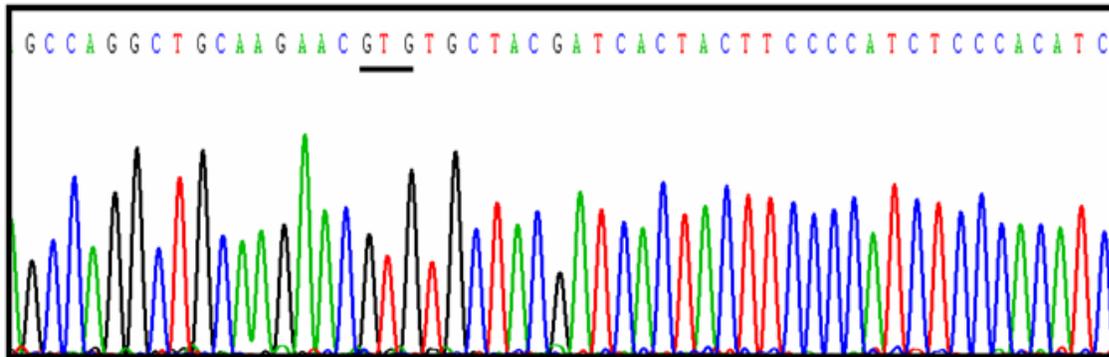
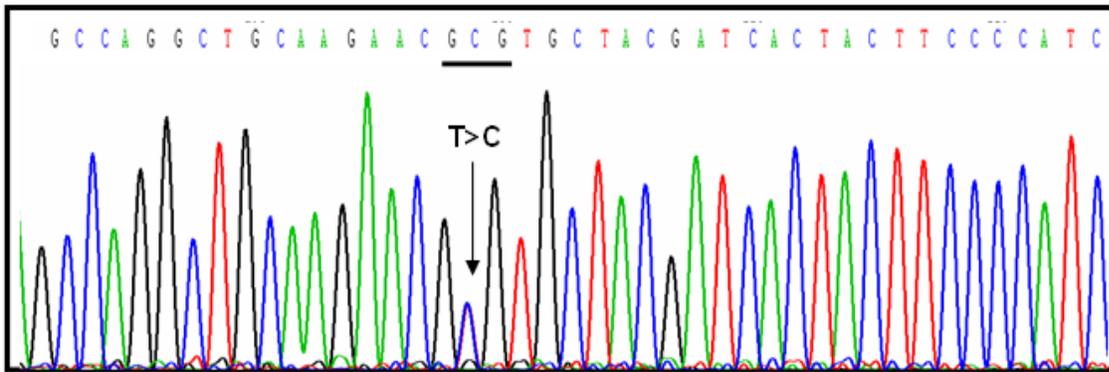


Figura 5. Mutación 35delG. A) Control con secuencia GGT en el a.a 12. Pacientes con deleción de una G en el nucleótido 35 homocigoto (B) y heterocigoto (C), lo cual provoca un corrimiento en el marco de lectura, y un codón de paro en el a.a. 13.

A



B



C

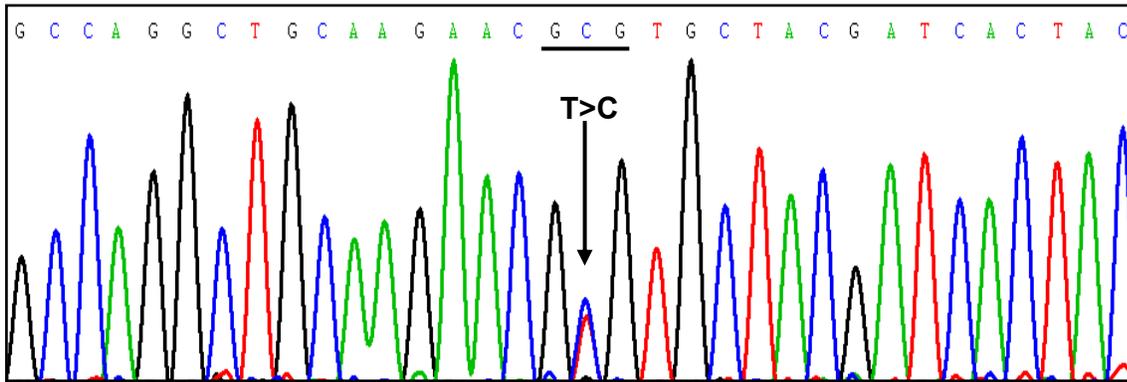


Figura 6. Mutación V63A. A) Control con secuencia GTG en el a.a. 63. Pacientes con cambio de T por C en el nucleótido 188 homocigoto (B) y heterocigoto (C), que da lugar al cambio de una valina por una alanina.

