



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**ANÁLISIS DE LA DELECIÓN DEL GEN GJB6 EN PACIENTES
HETEROCIGOTOS PARA EL GEN GJB2 CON HIPOACUSIA
NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA EN UNA MUESTRA DE
POBLACIÓN MEXICANA**

TESIS DE POSGRADO

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA:

DRA. MIRNA MARTINEZ SAUCEDO

ASESORES DE TESIS: DR. SERGIO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA



México D.F.

JULIO 2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**ANÁLISIS DE LA DELECIÓN DEL GEN GJB6 EN PACIENTES
HETEROCIGOTOS PARA EL GEN GJB2 CON HIPOACUSIA
NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA EN UNA MUESTRA DE
POBLACIÓN MEXICANA**

PRESENTA:

DRA. MIRNA MARTINEZ SAUCEDO

TUTORES:

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

COLABORADOR:

M en C. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Genética Médica, Hospital General de México



México D.F.

JULIO 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

JEFE DEL SERVICIO DE GENÉTICA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

ASESORA DE TESIS



**HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO**

México D.F.

JULIO 2012

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la vida. Me ha dado tanto con esta nueva aventura en mi andar.

Gracias a mi familia por su incondicional y amoroso apoyo. Testigos a la distancia de este esfuerzo.

Gracias al Dr. Sergio A. Cuevas Covarrubias por todo su apoyo y por creer en mí, por el ejemplo que me ha dado, por sus consejos y llamadas de atención que tanto me han servido. Ha sido parte muy importante en mi formación como genetista.

A los médicos adscritos que son excelentes personas, siempre dispuestos a enseñar.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente tuvieron influencia sobre mí y me impulsaron a continuar.

Y finalmente al Hospital General de México que me abrió las puertas dándome un lugar en esta institución, de donde me llevo experiencias inolvidables.

Gracias totales.

ÍNDICE

I.- SIGLAS Y ABREVIATURAS	7
II. RESUMEN	8
III. ANTECEDENTES	10
1. Hipoacusia y genes	13
2. Mecanismo de la audición normal	15
3. Uniones Gap	21
4. Conexinas 26 y 30	24
5. Genes <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i>	28
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	32
V. OBJETIVO	33
VI. HIPÓTESIS	33
VII. DISEÑO DEL ESTUDIO	33
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Poblaciones incluidas en el estudio	
2.- Estudio molecular	
A) Obtención de muestra	
B) Extracción de DNA	
C) Verificación de la calidad del DNA.	
D) Diseño de oligonucleótidos y PCR	

E) Purificación del fragmento amplificado y productos de extensión

IX. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	45
X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
XI. RESULTADOS	46
XII. DISCUSIÓN	48
XIII. CONCLUSIONES	51
XIV. REFERENCIAS	52

I. SIGLAS Y ABREVIATURAS

dB. Decibeles

Hz. Hertz

HNNS. Hipoacusia neurosensorial no sindrónica

AD. Autosómico dominante

AR. Autosómico recesivo

DFN. Deafness

DFNA. Hipoacusias no sindrónicas de herencia autosómica dominante

DFNB. Hipoacusias no sindrónicas de herencia autosómica recesiva

CGJ. Channel Gap Junction

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

II. RESUMEN

Se estima que 1 de cada 1.000 recién nacidos posee algún tipo de deficiencia auditiva, resultando en alteraciones del lenguaje, del habla, del desarrollo cognitivo y psico-social, limitando drásticamente la calidad de vida del afectado.

La disfunción auditiva es causada tanto por factores ambientales como genéticos y la proporción de casos que pueden ser atribuidos a causas hereditarias aumenta en forma continua. En más de la mitad de los casos la causa de la sordera es genética, 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. Sin embargo, una gran fracción (10-42%) de los pacientes con mutaciones en *GJB2* poseen sólo una mutación identificada.

Esto llevó a descubrir una delección de 309 Kb la cual involucra la región 5' del gen *GJB6*, resultando la segunda mutación más frecuente en distintas poblaciones. 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 *GJB6* en busca de la delección más frecuentemente reportada en la literatura en 6 pacientes mexicanos con una sola mutación en el gen *GJB2* (heterocigotos) para determinar la doble heterocigocidad en estos pacientes.

Se identificó un paciente con una delección en el gen de la conexina 30, en los 5 restantes no se encontró dicha delección, lo que nos indica que existe una baja frecuencia de este tipo de delección en la muestra de pacientes analizada.

III. ANTECEDENTES

La pérdida de la audición es el defecto sensorial más común en los seres humanos. La disfunción auditiva es causada tanto por factores ambientales como genéticos y la proporción de casos que pueden ser atribuidos a causas hereditarias aumenta en forma continua.

La incidencia estimada de la hipoacusia congénita es de 1 en 1.000 nacimientos, de los cuales aproximadamente 60% son atribuibles a factores genéticos; el resto es secundaria a factores ambientales entre estos últimos destacan las infecciones prenatales (citomegalovirus, herpes virus, rubéola, toxoplasma, etc.), las infecciones posnatales (meningitis bacterianas), el sufrimiento fetal, la hiperbilirrubinemia o los fármacos ototóxicos. Estos porcentajes han ido modificándose en los últimos años en paralelo al desarrollo tecnológico experimentado en este tiempo por la biología molecular.^{1, 2,3}.

Basados en el hecho de que el rango del habla en una conversación es de 50-60 dB, la hipoacusia se clasifica como: leve de 20 a 40 dB, moderada de 41 a 70 dB, severa de 71 a 95 dB y profunda >95 dB. Por las frecuencias: baja (500 Hz), media (501-2000 Hz) y alta (más de 2000 Hz)^{5,6}. En cuanto a la edad de inicio se clasifica en prelingual, o poslingual. 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 por último

central, causada por daño o disfunción a nivel del octavo nervio craneal, del tallo o la corteza cerebral.^{2, 4, 5,6.}

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.^{5, 7.} Las alteraciones auditivas de origen genético se dividen de acuerdo a su forma de presentación en no sindrómicas (70%) y sindrómicas (30%).^{1, 2.} Las hipoacusias se etiquetan como sindrómicas cuando se asocian con malformaciones del oído externo o con manifestaciones en otros órganos o sistemas, 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 con dismorfias craneofaciales, el síndrome de Stickler con habitus marfanoide, el síndrome de Alport con anomalías renales y el síndrome de Jervell y Lange-Nielsen con intervalos QT largos.^{8,9,10.} Se han descrito más de 400 síndromes en los cuales la hipoacusia es un componente clínico.¹¹

La sordera no sindrómica no está asociada a otras manifestaciones clínicas 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 (1-5%) y mitocondrial (< 1%). La HNNS es usualmente, prelingual, severa a profunda, y permanece relativamente estable.^{1, 2,5, 6.} *Figura 1* (referencia 2)

