

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE MEDICINA
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE
 ONCE PACIENTES CON SORDERA CONGÉNITA
 NO SINDRÓMICA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE
 MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. PAOLA MENDELSBERG FISHBEIN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

ASESOR DE TESIS:

DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO

DRA. CANDY SUE MÁRQUEZ ÁVILA



Paola Fishbein

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

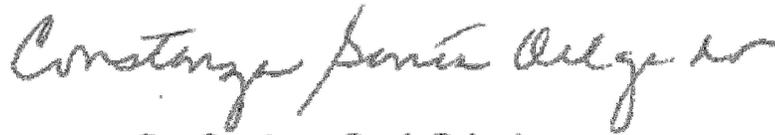
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Directora de Tesis:

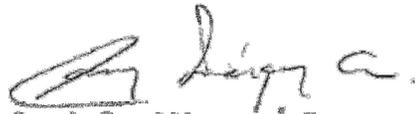

Dra. Verónica Fabiela Morán Barrozo

Profesor Titular de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Asesores de Tesis:



Dra. Constanza García Delgado
Profesor Adjunto de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. Candy Sue Márquez Ávila
Jefe del Departamento de Audiología y Foniatría
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Agradecimientos:

A la Dra. Verónica Morán y a la Dra. Constanza García Delgado por todo su apoyo para la realización de ésta tesis y por todas sus enseñanzas que me han ayudado a formarme como persona y médico genetista.

Al Dr. Francisco Flores por todas sus enseñanzas y apoyo.

A la Dra. Candy Sue Márquez Ávila y a todo el personal del departamento de Audiología y Foniatría del HIMFG por su apoyo para realizar esta tesis.

A la Bióloga Adriana Sánchez Boiso por todas sus enseñanzas para realizar esta tesis.

A todos mis compañeros por caminar conmigo este camino siempre con una sonrisa.

A todos los que amo por su incondicional apoyo.

Resumen

Antecedentes: La sordera congénita es un importante problema de salud. En nuestro país, 2 de cada cien recién nacidos la presentan. Su diagnóstico oportuno mediante el tamiz auditivo neonatal es de vital importancia para el pronóstico funcional de estos pacientes. Aproximadamente el 70% de las sorderas congénitas son de origen genético con herencia autosómica recesiva; el 50% de estos casos se asocia a mutaciones en el gen *GJB2*, que codifica la proteína conexina 26. Por lo anterior, se planteó la siguiente **Pregunta de investigación:** ¿Cuáles serán los cambios en el gen *GJB2* en pacientes del HIMFG con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica? **Justificación:** La sordera es uno de los principales problemas al nacimiento y de discapacidad auditiva entre la población infantil y se puede diagnosticar desde el nacimiento con el tamiz auditivo neonatal. No hay ningún estudio publicado que demuestre la prevalencia de mutaciones en el gen que codifica para la Conexina 26 en pacientes mexicanos. Conocer la presencia de estas mutaciones permitirá un asesoramiento genético clínico y molecular a las familias de los pacientes. Aportaremos conocimiento nuevo sobre las mutaciones presentes en población mexicana. **Objetivo General:** Describir las alteraciones moleculares en el gen *GJB2*, en 11 pacientes con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. **Material y Métodos:** El presente es un estudio de tipo transversal y descriptivo. Se revisaron los expedientes y pacientes con diagnóstico de sordera en el HIMFG, se invitó a pacientes con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica a participar en el estudio. Aquellos pacientes a incluir en el estudio se les tomó, previo consentimiento informado, 1 ml de sangre periférica, para realizar el estudio por medio de PCR RFLP y secuenciación, para identificar las tres mutaciones reportadas como las más frecuentes en el gen *GJB2*. **Resultados:** en los 11 pacientes analizados se descartaron las mutaciones c.167delT y c.235delC, en 1 paciente se encontró la mutación c.35delG en estado homocigoto, en 1 paciente se encontró un cambio que no ha sido reportado previamente que correspondió a una inserción de una guanina en el codón 12 en estado heterocigoto; en otro paciente se encontró un cambio previamente reportado una transversión c.34G>T de forma heterocigota, del cual no se ha confirmado su efecto y finalmente se encontró el polimorfismo V27I en 2 pacientes de forma heterocigota. **Discusión:** De las tres mutaciones reportadas como las más frecuentes, únicamente se detectó la 35delG en un paciente de forma homocigota lo cual corresponde con lo reportado para otras poblaciones en la literatura. **Conclusión.** Se evidenció la importancia del programa de tamizaje auditivo neonatal así como el estudio clínico y molecular de sordera congénita en los pacientes estudiados lo cual tiene una gran importancia en el manejo integral de los pacientes, incluyendo el asesoramiento genético.