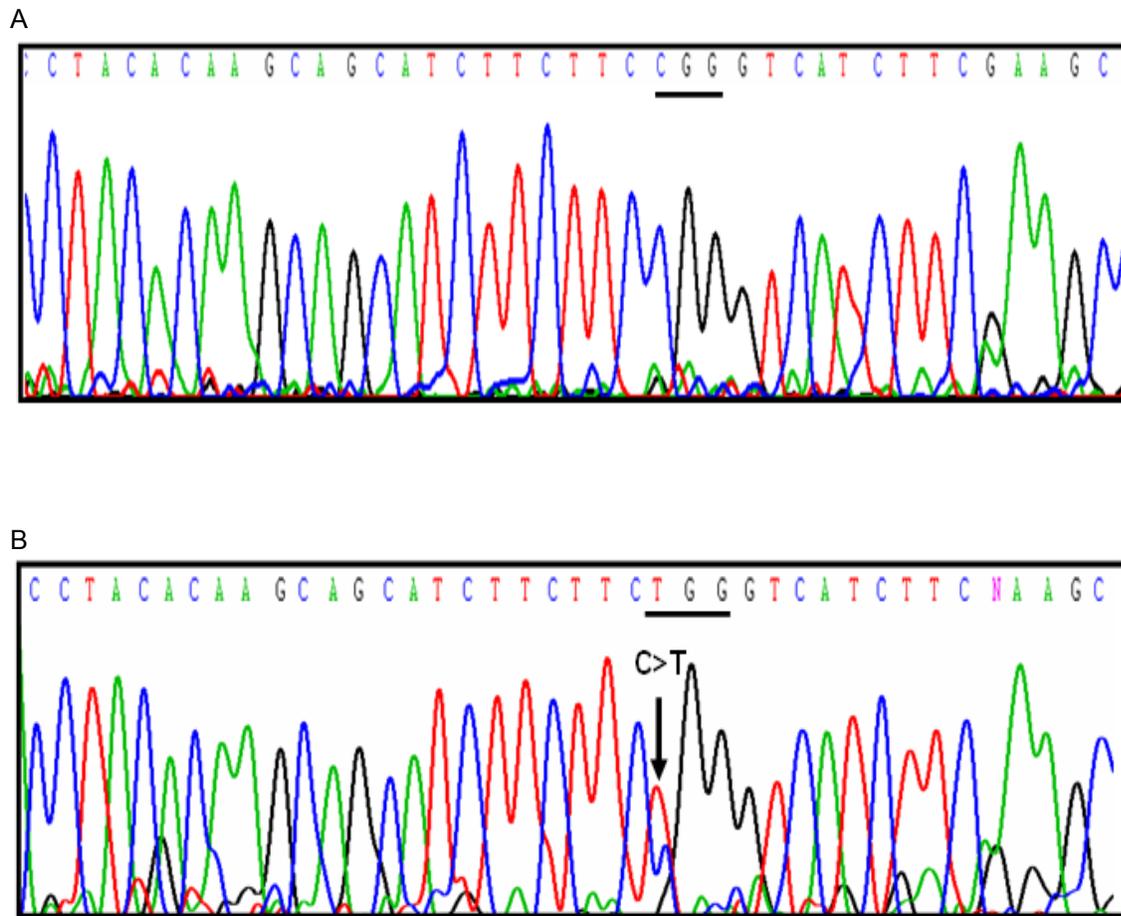
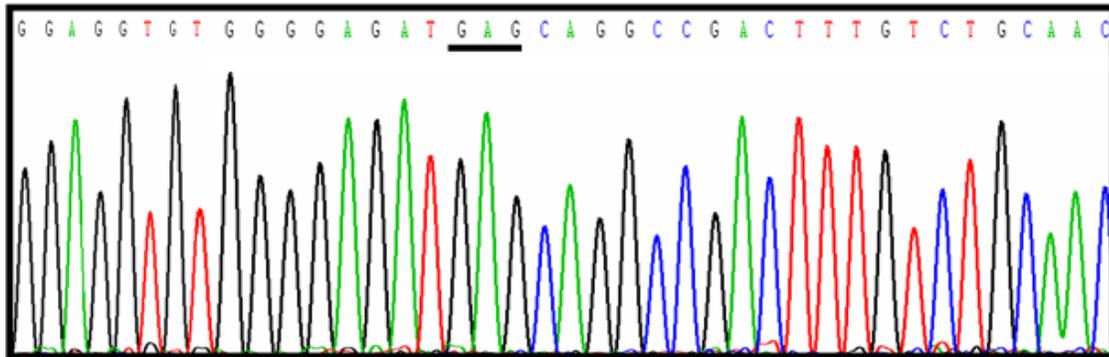