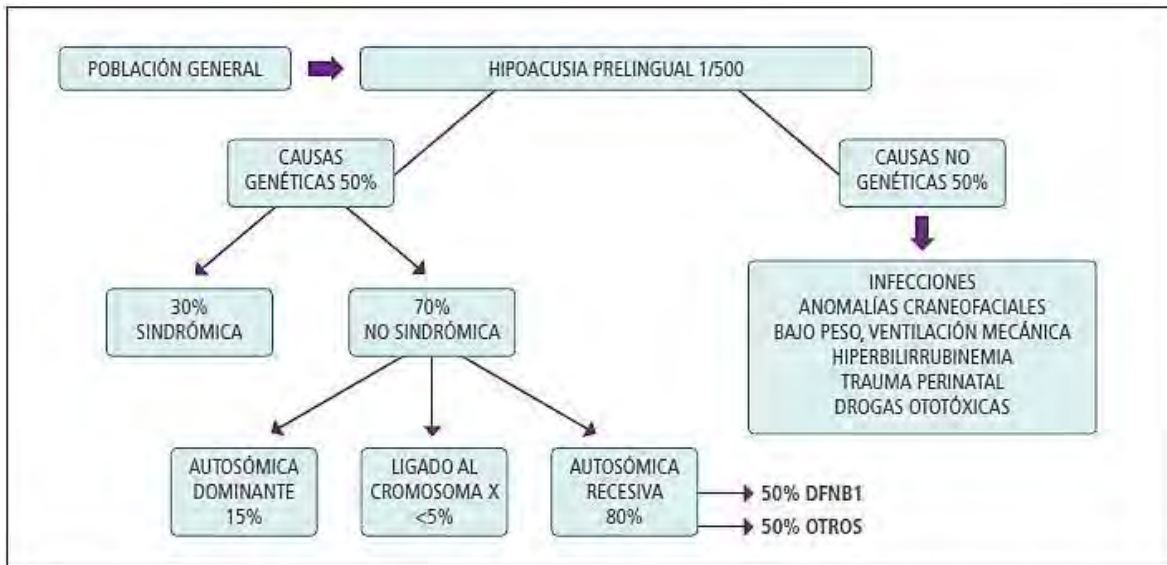


Figura 1. Las alteraciones auditivas de origen genético se clasifican de acuerdo a su forma de presentación. La forma más común de hipoacusia hereditaria es la forma no sindrómica de herencia autosómica recesiva.

Actualmente se desconocen los porcentajes correspondientes a cada patrón de herencia en el caso de las hipoacusias poslinguales no sindrómicas. Sin embargo, el porcentaje de familias con un patrón AD es mayor que en las prelinguales.¹

Características genéticas de las hipoacusias hereditarias

- Penetrancia incompleta: sólo un porcentaje de los individuos portadores del gen alterado manifiesta la enfermedad.
- Expresividad variable: la severidad de las manifestaciones clínicas difiere entre individuos portadores de una misma mutación.
- Heterogeneidad genética: mutaciones en genes diferentes pueden producir una misma manifestación clínica. Se conocen al menos 30 genes capaces de producir una hipoacusia prelocutiva

no sindrómica de herencia autosómica recesiva (*GJB2*, *GJB6*, *OTOF*, *TECTA*, *MYO7A*, etc.)¹²

- Heterogeneidad alélica: una misma mutación puede dar lugar a enfermedades diferentes. Por ejemplo, la mutación recurrente 35delG en el gen *GJB2* (conexina 26), puede ocasionar una hipoacusia no sindrómica AR (DFNB1), no sindrómica AD (DFNA3), o un síndrome con manifestaciones cutáneas, vasculares o tiroideas.²

Debido a estas características, las hipoacusias de origen genético, dificultan el establecimiento de correlaciones entre el genotipo y el fenotipo.^{1, 5, 6, 7, 8}

1. HIPOACUSIA Y GENES

Se han identificado genes responsables de más de 40 sorderas no sindrómicas y 140 loci para distintas formas de hipoacusia.^{1, 2, 13.}

La nomenclatura de cada uno de estos loci se basa en la forma de herencia en la que se transmite la patología. Aquellos locus donde se encuentren genes que produzcan hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica dominante se denominarán **DFNA** (DeaFNess) numerados actualmente del 1 al 57; las formas de herencia autosómica recesiva se denominan **DFNB**, numerados del 1 al 77; las formas ligadas al cromosoma X se denominan **DFN** numerados del 1 al 8.¹

En términos prácticos, se dice que la mayoría de los loci de herencia autosómica recesiva causan hipoacusia prelingual severa-profunda, con excepción del locus DFNB8, el cual se relaciona con una hipoacusia pos lingual y rápidamente progresiva. ¹

La mayoría de los loci de herencia autosómica dominante causan hipoacusia poslingual, con excepción de DFNA3, DFNA8, DFNA12 y DFNA19. Los loci ligados al cromosoma X (DFN) pueden ser pre o post linguales *Figura 2.* ^{1, 2, 3, 4,5}

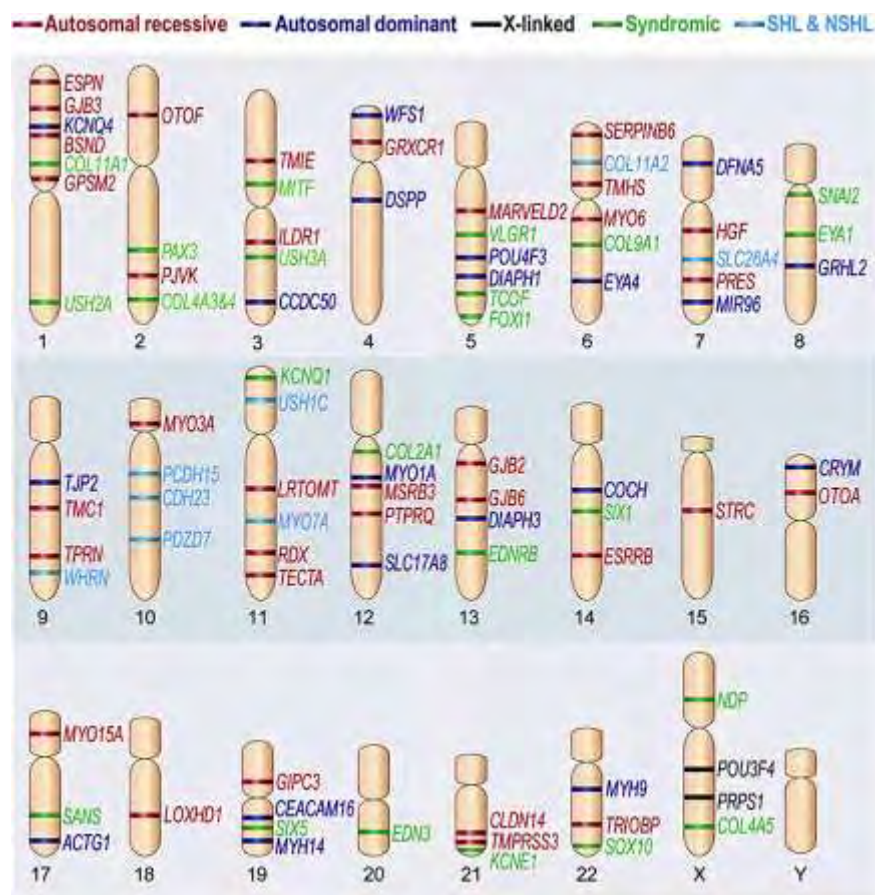


Figura 2. Genes causantes de hipoacusia. Representación esquemática de todos los genes clonados que se asocian con hipoacusia no síndromica autosómica recesiva (rojo), autosómico dominante (azul) y ligada la X (negro); hipoacusia síndromica (verde) y aquellos involucrados tanto en hipoacusias síndromicas como no síndromicas (azul marino). *Tomado de la referencia 13*

Aproximadamente, 50% de las hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva son causadas por mutaciones en el locus DFNB1 ubicado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q11-q12); se ha establecido que los genes responsables son *GJB2* (Gap Junction Beta-2), el cual codifica para la Conexina 26, una proteína de las uniones gap; y *GJB6*, que codifica para conexina 30 (Gap Junction Beta-6).^{1, 2, 4, 6,7}

Se considera que las mutaciones en *GJB2* son la etiología más frecuente de sorderas hereditarias.^{9, 10, 11,12, 14} Una mutación específica, 35delG, es responsable de ~50- 70% de las mutaciones patológicas del gen de la Cx26.^{15, 16, 17, 18,19} El otro 50% de los casos se debería a otras mutaciones en cualquiera de los numerosos genes descritos, muchas de las cuales sólo han sido encontradas en una o dos familias.^{1, 2,3}