Índice

I. Antecedentes	7
II. Marco teórico	8
II.1. Definición y clasificación de la sordera	8
II.2. Frecuencia	9
II.3. Etiología	9
II.4. Bases anatomofisiológicas de la audición	13
II.4.a. La vía auditiva	13
II.4.b. Embriología	14
II.5. Diagnóstico oportuno de la sordera congénita	16
II.6. Bases moleculares de la DFNB1	18
II.6.a. Gen <i>GJB2</i>	19
II.6.b. Proteína conexina 26	20
II.6.c. Mutaciones reportadas en el gen <i>GJB2</i>	23
III. Planteamiento del problema	26
IV. Pregunta de investigación	26
V. Justificación	26
VI. Objetivos	27
VI.1. Objetivo general	27
VI.2. Objetivos específicos	27
VII. Material y métodos	28
VII.1. Diseño del estudio	28
VII.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	28
VII.3. Tamaño de la muestra	29
VII.4. Análisis molecular	30
VIII. Resultados	36
VIII.1. Características clínicas	36
VIII.1.a. Pacientes incluidos en el estudio	37
VIII.1.b. Características clínicas, sociodemográficas y antecedentes heredofamiliares	39

VIII.2. Resultados del estudio molecular	40
VIII.2.a. Amplificación de los fragmentos de interés por PCR	40
VIII.2.b. Análisis mutacional por RFLP's	41
Mutación c.167delT	41
Mutación c.235delC	41
VIII.2.c. Análisis mutacional por secuenciación	43
Mutación c.35delG	43
VIII.2.d. Otras mutaciones detectadas	46
IX. Discusión	55
IX.1. Datos sociodemográficos	55
IX.2. Datos clínicos	55
IX.3. Análisis molecular	56
IX.4 Análisis de casos particulares	59
X. Conclusiones	63
XI. Bibliografía	61
Anexos	68
Anexo 1: Carta de consentimiento informado	68
Anexo 2: Extracción de DNA	72
Anexo 3: Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	73
Anexo 4: Reacción de secuenciación	75
Anexo 5: Reacción de restricción	76

I. Antecedentes

La sordera congénita es una de las principales causas de discapacidad, tiene una incidencia de aproximadamente de 1 a 3 por cada mil nacimientos (Karl R., 2004), siendo el defecto al nacimiento más frecuente en países industrializados (Hilgert N., 2009). La identificación de la pérdida auditiva durante los primeros meses de vida es de suma importancia ya que los niños que son identificados a tiempo y a quienes se les da un tratamiento oportuno tienen mejor desarrollo de habilidades cognitivas, de lenguaje y sociales (Karl R., 2004). Es por esta razón que en México se implementó el programa de “Tamiz auditivo neonatal e intervención temprana 2007-2012” que incluye estrategias para la detección oportuna de la sordera en todas las instituciones de la Secretaría de Salud (CONADIS).

Aproximadamente dos terceras partes de los casos de sordera congénita tienen un origen genético y de estos, el 70% se clasifican como sorderas no sindrómicas (es decir, la sordera es aislada), el 30% restante corresponden a casos de sordera sindrómica (Tsukada K., 2010; Nejat M., 2009). Hasta la mitad de los casos de sordera congénita no sindrómica son causados por mutaciones en el locus DFNB1 (OMIM220290) localizado en 13q11-q12 que incluye a los genes *GJB2* y *GJB6* que codifican para las conexinas 26 y 30 respectivamente. Estas proteínas forman uniones de hendidura o *gap junctions*; en el 98% de estos casos las mutaciones se encuentran en el gen *GJB2* (Welch K., 2007).

A la fecha se han identificado más de 100 mutaciones y polimorfismos en el gen *GJB2* incluyendo tanto mutaciones dominantes y recesivas, como polimorfismos. Se han identificado tres mutaciones autosómicas recesivas como las más frecuentes: 35delG en población caucásica y latinoamericana, c.167delT en judíos Ashkenazis y c.235delC en poblaciones asiáticas (Tsukada K., 2010; Nejat M., 2009).