Figura 7. Mutación R43W. A) Control con secuencia CGG en el a.a. 43, B) Paciente con un cambio heterocigoto de C por T en el nucleótido 427, que condiciona el cambio de arginina por triptófano.

A



B

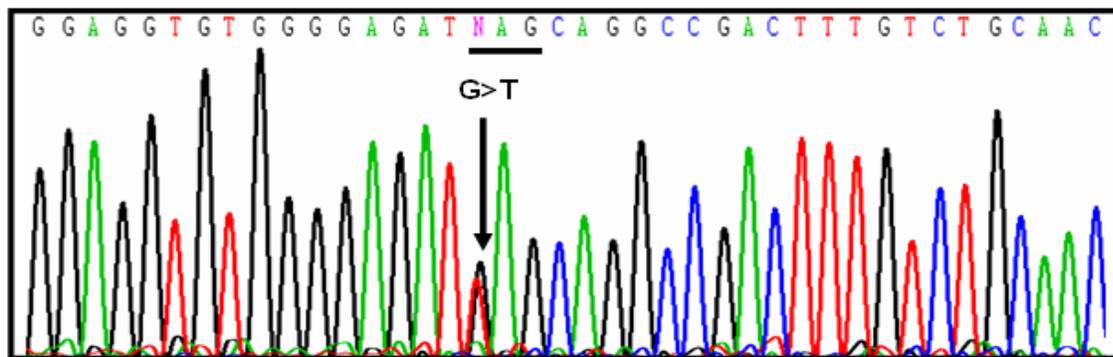


Figura 8. Mutación E47X. A) Control con secuencia GAG en el a.a. 47, B) Paciente con un cambio heterocigoto de una G por una T en el nucleótido 139, que provoca el cambio de un ácido Glutámico por un codón de paro.

Tabla 5. Pacientes homocigotos

Alelo 1			Alelo 2			
Cambio en el nucleótido	Consecuencia	Categoría	Cambio en el nucleótido	Consecuencia	Categoría	No. de pacientes
35delG	corrimiento en marco de lectura	patogénico	35delG	corrimiento en marco de lectura	patogénico	1
79G>A	V27I	patogénico	79G>A	V27I	patogénico	4
188T>C *	V63A	patogénico	188T>C	V63A	patogénico	1

*No reportada

Tabla 6. Pacientes heterocigotos

Cambio en el nucleótido	Consecuencia	Categoría	Número de pacientes
35delG	Corrimiento en marco de lectura	patogénico	5
35delG	Corrimiento en marco de lectura	portador	6
79G>A	V27I	patogénico	8
79G>A	V27I	portador	5
139G>T	E47X	portador	1
188T>C	V63A	portador	1
427C>T	R143W	patogénico	1

Tabla 7. Porcentaje de pacientes afectados y no afectados.

Pacientes	No. (%)
Afectados con mutación en GJB2	20 (51.28)
No afectados con mutación en GJB2	13 (33.33)
Afectados sin mutación en GJB2	3 (7.7)
No afectado sin mutación en GJB2	3 (7.7)

Tabla 8. Frecuencia de mutaciones

Mutación	No. de Alelos (%)
35delG	13 (33.33)
V27I	21 (53.84)
E47X	1 (2.56)
V63A	3 (7.7)
R143W	1 (2.56)

XI. DISCUSIÓN

Recientemente el gen *GJB2* ha sido reportado como la principal causa de sordera neurosensorial no sindrómica autosómica recesiva. Reportes previos muestran que las mutaciones en este gen varían de acuerdo a la población estudiada. La mutación 35delG homocigota es comúnmente encontrada en Italia, España, Portugal, Francia, Inglaterra, Israel, Líbano, Túnez, Algeria, Nueva Zelanda, y familias de origen caucásico del norte y sur de Europa, con una prevalencia que va de 50 a 70%. Se ha reportado que en las poblaciones no caucásicas esta mutación tiene una baja frecuencia.³¹

En nuestro estudio, encontramos que la mutación 35delG fue de 33.33%, un porcentaje significativo, si bien no tanto como el reportado en otros estudios de poblaciones caucásicas.¹¹ De los 12 individuos con esta mutación, 11 son de forma heterocigota, y 1 en forma homocigota.