2. 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.²⁰ *Figura 3.*

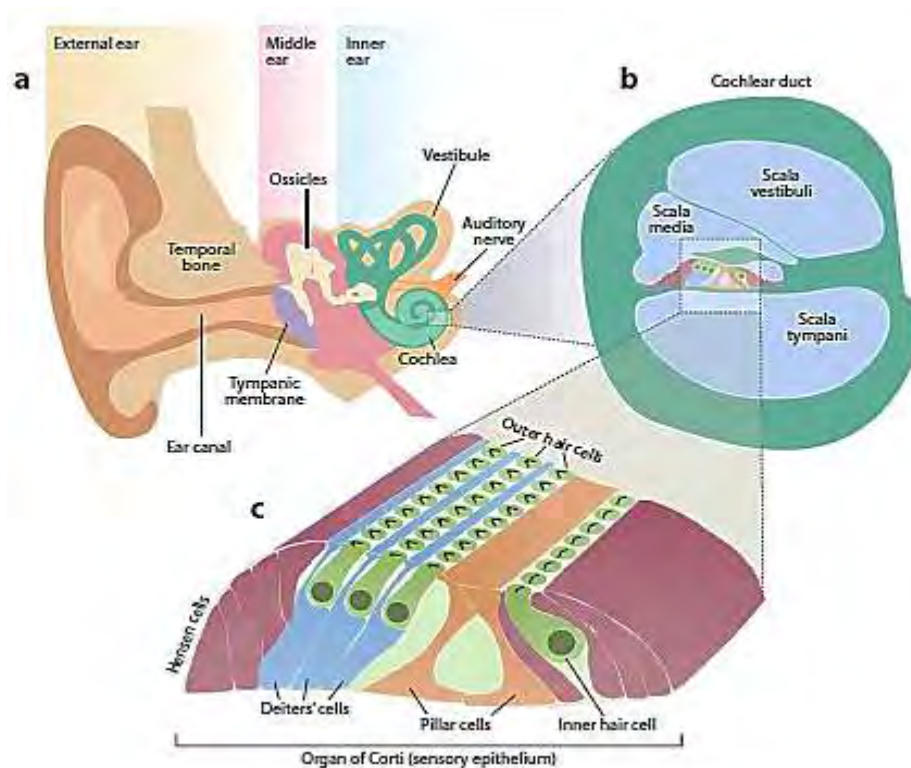


Figura 3. Ilustración esquemática del oído humano. (Referencia 20)

La cóclea (Figura 4) 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.^{20,21}

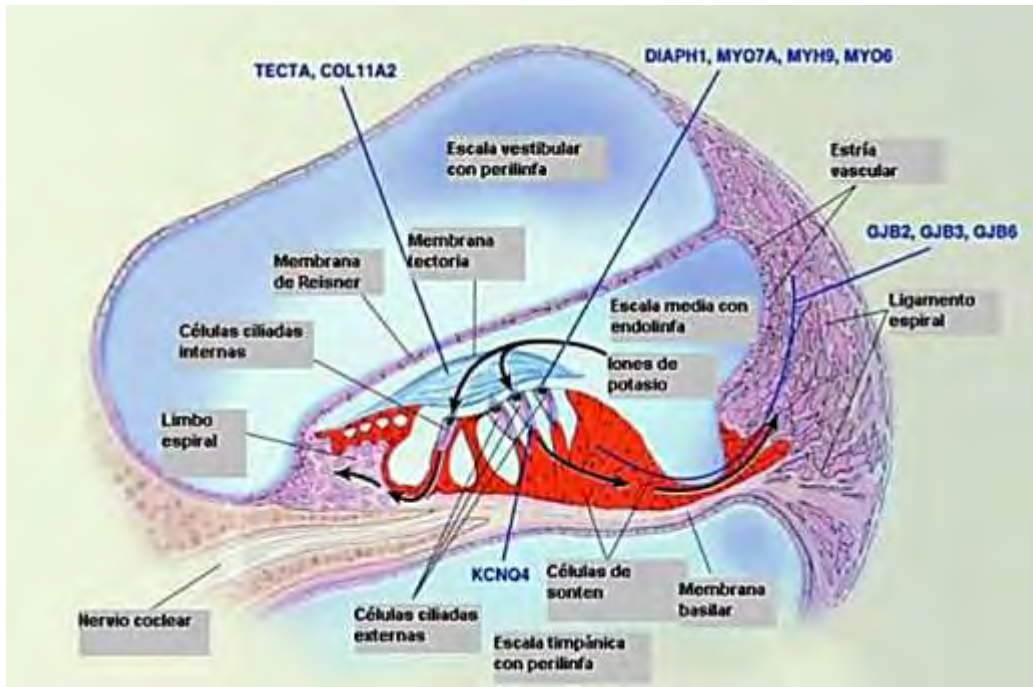


Figura 4. La cóclea.

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 (figura 5). 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.²¹

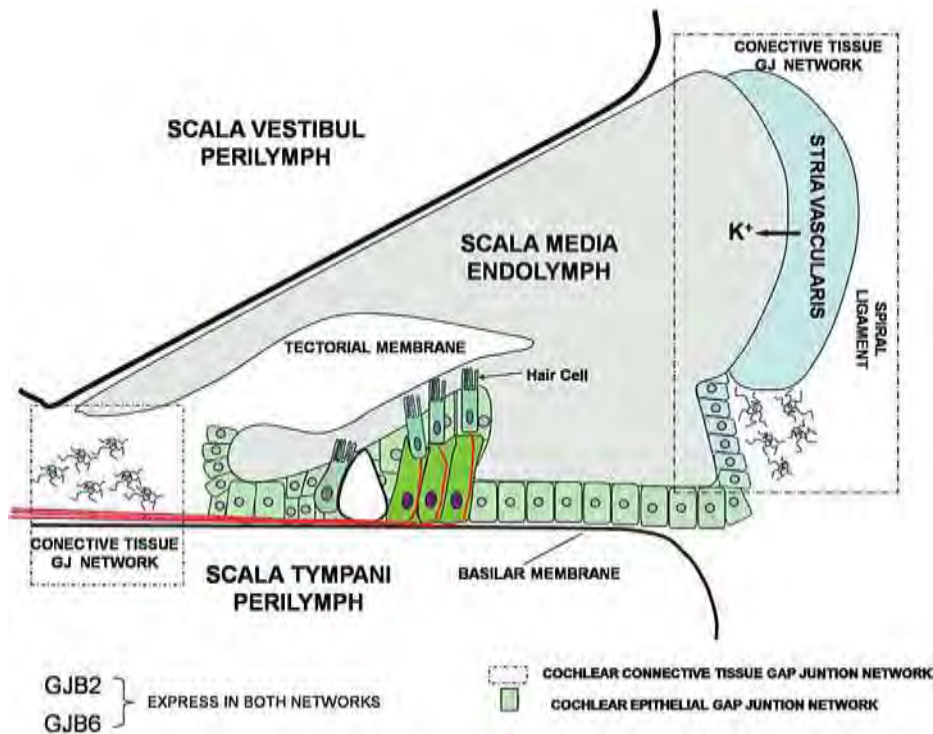


Figura 5. Compartimentos de la cóclea. Referencia 21

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.^{21, 22}

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 (*figura 6 y 7*). 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.^{21, 22}