En el año 2002 el *American College of Human Genetics* publicó guías para el abordaje diagnóstico y terapéutico de las sorderas congénitas, en éstas se incluye la búsqueda de mutaciones en el gen *GJB2* como parte de la valoración etiológica y manejo multidisciplinario de los pacientes (Genet Med, 2002).

II. Marco Teórico:

II.1 Definición y Clasificación de la sordera:

La sordera se define como el déficit funcional que ocurre cuando un sujeto pierde capacidad auditiva en mayor o menor grado. Se puede clasificar de forma cuantitativa, según su topografía y su momento de aparición como se describe a continuación (*Joint committee on infant hearing, 2007*):

- Clasificación cuantitativa:
 - Leve: pérdidas de 21 a 40 decibelios (dB).
 - Moderada: pérdidas de 41 a 70 dB.
 - Severa: pérdidas de 71 a 90 dB.
 - Profunda: pérdidas mayores de 90 dB.

- Clasificación topográfica:
 - Hipoacusias de conducción: la lesión se localiza en el oído externo o medio.
 - Hipoacusias de percepción o neurosensorial: la lesión se localiza en el oído interno, el nervio auditivo o bien en la corteza cerebral.
 - Mixtas: cuando la sordera es originada por varias lesiones coexistentes, que afectan al mismo tiempo al oído medio y la cóclea, vías y centros.

- Clasificación según su momento de aparición:
 - Hipoacusias prelocutivas: la lesión se produjo con anterioridad a la adquisición del lenguaje (de cero a dos años).
 - Hipoacusias perlocutivas: la pérdida se originó durante el aprendizaje del lenguaje (de dos a cinco años).
 - Hipoacusias postlocutivas: cuando la pérdida auditiva sobrevino después de la estructuración del lenguaje (mayores de cinco años).

II.2 Frecuencia:

La sordera congénita es un problema importante de salud pública, y aunque no se tienen datos precisos de su incidencia (García-Pedroza F., 2003), diversos estudios indican que en México alrededor de 2 a 3 de cada 100 niños nacen con hipoacusia (Poblano A., 2009; CONADIS).

II.3 Etiología:

La etiología de la sordera congénita es compleja, ya que alrededor de una tercera parte tienen una etiología ambiental, y las dos terceras partes restantes tienen una etiología genética, pero incluso en estos casos la etiología es heterogénea ya que hasta el 70% de los casos corresponden a sorderas congénitas no sindrómicas y el 30% restante a sorderas sindrómicas (Nejat M., 2009) (Figura 1).

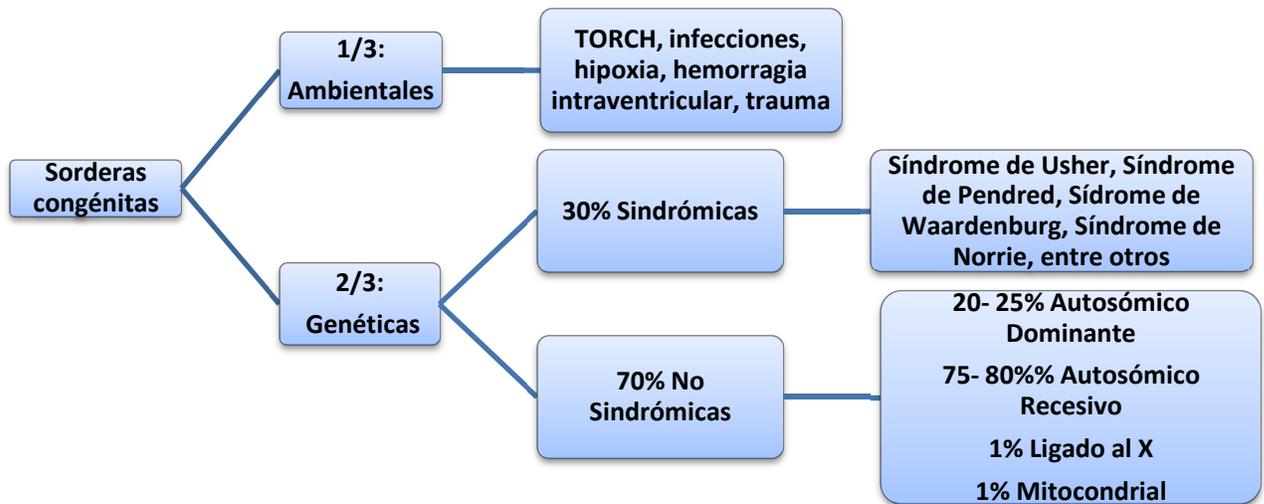


Figura 1. Clasificación etiológica de las sorderas congénitas.