La mutación V27I ha sido reportada con anterioridad en homocigotos y heterocigotos, con una incidencia baja en caucásicos.⁸ En Japoneses y Coreanos la frecuencia reportada en el tamiz auditivo neonatal es alta, sin embargo no se correlaciona con sordera.²⁹ En nuestra población la mutación V27I fue la más frecuente (53.84%), encontrándose en 5 casos familiares y 3 esporádicos, 17 individuos en total, 13 heterocigotos y 4 homocigotos.

Es necesario hacer énfasis en la mutación V63A, que no ha sido reportada en otros estudios de acuerdo a la base de datos de la Connexin Deafness Home Page, la cual encontramos de manera homocigota en un caso aislado.

Se presentó la mutación homocigota R143W ya reportada, en un caso aislado heterocigoto.⁵⁰

Además de estos arreglos moleculares la mutación E47X descrita por primera vez por Denoyelle et al en 1997,¹¹ fue hallada de forma heterocigota en el padre no afectado de la familia 3. Esta familia continuara en estudio, al igual que la familia 9, ya que los resultados no han sido concluyentes.

En un estudio multicéntrico que incluía a 1531 pacientes de 16 países (90% de los pacientes eran caucásicos) se reportaron 83 diferentes mutaciones.⁸ En la *tabla 9* comparamos la prevalencia de éstas mutaciones con las encontradas en nuestro estudio.

Tabla 9. Comparación de un estudio r realizado en población caucásica con nuestro estudio

Mutación	Estudio multicéntrico (%)	Nuestro estudio (%)
V27I	0.33	53.84
35delG	72.44	33.33
V63A	No reportada	7.7
R143W	0.42	2.56
E47X	1.4	2.56

Se han descrito mutaciones en *GJB2* que causan HNNS con patrón de herencia autosómica dominante.⁵¹ Ninguna de éstas estuvo presente en éste estudio.

Mutaciones heterocigotas en *GJB2* han sido reportadas en 10 a 50% de individuos con HNNS autosómica recesiva.²² En nuestro estudio encontramos un porcentaje similar de heterocigotos afectados (40.5%).

Estudios recientes demuestran que si se detecta solo una mutación en *GJB2*, es probable que se trate de un doble heterocigoto con una mutación en *GJB6*. El estudio de una muestra de población española reporto que el 67% de individuos afectados

presentaron una mutación heterocigota en *GJB2*, y otra en *GJB6*.⁵² Por lo que es posible, que los individuos afectados heterocigotos en nuestro estudio, sean dobles heterocigotos, con una mutación en el gen *GJB6*. En estas familias heterocigotas ya se inicio el análisis de este gen.

El análisis molecular en las familias estudiadas muestra la complejidad génica en la patogénesis de las sorderas. Pocas entidades se consideran bialélicas como parece ser el caso de la HNNS, sin embargo la enfermedad puede manifestarse en un estado homocigoto únicamente, lo que indicaría que el mecanismo puede ser tanto bialélico como de homocigocidad, lo que no parece ser un ejemplo clásico molecular de las entidades genéticas.

XII. CONCLUSIONES

En nuestra población se encontró la mutación 35delG en un porcentaje significativo, sin embargo, la mutación V27I, reportada como poco frecuente en la literatura fue prevalente en casi la mitad de alelos mutados en nuestra muestra.

Ya que un gran porcentaje de nuestros pacientes presentaron mutaciones heterocigotas para *GJB2*, consideramos necesario realizar el análisis molecular del segundo gen más frecuentemente involucrado con HNNS, el *GJB6*, ya que podrían ser dobles heterocigotos. Es por esto que nos proponemos continuar el estudio con el análisis molecular de *GJB6* en la muestra de pacientes ya captada.