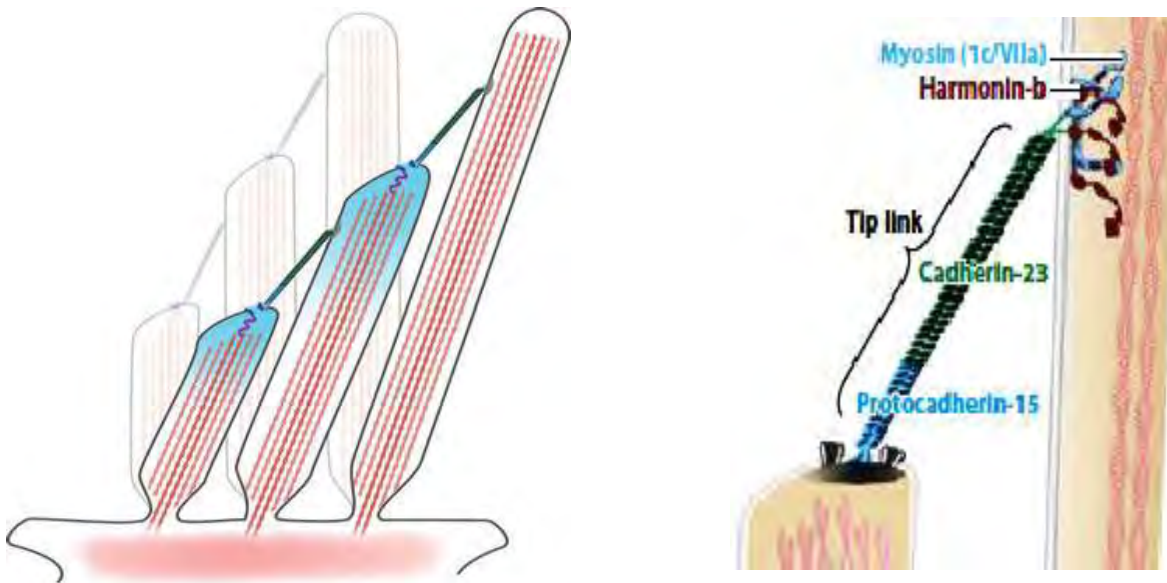
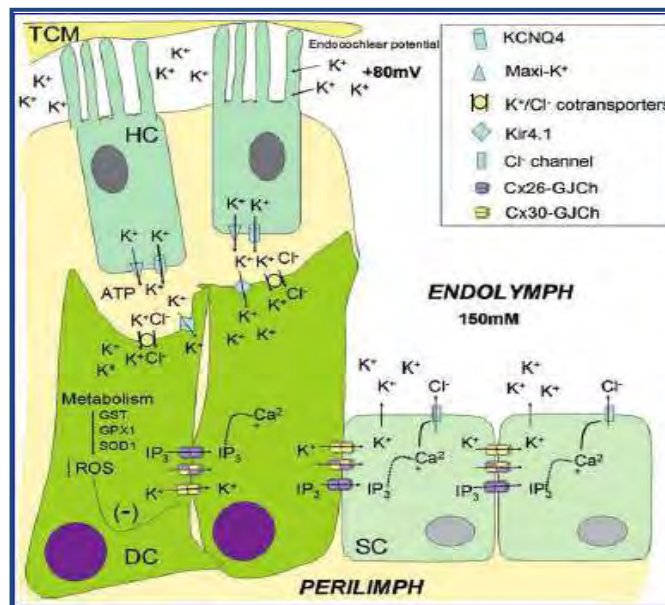


FIGURA 6 y 7. Estereocilios Referencia 22

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.²² 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 (*figura 8*). 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, 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.^{7, 21, 22, 23.}

Figura 8. Recaptura de K^+ en la cóclea. Referencia 21

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 en menores cantidades de tipo IX y XI. La proteína no colágeno más abundante es la α tectorina.²⁴

3. UNIONES GAP

Dado que la mayoría de las mutaciones presentes en las sorderas se dan en las uniones Gap que son codificadas por genes, es importante describir su estructura y función. Las uniones Gap son un grupo de canales intercelulares que conectan el citoplasma de células adyacentes a través del espacio intercelular, lo que permite a los iones inorgánicos y otras moléculas como segundos mensajeros (IP3, cAMP, cGMP, ATP, etc.) o diversos metabolitos (azúcares, aminoácidos, glutatión, etc.), con un tamaño de aproximadamente 1KDa, circular de una célula a otra. Se ha demostrado que las uniones estrechas del tejido conectivo y epitelial de la cóclea son responsables del reciclado del potasio endolinfático.^{25,26}

Estas uniones Gap están formadas por seis subunidades proteicas llamadas conexinas, que atraviesan la membrana celular de un extremo a otro. La unión de estas conexinas forma una estructura de seis lados llamada conexón. El conexón individual de una célula forma un hemicanal el cual se une al de la célula vecina formando un canal de unión tipo Gap.^{25,27} Los hemicanales individuales pueden estar

compuestos de un tipo de conexina (homomérico) o más de uno (heteromérico) formando dos hemicanales opuestos que forman un solo canal y puede contener el mismo conexon (homotípico) o diferentes (heterotípico). *Figura 9*²⁶

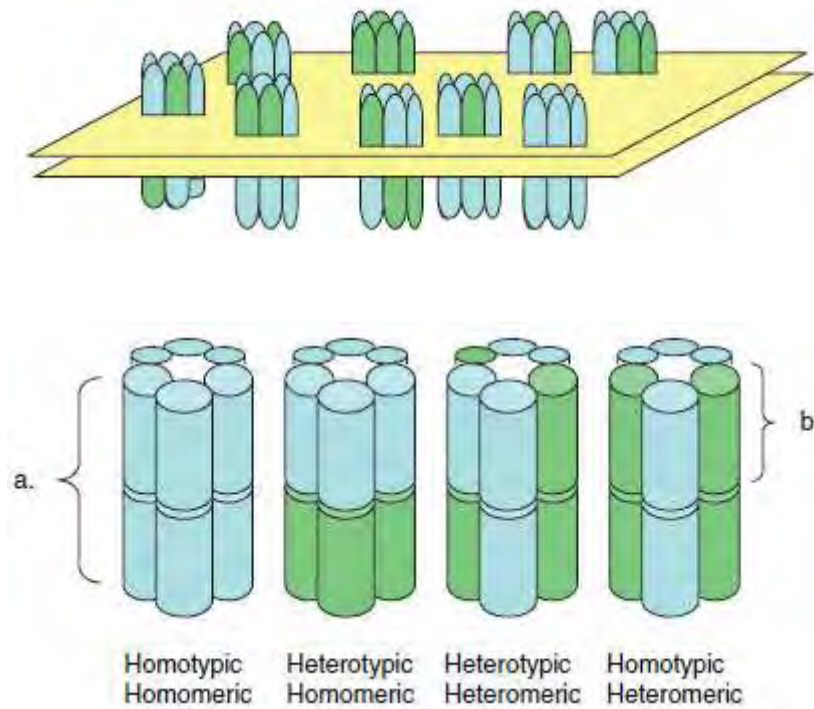


Figura 9. Conexones. Tomado de referencia 26.

Cualquiera de las conexinas compatibles puede, hipotéticamente, formar 196 diferentes tipos de canales. Todas tienen la misma topología en la membrana plasmática: cuatro regiones transmembrana, dos asas extracelulares y tres regiones intracitoplasmáticas. La mayor variabilidad en la secuencia de los genes para las conexinas se encuentra precisamente en estos dominios, los cuales se piensa que participan en la regulación de la actividad.

Las conexinas humanas se denominan con un número de acuerdo a su masa molecular. Un total de 21 genes han sido identificados y según la similitud de secuencia aminoacídica se dividen en subtipos: unión Gap alfa (*GJA*), beta (*GJB*) y gamma (*GJC*) seguido por un número. Así la conexina 26 es codificada por el gen *GJB2* y la conexina 30 por el *GJB6*. (*Figura 10*). Los genes *GJA* y *GJB* tienen una estructura similar. Ambos tienen un exón no codificante en la región 5' UTR y mientras que la región codificante se encuentra en el segundo exón.^{25, 26} 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.^{28, 29}

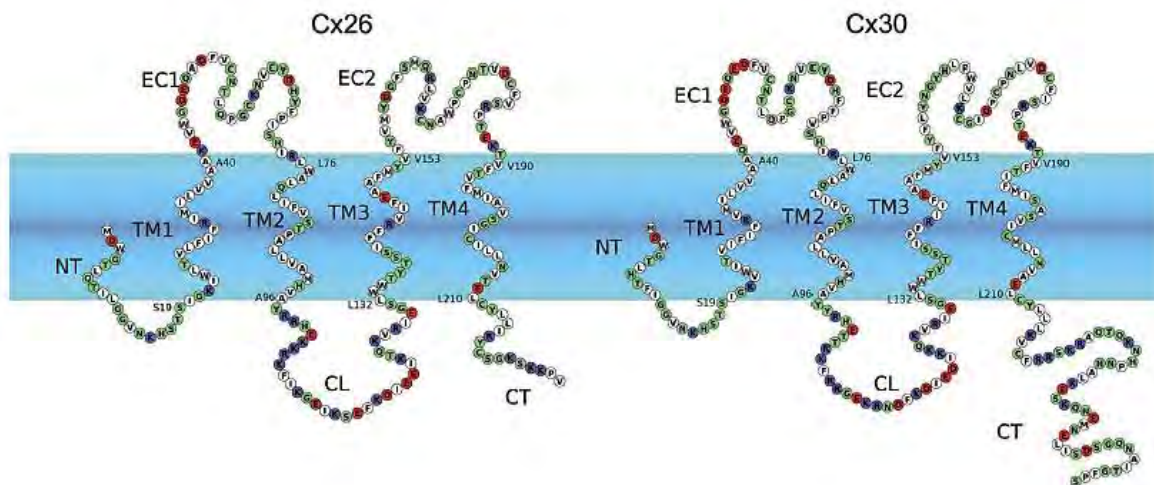


Figura 10. Representación topológica de Cx26 y Cx30. NT, N-terminal, CT, C-terminal, TM1-TM4, hélices transmembrana 1 a la 4; CL bucle citoplásmico de unión a TM2, TM3; EC1, EC2, bucles extracelulares que unen TM1 a TM2 y TM3 a TM4 respectivamente. *Referencia 26.*

4. CONEXINAS 26 Y 30

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 está totalmente entendido cuál es el papel que juegan las uniones gap en el oído interno y cómo las mutaciones en las conexinas causan sordera.³⁰

Nueve genes para conexinas se han implicado en diversos trastornos 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 Cx43 también han sido relacionadas con sordera.^{21, 31.}

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 Cx26.³² Por obvias razones la mayoría de la información con respecto a la distribución de las conexinas en el oído interno ha sido obtenida de modelos animales, mayormente roedores, suponiendo que debe ser

similar en humanos. Las conexinas (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.²¹

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.^{34,35, 36, 37} 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.³⁰

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 11*).²¹

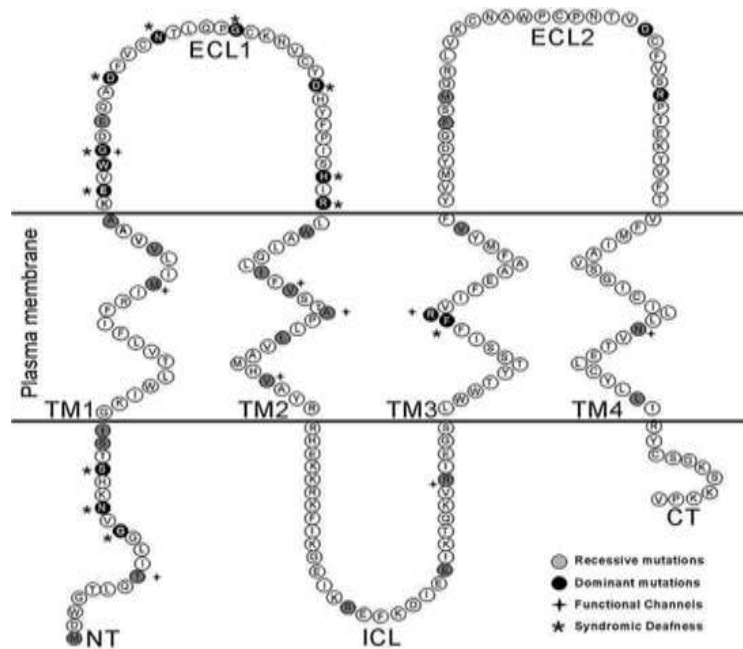


Figura 11. Estructura de la conexina 26 y sus principales sitios de mutación.
Referencia 21

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.³⁸

La Cx26 y la CX30 estructuralmente son muy similares. A través de análisis de expresión hecho en ratones y ratas mostraron que la Cx26 y Cx30, así como la Cx31 y Cx32, forman dos grupos de coexpresión. Se cree que la coexpresión de Cx26 y Cx30 en el oído interno podría ser un prerrequisito para la maduración de la cóclea.

Su coexpresión también se detecta en la cóclea de embriones humanos después de la semana 22 de gestación. Lo anterior favorece la hipótesis de que sus conexiones pudieran formar homo y/o heterocanales.³⁹

5. GENES *GJB2* Y *GJB6*

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 reportó únicamente una familia ligada a DFNB1. 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.³⁴

Zelante et al. en 1997 en un enfoque independiente de clonación posicional y análisis de genes candidatos del locus DFNB1, observó 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.^{31, 34}

El gen *GJB2* es el responsable de 20% a 50% de hipoacusia no sindrómica en niños y de 40% de las hipoacusias no sindrómicas severas a profundas.³³ 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.^{36, 41}

Se han descrito más de 90 mutaciones para el gen *GJB2*,^{42,43} 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 identificó 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.^{31,38, 44,45}

La frecuencia relativa de alguna de estas mutaciones en una población particular es relevante para el desarrollo de sistemas de análisis específicos. 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.^{46, 47} 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.⁴⁷ 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.

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, por lo que se ha postulado que, la presencia de mutaciones adicionales afectan otro gen en el locus DFNB1, explicaría la sordera en esos pacientes.^{42,48, 49,}

50,52

En el locus DFNB1 se encuentra además el gen *GJB6* que codifica a la conexina 30. Una deleción de 342 kb en este gen, es la segunda mutación mas frecuente en conexinas, después de la 35delG de *GJB2* en algunas poblaciones.⁴⁰ Varios autores entre ellos del Castillo *et al.*⁴⁹ reportaron en el 2003 que DFNB1 puede tener un patrón de herencia *monogénico* o digénico dando como resultado mutaciones en un gen para otra conexina (*GJB6*) dentro de ese complejo locus. Ellos reportaron que una deleción de 309 kb involucrando al gen *GJB6* es la segunda mutación mas frecuente causante de sordera prelingual en población española. Esta deleción (*GJB6-D13S1830*) resulta en truncamiento de un extenso segmento del marco de lectura abierto de *GJB6* el cual se localiza rio arriba del gen *GJB2* en el cromosoma 13. La del(*GJB6-D13S1830*) se ha implicado en otra alteración adicional al DNA acompañando la mutación 35delG (doble heteocigocidad) en algunos pacientes con DFNB1.⁵¹ Por otra parte, la deleción (*GJB6-D13S1830*) ha sido reportada en homocigotos (0.2%) y heterocigotos (0.4%) en pacientes sin mutación en el gen *GJB2*.⁵²

Ante estos datos, es importante caracterizar el comportamiento de las alteraciones en *GJB6* en pacientes mexicanos para identificar el genotipo correspondiente en nuestra población.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Mutaciones en el gen *GJB2*, que codifica la conexina 26, es la principal causa de sordera autosómica recesiva neuosensorial no sindrómica en la mayoría de los grupos étnicos. Además de ésta, se han encontrado dos deleciones en el gen *GJB6* como segunda causa de este tipo de sorderas en individuos homocigotos o heterocigotos compuestos para estas deleciones o también doble heterocigocidad involucrando una deleción y una mutación en *GJB2*.