Con los hallazgos de este estudio podemos decir que es conveniente el análisis molecular del gen *GJB2* en todos los individuos con HNNS, y probablemente incluir también la detección de mutaciones en el gen *GJB6*.

Es importante incluir en el tamiz auditivo neonatal el análisis molecular del gen de la conexina 26, como se realiza actualmente en otras poblaciones, con el fin de tener un diagnóstico temprano de los individuos afectados, y poder realizar una intervención oportuna, así como proporcionar un asesoramiento genético adecuado.

XIII. ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo de estudio

Análisis de las Mutaciones del Gen GJB2 en Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica en una muestra de Población Mexicana

Usted ha sido seleccionado como candidato para participar en este protocolo de estudio y para ello es indispensable contar con su autorización. Por eso, le solicitamos que lea la siguiente información y si está usted de acuerdo con los procedimientos que se le proponen, firme este documento. Su firma será la confirmación de que nos ha dado su consentimiento para incluirlo en todos los estudios que plantea este protocolo. Sin embargo, en cualquier momento usted tiene la libertad de suspender su participación si así lo desea.

El objetivo de este estudio es buscar las diferentes mutaciones en familias mexicanas del gen GJB2 responsable de la sordera. En caso de que en su familia y/o caso se encuentre una mutación en este gen, podremos darle un consejo genético para su futura descendencia. Esto quiere decir que podremos asesorarle sobre las posibilidades de que se repita un caso de sordera en su familia.

Para ello solicitamos que los afectados (sordos) en la familia asistan a los siguientes estudios audiológicos en el servicio de Audiología y Foniatría del Hospital General de México:

1. Audiometría tonal
2. Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral
3. Emisiones otoacústicas

Y que el resto de la familia asista a los siguientes estudios:

1. Audiometría tonal
2. Emisiones otoacústicas

Al Servicio de Genética deberán asistir usted y sus familiares en primer grado, para realizar:

1. Historia clínica
2. Árbol genealógico
3. Toma de muestra de 10 ml de sangre periférica.

Los estudios audiológicos no son invasivos, es decir, no le ocasionan ningún daño ni molestia ni tienen alguna complicación. En cuanto al estudio genético solamente implica la toma de muestra de sangre como se lleva a cabo para cualquier estudio de laboratorio.

Al finalizar su evaluación además del consejo genético se le podrá orientar sobre su mejor opción en cuanto al aspecto audiológico y de desarrollo de lenguaje o código comunicativo.

He leído la información sobre este protocolo de estudio y doy la autorización para que a mi y a mi familia se nos realicen los estudios que aquí se mencionan.

Nombre y firma del responsable de la familia

Nombre y firma de testigos

México DF a ___ de _____ del 20__

Anexo 2

Secuencia del gen *GJB2*

ATTTAATCCTATGACAACTAAGTTGGTTCTGTCTTCACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGTAAGAGT
 TGGTGTGGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGTCTCCCTGTT
 CTGTCCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTCG**TCTTTTCCAGAGCAAACCGC**CCAGAGTA
 GAAG

M	D	W	G	T	L	Q	I	I	L	G	G	V	13
ATG	GAT	TGG	GGC	ACG	CTG	CAG	ACG	ATC	CTG	GGG	GGT	GTG	
N	K	H	S	T	S	I	G	K	I	W	L	T	26
AAC	AAA	CAC	TCC	ACC	AGC	ATT	GGA	AAG	ATC	TGG	CTC	ACC	
V	L	F	I	F	R	I	M	I	L	V	V	A	39
GTC	CTC	TTC	ATT	TTT	CGC	ATT	ATG	ATC	CTC	GTT	GTG	GCT	
A	K	E	V	W	G	D	E	Q	A	D	F	V	52
GCA	AAG	GAG	GTG	TGG	GGA	GAT	GAG	CAG	GCC	GAC	TTT	GTC	
C	N	I	L	Q	P	G	C	K	N	V	C	Y	65
TGC	AAC	ACC	CTG	CAG	CCA	GGC	TGC	AAG	AAC	GTG	TGC	TAC	
D	H	Y	F	P	I	S	H	I	R	L	W	A	78
GAT	CAC	TAC	TTC	CCC	ATC	TCC	CAC	ATC	CGG	CTA	TGG	GCC	
L	Q	L	I	F	V	S	I	P	A	L	L	V	91
CTG	CAG	CTG	ATC	TTC	GTG	TCC	ACG	CCA	GCG	CTC	CTA	GTG	
A	M	H	V	A	Y	R	R	H	E	K	K	R	104
GCC	ATG	CAC	GTG	GCC	TAC	CGG	AGA	CAT	GAG	AAG	AAG	AGG	
K	F	I	K	G	E	I	K	S	I	F	K	D	117
AAG	TTC	ATC	AAG	GGG	GAG	ATA	AAG	AGT	GAA	TTT	AAG	GAC	
I	E	E	I	K	I	Q	K	V	R	I	E	G	130
ATC	GAG	GAG	ATC	AAA	ACC	CAG	AAG	GTC	CGC	ATC	GAA	GGC	
S	L	W	W	T	Y	T	S	S	I	F	F	R	143
TCC	CTG	TGG	TGG	ACC	TAC	ACA	AGC	AGC	ATC	TTC	TTC	CGG	
V	I	F	F	A	A	F	M	Y	V	F	Y	V	156
GTC	ATC	TTC	GAA	GCC	GCC	TTC	ATG	TAC	GTC	TTC	TAT	GTC	
M	Y	D	G	F	S	M	Q	R	L	V	K	C	169
ATG	TAC	GAC	GGC	TTC	TCC	ATG	CAG	CGG	CTG	GTG	AAG	TGC	
N	A	W	P	C	P	N	T	V	D	C	F	V	182
AAC	GCC	TGG	CCT	TGT	CCC	AAC	ACT	GTG	GAC	TGC	TTT	GTG	
S	R	P	T	E	K	T	V	F	T	V	F	M	195
TCC	CGG	CCC	ACG	GAG	AAG	ACT	GTC	TTC	ACA	GTG	TTC	ATG	
I	A	V	S	C	I	C	I	L	L	N	V	T	208
ATT	GCA	GTG	TCT	GGA	ATT	TGC	ATC	CTG	CTG	AAT	GTC	ACT	
E	L	C	Y	L	L	I	R	Y	C	S	G	K	221
GAA	TTG	TGT	TAT	TTG	CTA	ATT	AGA	TAT	TGT	TCT	GGG	AAG	
S	K	K	P	V	* 227								
TCA	AAA	AAG	CCA	GTT	TAA								

CGCATTGCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAG
 CTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTGTA
 AACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCA
 AAACAAAGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTCTTTCACTTAAGTTAGTT**CCACTGAGACCC**
CAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCA

XIV. REFERENCIAS

1. Karen Steel. New interventions in hearing impairment. *BMJ* 2000;320:622-5.
2. Harris KC, Erbe CB, Firszt JB, Flanary VA, Wackym PA. A novel connexin 26 compound heterozygous mutation results in deafness. *Laryngoscope* 2002;112:1159-62.
3. Pu Dai, Fei Yu, Bing Han, Xuezhong Liu, et al. *GJB2* mutation spectrum in 2063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment. *Journal of Translational Medicine* 2009;7:26.
4. Iris Schrijver. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss. *JMD* 2004;6,(4).
5. Amit Kochhar BS, Michael S. Hildebrand PhD, and Richard J. H. Smith MD. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med* 2007;9(7):393–408.
6. Thomas B. Friedman and Andrew J. Griffith. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003;4:341-402.
7. Richard JH Smith, MD. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews* December 2, 2008.
8. Rikkert L. Snoeckx, Patrick L. M. Huygen, Delphine Feldmann et al. *GJB2* Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. *Am. J. Hum. Genet.* 2005;77:945–957.
9. Stephanie A Moody Antonio, MD. Genetic Sensorineural Hearing Loss . *Inner Ear*, Jun 1, 2009.
10. Birkenhäger R, Aschendorff A, Schipper J, Laszig R. Non-syndromic hereditary hearing impairment. *Laryngorhinootologie.* 2007;86(4):299-309.
11. Françoise Denoyelle, Dominique Weil, Marion A. Maw. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics*, 1997;6(12).
12. Cohn et al. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2/DFNB1*). *Pediatrics.* 1999;103(3):546-50.
13. Guillermina Castillo-Maya, Yolanda Peñaloza-López, Francisco Hernández-Orozco. Etiología de la hipoacusia-sordera. *Gac Méd Méx* 2001;137(6).
14. Choung et al. Functional Study of *GJB2* in Hereditary Hearing Loss. *Laryngoscope* 112: September 2002.