Existen escasos datos sobre la genética de la sordera en nuestro país. Hay algunos estudios de familias con mutaciones heterocigotas para el gen *GJB2*, pero no se cuenta con estudios previos que nos informen sobre deleciones en el gen *GJB6* como posible causa de sordera en estos pacientes.

El conocimiento de esta herencia digénica en la hipoacusia autosómica recesiva 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 estos cambios moleculares disminuye la extensión de pruebas de diagnóstico, resultando en reducción de costos médicos.

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

Por lo que el planteamiento de nuestro problema se definiría en conocer cual es la frecuencia de la delección *GJB6* en una muestra de pacientes mexicanos con alteraciones en el gen *GJB2* en estado heterocigoto.

V. OBJETIVO

Realizar el análisis de la delección del gen *GJB6* en una muestra de pacientes mexicanos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica con mutaciones heterocigotas para el gen *GJB2*, tanto en casos familiares como esporádicos, y determinar el posible origen digénico en estos pacientes.

VI. HIPÓTESIS

Existen delecciones en el gen *GJB6* en los pacientes con mutaciones heterocigotas para el gen *GJB2* en pacientes con sordera congénita neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva en una muestra de pacientes mexicanos.

VII. DISEÑO DEL ESTUDIO

1. Tipo de investigación:

Se trata de un estudio observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

2. Universo:

Se convocó al estudio a casos familiares y esporádicos identificados clínicamente con sordera neurosensorial no sindrómica prelingual, del Hospital General de México, así como de otras instituciones.

3. Criterios de Selección:

a) Inclusión:

- Familias con dos o más hijos con sordera neurosensorial no sindrómica prelingual.
- Casos aislados de sordera neurosensorial no sindrómica prelingual.

b) Exclusión:

- Pacientes en los que se tuvo sospecha que la sordera era de causa no hereditaria.
- Pacientes con sordera asociada a algún síndrome específico.

c) Eliminación

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

4. Variables del estudio:

a) Dependiente:

Delección en el gen *GJB6*

b) Independiente:

Pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica con mutación heterocigota para *GJB2*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Poblaciones incluidas en el estudio:

Se incluyeron a 6 pacientes con sordera no sindrómica prelingual a los cuales se les identificó previamente la mutación heterocigota para el gen *GJB2*.

Previo consentimiento informado sobre su participación en este protocolo, cada 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 entregó copias de sus resultados de todos los estudios, se proporcionó asesoramiento genético y se les orientó sobre la mejor opción terapéutica audiológica y de desarrollo del lenguaje para los afectados.

2. Estudio molecular

A) Obtención de la muestra.

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

B) 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.

C) 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 transiluminador ultravioleta para cuantificar de forma aproximada la calidad del DNA.

D) 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.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo la amplificación de la región que contiene los puntos de ruptura de la del(GJB6-D13S1830) y así como del exon 1 el cual se usó como control para verificar que las condiciones de la PCR fueron las adecuadas y para distinguir si la deleción está presente o no. El volumen final fue de 30 µl y a cada tubo se le agregaron 3 µl de DNA.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

GJB6 F, 5'-TTTAGGGGCATGATTGGGGTGATTT-3'
R 5'-CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT-3'

Exón 1 F 5'-CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT-3'
R, 5'-CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA-3'

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

30 ciclos

Temperatura inicial: 94 °C por 5 minutos

Desnaturalización: 94 °C por 45 segundos

Alineación: 62.5°C 45 por segundos

Polimerización: 72 °C por 1 minuto 15 segundos

Post elongación: 72°C por 7 minutos.

Obtuvimos la temperatura correcta de alineación para cada región mediante la siguiente fórmula:

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

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

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 *GJB6* se prepara un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio.

- En un matraz de erlen meyer 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 μ l 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 transiluminador 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 *GJB6* 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 µl 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 para secuenciación de DNA.

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:

La mezcla de BigDye contiene los siguientes reactivos:

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

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

- Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- Tris-HCL (pH 9.0)
- MgCl 2
- 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.

E) 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.

IX.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.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

XI. RESULTADOS

Se analizaron 6 propósitos a los cuales se les realizó previamente el estudio molecular del gen *GJB2* resultando ser homocigotos para la mutación 35delG. A estos pacientes se les buscó la delección más frecuentemente reportada en la literatura del gen *GJB6*, la delección de 342 kb (*GJB6-D13S1830*). De estos solamente un paciente resultó con dicha delección (16%). Posteriormente, se les realizó el análisis molecular a ambos padres de la paciente tanto del gen *GJB2* como del gen *GJB6* obteniendo como resultado que el papá es portador de la mutación 35delG del gen *GJB2* y la mamá portadora de la del(*GJB6-D13S1830*), como se muestra en la fotografía de la electroforesis. (Figura 12).

El resto de los 5 pacientes no portan dicha delección (84%).

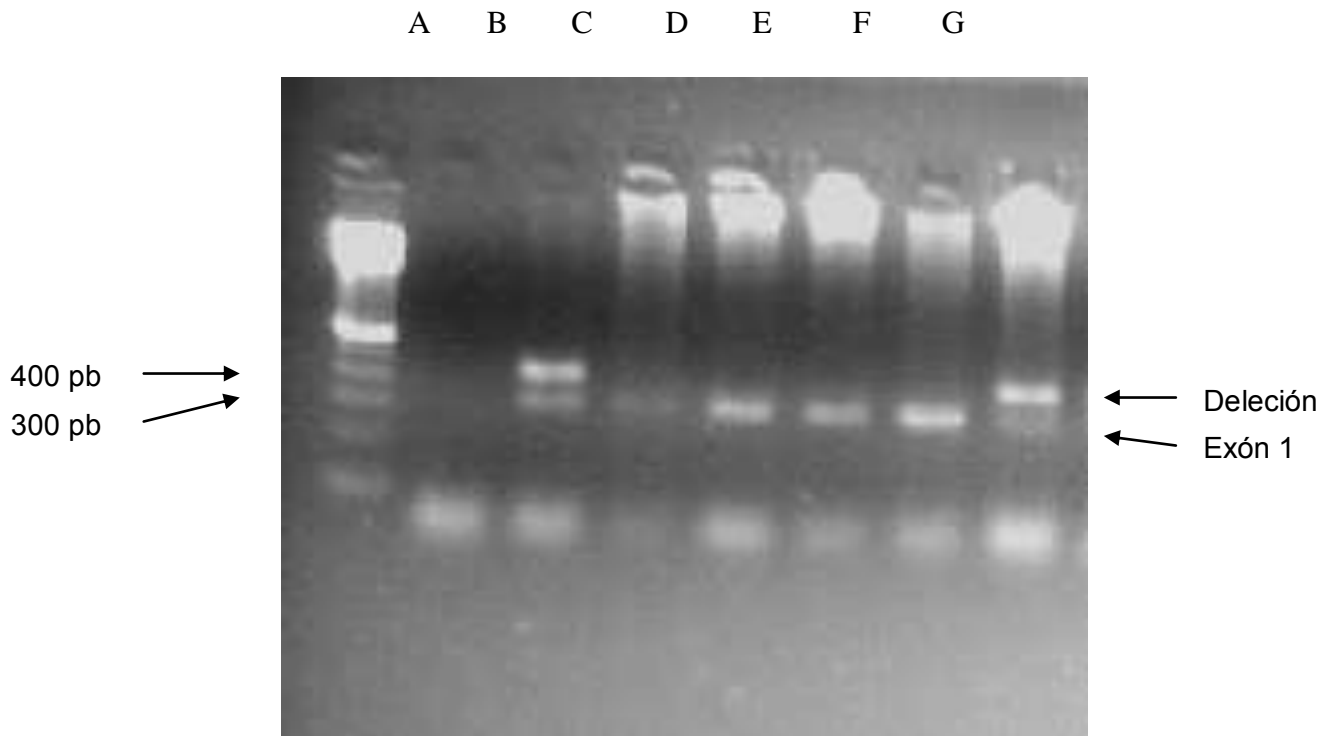


Figura 12. Resultados de la electroforesis. Se observan dos líneas en B y G, una de 400 pb y otra de 300 pb aproximadamente que corresponden a la delección y al exón 1 utilizado como control interno, respectivamente. B es el propósito y G la mamá portadora de la delección.