15. Primignani et al. A New De Novo Missense Mutation in Connexin 26 in a Sporadic Case of Nonsyndromic Deafness. *Laryngoscope* 117: May 2007.
16. Richard JH Smith, MD. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNA3. *GeneReviews* April 30, 2009.
17. M. Mazzoli, G. Van Camp, V. Newton, N. Giarbini, F. Declau, A. Parving. Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Audiological Medicine* 2003;1:148-150.
18. Patrick J. Willems M.D. Genetic Causes Of Hearing Loss. *The New England Journal of Medicine* 2000;342(15).
19. Robertson ND, Morton CC. Beginning of a molecular era in hearing and deafness. *Clin Genet* 1999;55:149–159.
20. Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc.* 2000;33(2):51-6.
21. Leonardo Ordóñez, Alejandra Correa, Jorge Almario, José G. Lora, José Alberto Prieto. Sordera No Sindromática. *Acta Colombiana de Otorrinolaringología* 2003;31(3).
22. Ana Carla Batissoco, Ronaldo Serafim Abreu-Silva, Maria Cristina Celia Braga, Karina Lezirovitz, Valter Della-Rosa, Tabith Alfredo, Paulo Alberto Otto, and Regina Celia Mingroni-Netto. Prevalence of *GJB2* (Connexin-26) and *GJB6* (Connexin-30) Mutations in a Cohort of 300 Brazilian Hearing-Impaired Individuals: Implications for Diagnosis and Genetic Counseling. *Ear & Hearing* 2009;30;1–7.
23. The connexin-deafness homepage. July 2009. <http://davinci.crg.es/deafness>
24. Leopoldo Zelante, Paolo Gasparini, Xavier Estivil, Salvatore Melchionda. Connexin 26 mutation associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics*, 1997;6(9):1605-160.
25. Christy B. Erbe; Kevin C. Harris, MD; Christina L. Runge-Samuelson, PhD. Connexin 26 and Connexin 30 Mutations in Children with Nonsyndromic Hearing Loss. *Laryngoscope* 114: April 2004.
26. Keyko Kawaguchi P. Hipoacusia de causa genética *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 2005;65:39-44.
27. Zippora Brownstein, Karen B. Avraham. Deafness Genes in Israel: Implications for Diagnostics in the Clinic. *Pediatric Research* March 13, 2009.

28. J. Gallo-Terán, C. Morales-Angulo, M. Rodríguez-Ballesteros. Prevalencia de las mutaciones 35delG en el gen GJB2, del (GJB6-D13S1830) en el gen GJB6, Q829X en el gen OTOF y A1555G en el gen del ARNr 12S mitocondrial en sujetos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de inicio congénito o en la infancia. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2005;56:463-468.
29. Kyung-Ok Lee, Su-Jin Jeong, Ji-Young Byun, Jeong-Sook Kim, Hye-Jung Lee, Hye-Soon Seong, and Kyung-Tae Kim. Population-Based Newborn Hearing Impairment Screening Test Using *GJB2* Mutation Analysis. *Korean Soc. Clin. Lab. Sci.* 2007;39(2):113-121.
30. Andrew J. Griffith, Aqeel A. Chowdhry, Kiyoto Kurima, Linda J. Hood. Autosomal Recessive Nonsyndromic Neurosensory Deafness at DFNB1 Not Associated with the Compound-Heterozygous *GJB2* (Connexin 26) Genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet* 2000;67:745-749.
31. L. Van Laer, P Coucke, R F Mueller, G Caethoven, K Flothmann, S D Prasad, G P Chamberlin, M Houseman, G R Taylor, C M Van de Heyning. A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 2001;38:515-518.
32. Yun Hoon Choung MD, Sung-Kyun Moon PhD; Hong-Joon Park, PhD. Functional Study of *GJB2* in Hereditary Hearing Loss. *Laryngoscope* 2002, 112:1667–1671.
33. Virginia W Norris, Kathleen S Arnos, Wendy D Hanks, Xia Xia Walter E, Nance and Arti Pandya. Does universal newborn hearing screening identify all children with *GJB2* (connexin 26) deafness? penetrance of *GJB2* deafness. *Ear Hear*, 2006,27(6):732-741.
34. A Murgia, E Orzan, R Polli, M Martella, C Vinanzi, E Leonardi, E Arslan, F Zacchello. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 1999;36:829-832.
35. Hela Azaiez, G Parker Chamberlin, Stephanie M Fischer, Chelsea L Welp, Sai D. Prasad, R Thomas Taggart, Ignacio del Castillo. *GJB2*: The spectrum on Deafness-Causing Allele Variants and Their Phenotype. *Human Mutation* 2004;24:305-311.
36. Ignacio del Castillo, Manuela Villamar, Miguel A. Moreno Pelayo, Francisco J. del Castillo, Araceli Alvarez, Dolores Telleria. A Deletion Involving The Connexin 30 Gene In Nonsyndromic Hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346: 4.
37. Ignacio del Castillo, Miguel A. Moreno Pelayo, Francisco J. del Castillo, Zippora Brownstein, Sandrine Marlin, Quint Adina. Prevalence and Evolutionary Origins of the del(*GJB6-D13S1830*) Mutation in the DFNB1 Locus in Hearing-impaired Subjects: a Multicenter Study. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;73:1452-1458.