Después de identificar la delección en el gel de la electroforesis, se procedió a purificar el fragmento para su secuenciación y comprobar los puntos de ruptura como se muestra en la figura 13, confirmando de esta manera la presencia de *del(GJB6-D13S1830)* tanto en el propósito como en su mamá.

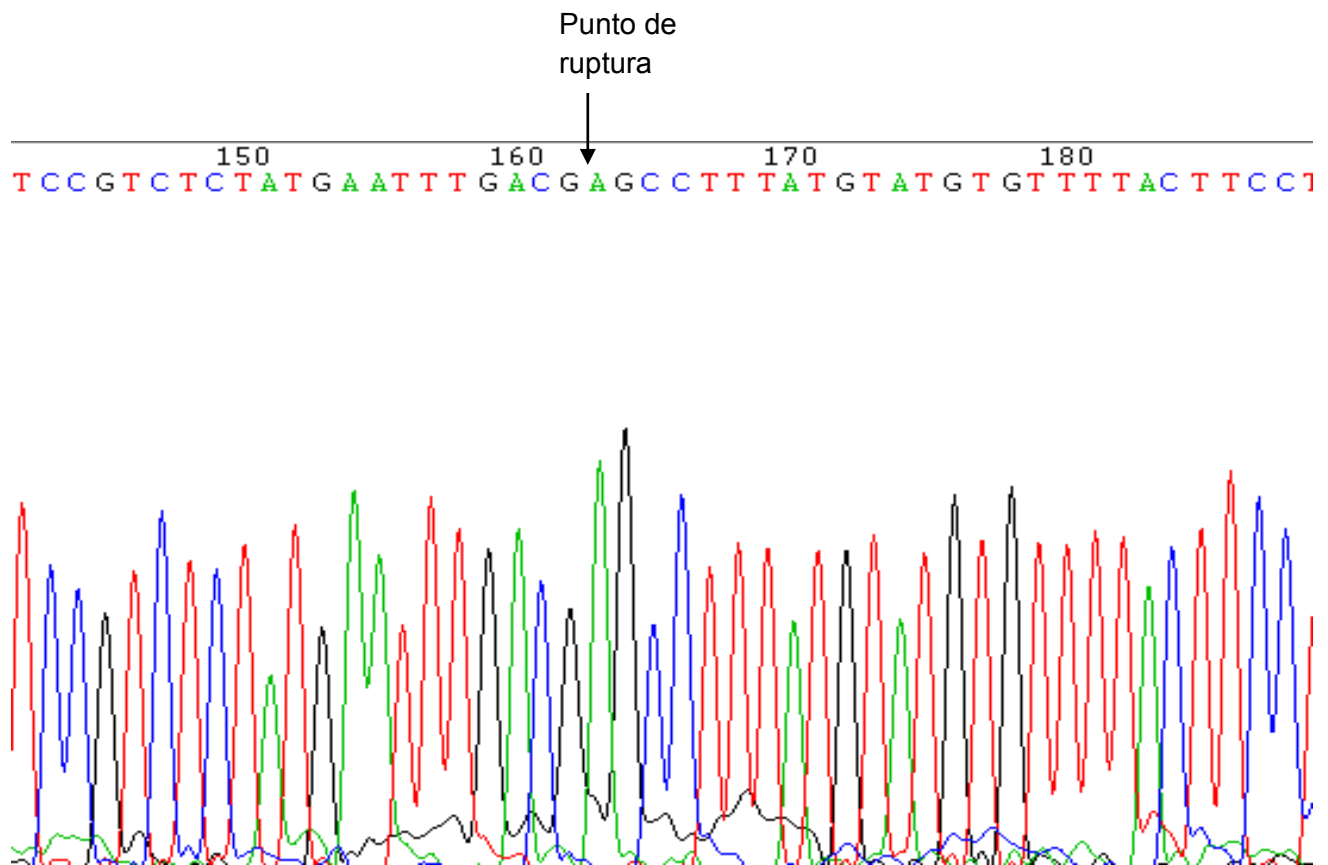


FIGURA 13. Punto de ruptura de del(*GJB6-D13S1830*). Esta ruptura deleta el promotor y sus dos primeros exones, truncando con esto el marco de lectura abierto.

XII. DISCUSIÓN

La hipótesis de una herencia digénica de la sordera autosómica recesiva no sindrómica ha sido sustentada en diversas observaciones tales como que, tanto la conexina 26 como la conexina 30 se localizan en el mismo locus y ambas se expresan en las mismas estructuras del oído interno.

Además los conexones de la conexina 26 pueden unirse a los conexones compuestos de conexina 30 para formar canales tipo Gap heterotípicos.⁵²

La heterogeneidad de la sordera no sindrómica complica el diagnóstico dado que se han descrito un gran número de mutaciones en genes relacionados, además el diferente predominio de estas dependiendo de la población.

Mutaciones en el gen *GJB2* representa la principal causa de sordera autosómica recesiva no sindrómica⁵³. La mutación 35delG en el gen *GJB2* es la principal causa de sordera genética en caucásicos, ésta puede encontrarse en homocigotos o en heterocigotos compuestos (con otras mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB*).⁵⁴

La delección de 342 kb (*GJB6-D13S1830*) se ha identificado en un grupo de sujetos con sordera no sindrómica prelingual⁵¹. Esta es la segunda mutación mas frecuentemente encontrada como causa de este tipo de sordera en España⁵². También ha sido detectada en *trans* en cuatro de seis pacientes sordos heterocigotos para mutaciones en *GJB2* y en un caso homocigoto de sordera en Francia (Pallares-Ruiz *et al.* 2002).⁵⁵

Dependiendo de la población estudiada, sólo una mutación en *GJB2* ha sido identificada en un 50% de los individuos afectados sin localizar la segunda mutación. En EUA el 13.1% de los individuos afectados fueron heterocigotos para la mutación en *GJB2*.

La deleción que involucra al gen *GJB6* explica un poco mas de la mitad de esos casos en ciertas poblaciones europeas, pero entre los individuos con una sola mutación en *GJB2* en EUA la del(*GJB6-D13S1830*) representó sólo el 2.8%.⁵⁴

En un estudio llevado a cabo en Espíritu Santo Brasil en el 2010, cuyo objetivo fue conocer la prevalencia de 35delG/*GJB2* y del (*GJB6-D13S1830*), encontraron que la frecuencia en una muestra de 77 pacientes fue de 7.8% y 0.65% respectivamente.⁵⁶

El propósito el presente estudio fue determinar la presencia de alguna deleción en el gen *GJB6* como causa de sordera neurosensorial no sindrómica en pacientes con diagnóstico clínico y heterocigotos para mutaciones en el *GJB2*. En 39 pacientes analizados, la secuenciación de la región codificante del gen mostro seis pacientes heterocigotos para la mutación más frecuente que es 35delG, a los cuales se les realizó el análisis molecular en busca de del (*GJB6-D13S1830*). En comparación con estudios previos realizados en Brasil (3.03%) ($n = 33$), España (2.6%) ($n = 38$), en Venezuela ($n=40$) (2.5%)⁵³ en nuestra muestra obtuvimos un caso de seis con presencia de la deleción mas frecuentemente reportada ($n=6$) (16%). Sería conveniente buscar en más pacientes la presencia de esta deleción como causa de sordera neurosensorial no sindrómica.