38. Cyntia C. Morton Ph.D and Walter E. Nance M.D. Newborn Hearing Screening A Silent Revolution. *N Engl J Med* 2006;354:20.
39. F J del Castillo, M Rodríguez Ballesteros, A Alvarez, T Hutchin, E Leonardi, C A de Oliveira, H Azaiez, Z Brownstein. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del (*GJB6*-d13s1854), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 2005;42:588-594.
40. Regina Nickel and Andrew Forge. Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Curr Opin in Otorrinolarigol Head Neck Surg* 2008;16:452-457.
41. Benjamin C. Stong, Qing Chang, Shoeb Ahmad, Xi Lin. A Novel Mechanism for Connexin 26 Mutation Linked Deafness: Cell Death Caused by Leaky Gap Junction Hemichannels. *Laryngoscope* 2006;116:2205-2210.
42. Wei Liu, Marja bostrom, Andres Kinnfors, Helge Rask-Andersen. Unique expresin of connexins in the human cochlea. *Hearing Research* 2009;250:55-62.
43. Agustín D. Martínez, Rodrigo Acuña, Vania Figueroa, Jaime Maripillan y Bruce Nicholson. Gap junction channels dysfunction in Deafness and Hearing loss. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(2):309-322.
44. Shoji Maeda, So Nakagawa, Michihiro Suga, Eiki Yamashita, Atsunori Oshima, Yoshinori Fujiyoshi. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* 2009;458.
45. Ingo todt, Hans Christian Hennies, Dietmar Basta and Arne Ernst. Vestubular dysfunction of patients with mutations of Connexin 26. *Auditory and Vestibular systems* 2005;16:11.
46. Qing Chang, Wenxue tang, Shoeb Ahmad, Benjamin Stong, Grace Leu, and Xi Lin. Functional Studies Reveal New Mechanism for Deafness Caused by Connexin Mutations. *Otology and Neurology* 2009;30:237-240.
47. K Cryns, E Orzan, A Murgia, P L M huygen, F Moreno, I del Castillo, G Parker Chamberlin, H Azaiez, S Prasad, R a cucci. A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 2004;41:147-154.
48. Sandrine Marlin, Erea-Noel Garabedian, Gilles Roger, Lucien Moatti, Nicole matha, Patricia Lewin. Connexin 26 Gene Mutations in Congenitally Deaf Children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:927-933.
49. Els Van Eyken, Lut Van Laer, Erik fransen, Vedat Topsakal, Jan Jaap Hendrickx, Kelly Demeester, Paul Van de Heyning. The contribution of *GJB2* (Connexin 26) 35delG to Age-Related Hearing Impairment and Noise-Induced Hearing Loss. *Otology and Neurology* 2007;28:970-975.

50. Brobby G W, Muller-Myhsok and Horstmann R D. Connexin 26 R143W Mutation Associated with Recessive Nonsyndromic Sensorineural Deafness in Africa. *N Engl J Med* 1998;338:548-550.
51. Denoyelle F, et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 1998;393:319-320.
52. Wu BL, et al. Effectiveness of sequencing connexin 26 (GJB2) in cases of familial or sporadic childhood deafness referred for molecular diagnostic testing. *Genet Med* 2002;4:279-88.