Es interesante resaltar que en la mayoría de los estudios previos y en el nuestro, hay un alto porcentaje de pacientes heterocigotos con la mutación 35delG que aun permanecen sin explicación genética para su alteración audiológica.

Conviene mencionar que sería interesante investigar si la del (GJB6-D13S1830) tiene algún efecto regulatorio o inhibitorio sobre la expresión de GJB2 ya que se localiza en el mismo locus DFBN1 y cómo es que se están segregando dichas mutaciones

XIII. CONCLUSIONES

En nuestra población estudiada encontramos un caso con mutación en *GJB2/GJB6* en la misma frecuencia que en otros estudios hechos en Latinoamérica y con una frecuencia mayor que en estudios europeos.

Siendo que las sorderas genéticas son muy frecuentes y de origen heterogéneo, es importante continuar estudiando a los pacientes heterocigotos para mutaciones en GJB2 sin del (GJB6-D13S1830) para entender un poco más sobre el rol de las conexinas y la interacción entre los distintos genes implicados en la audición.

No hay que dejar de lado la importancia de incluir el análisis molecular del gen de la conexina 30 como parte de la evaluación de los pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica que nos permita ofrecer un mejor asesoramiento genético a las familias afectadas

XIV. REFERENCIAS

1. Cabanillas Farpón R, Cadiñanos Bañales J. Hipoacusias hereditarias: asesoramiento genético. Acta Otorrinolaringol Esp. 2011. doi: 10.1016/j.otorri.2011.02.006
2. Dra. Viviana Dalamón (ph.d.), Dra. Ana Belén Elgoyhen (ph.d.) Genetic Sensorineural Hearing Loss: up to date rev. Med. Clin. Condes 2009; 20(4) 408 - 417
3. Apps SA, Rankin WA, Kurmis AP (2007) Connexin26 mutations in autosomal recessive deafness disorders: A review. Int J Audiol 46: 75–81.
4. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Available from: URL: webhost.ua.ac.be/hhh/.
5. Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. Genet Med 2007; 9 (7): 393 -408
6. Iris Schrijver. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss. JMD 2004; 6, (4).
7. Thomas B. Friedman and Andrew J. Griffith. Human nonsyndromic sensorineural deafness. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003; 4:341-402.
8. Richard JH Smith, MD. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. GeneReviews December 2, 2008.
9. 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.
10. Stephanie A Moody Antonio, MD. Genetic Sensorineural Hearing Loss. Inner Ear, Jun 1, 2009.

11. Birkenhäger R, Aschendorff A, Schipper J, Laszig R. Nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Laryngorhinotologie*. 2007; 86(4):299-309.
12. Francoise 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).
13. Danielle R. Lenz, Karen B. Avraham. Hereditary hearing loss: From human mutation to mechanism. *Hearing Research* 281 (2011) 3e10.
14. 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.
15. Guillermina Castillo-Maya, Yolanda Peñaloza-López, Francisco Hernández-Orozco. Etiología de la hipoacusia-sordera. *Gac Méd Méx* 2001; 137(6).
16. Choung et al. Functional Study of *GJB2* in Hereditary Hearing Loss. *Laryngoscope* 112: September 2002.
17. Primignani et al. A New De Novo Missense Mutation in Connexin 26 in a Sporadic Case of Nonsyndromic Deafness. *Laryngoscope* 117: May 2007.
18. Richard JH Smith, MD. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNA3. *GeneReviews* April 30, 2009.
19. 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.
20. Amiel A. Dror and Karen B. Avraham Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology *Annu. Rev. Genet.* 2009. 43:411–37

21. 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.
22. Guy P. Richardson, Jacques Boutet de Monvel, and Christine Petit, How the Genetics of Deafness Illuminates Auditory Physiology *Annu. Rev. Physiol.* 2011. 73:311–34
23. 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.
24. Leonardo Ordóñez, Alejandra Correa, Jorge Almario, José G. Lora, José Alberto Prieto. Sordera No Sindrómica. *Acta Colombiana de Otorrinolaringología* 2003; 31(3).
25. Oana Vele & Iris Schrijver. Inherited hearing loss: molecular genetics and diagnostic testing *Expert Opin. Med. Diagn.* (2008) 2(3):231-248
26. Francesco Zonta, Guido Polles, Giuseppe Zanotti, Fabio Mammano. Permeation Pathway of Homomeric Connexin 26 and Connexin 30 Channels Investigated by Molecular Dynamics *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, ISSN 0739-1102 Volume 29, Issue Number 5, (2012)
27. 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.
28. 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.
29. Wei Liu, Marja bostrom, Andres Kinnefors, Helge Rask-Andersen. Unique expression of connexins in the human cochlea. *Hearing Research* 2009; 250:55-62.

30. 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.

31. The connexin-deafness homepage. July 2009.
<http://davinci.crg.es/deafness>

32. 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.

33. Keyko Kawaguchi P. Hipoacusia de causa genética *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 2005; 65:39-44.

34. 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.

35. 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.

36. 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.

37. 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.

38. 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.
39. Nathalie Pallares-Ruiz¹, Patricia Blanchet², Michel Mondain³, Mireille Claustres and Anne-Francoise Roux A large deletion including most of *GJB6* in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *European Journal of Human Genetics* (2002) 10, 72-76
40. Christy B. Erbe; Kevin C. Harris, MD; Christina L. Runge-Samuels, PhD. Connexin 26 and Connexin 30 Mutations in Children with Nonsyndromic Hearing Loss. *Laryngoscope* 114: April 2004.
41. Zippora Brownstein, Karen B. Avraham. Deafness Genes in Israel: Implications for Diagnostics in the Clinic. *Pediatric Research* March 13, 2009.
42. Ana Carla Batisso, 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.
43. 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.
44. 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.
45. Virginia W Norris, Kathleen S Arnos, Wendy D Hanks, 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.

46. 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.

47. 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.

48. Ignacio del Castillo, Manuela Villamar, Miguel A. Moreno Pelayo, Francisco J. del Castillo, Araceli Álvarez, Dolores Telleria. A Deletion Involving the Connexin 30 Gene in Nonsyndromic Hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346: 4.

49. 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.

50. Cynthia C. Morton Ph.D and Walter E. Nance M.D. Newborn Hearing Screening A Silent Revolution. *N Engl J Med* 2006;354:20.

51. del Castillo IV, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F (2002) A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346:243–249.

52. F. J. del Castillo, M Rodríguez Ballesteros, A Álvarez 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.

53. René Utrera, Vanessa Ridaura, Yuryanni Rodríguez, Maria J. Rojas, Leomig Mago, Simón Angeli And Oswaldo Henríquez. Detection of the 35delG/*GJB2* and del(*GJB6-D13S1830*) Mutations in Venezuelan Patients with Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss *GENETIC TESTING* Volume 11, Number 4, 2007

54. Juan Rodriguez-Paris, Iris Schrijver. The digenic hypothesis unraveled: The GJB6 del(GJB6-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389 (2009) 354–359

55. Padma G., Ramchander P. V., Nandur U. V. and Padma T. 2009 *GJB2* and *GJB6* gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment. *J. Genet.* 88, 267–272.

56. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva 1, Andressa Barbosa 2, Marília Santiago 3, Mariana Proveti 4, Eliete Rabbi- Bortolini Prevalence of 35delG/GJB2 and del (GJB6-D13S1830) mutations in patients with non-syndromic deafness from a population of Espírito Santo - Brazil *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010; 76(4):428-32.