Dentro de las causas ambientales de la sordera congénita están las infecciones intrauterinas, en particular por el complejo TORCH, factores adversos al nacimiento como son un Apgar bajo no recuperado, hipoxia neonatal, trauma obstétrico, etc.

A partir de una consideración clínica, se han identificado más de 400 síndromes genéticos que cursan con sordera, dentro de estos los más importantes (por su alta frecuencia y su impacto clínico) son:

- Síndrome de Waardenburg: Enfermedad autosómica dominante caracterizada por alteraciones del pigmento de cabello e iris y sordera neurosensorial. Existen 4 tipos de síndrome de Waardenburg: El tipo 1 (OMIM 193500) caracterizado por la presencia de distopia cantorum, el tipo 2 (OMIM 193510) que se diferencia del tipo 1 por la ausencia de distopia cantorum, el tipo 3 (OMIM 148820) que cursa con alteraciones en miembros superiores y el tipo 4 (OMIM 277580) caracterizado por cursar con enfermedad de Hirschprung (Pingault V., 2010).
- Síndrome de Usher: Enfermedad autosómica recesiva que cursa con sordera congénita profunda, disfunción vestibular en algunos tipos y retinitis pigmentosa de inicio temprano; hay tres tipos de síndrome de Usher, el tipo 1 (OMIM 276900) se caracteriza por sordera profunda con disfunción vestibular, el tipo 2 (OMIM 276901) que a diferencia del anterior tiene una función vestibular conservada, y el tipo 3 (OMIM 276902) en el que los pacientes tienen hipoacusia pero ésta es progresiva.
- Síndrome de Pendred: (OMIM 274600) Enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la presencia de sordera dada por una malformación de la cóclea, en la mayoría de los casos con malformación de Mondini; acompañado de bocio generalmente eutiroideo (Kontorinis G., 2011).
- Síndrome Branquiotorenal: (OMIM 113650) Enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por la presencia de malformaciones de oído externo, medio o interno con hipoacusia que puede ser conductiva, neurosensorial o mixta, fisuras o quistes branquiales y malformaciones renales (Hoskins BE., 2007).
- Síndrome de Jervell y Lange- Nielsen: (OMIM 220400) Enfermedad autosómica recesiva que cursa con sordera congénita y aumento del

intervalo QT que causa síncope y alto riesgo de muerte espontánea (Winbo A., 2012).

- Síndrome de Alport: Esta enfermedad tiene heterogeneidad genética y tiene patrones de herencia ligado al X (OMIM 301050), autosómico recesivo (OMIM 203780) y autosómico dominante; se caracteriza por un síndrome nefrítico que evoluciona a falla renal terminal, hipoacusia progresiva (nunca es congénita), y alteraciones oculares principalmente lenticono anterior.
- Mitocondriopatías: Varios síndromes mitocondriales como MELAS (OMIM 540000), MERFF (OMIM 545000) y NARP (OMIM 551500) pueden cursar con sordera progresiva de gravedad variable. En particular la mutación A3243G en el DNA mitocondrial causa diabetes mellitus con sordera progresiva (OMIM 520000).

En relación a sus bases moleculares, la sordera congénita no sindrómica es una enfermedad con heterogeneidad genética ya que se han identificado más de 100 genes distintos en relación a su etiología. El patrón de herencia más frecuentemente identificado, ya que se presenta en más del 75% de los casos es el autosómico recesivo (referido como DFNB), seguido por el autosómico dominante (DFNA), ligados al X (DFNX) y mitocondriales. En éstos la nomenclatura utilizada es DFN por *deafness*, la A se refiere a autosómico dominante, la B a autosómico recesivo y la X a ligado al cromosoma X; finalmente, el número con que se designa enseguida corresponde al orden en el que se mapeó el gen causante de la sordera (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las sorderas congénitas no sindrómicas.

Enfermedad	Gen	Locus	Fenotipo
Autosómicas recesivas			
DFNB1	<i>GJB2/ GJB6</i>	13q11-q12	Sordera de inicio generalmente prelingual y no progresiva. Mutaciones en estos genes también causan la DFNA3
DFNB2	<i>MYO7A</i>	11q13.5	Sordera pre o post lingual. Mutaciones en este mismo gen causan DFNA11 y Síndrome de Usher tipo 1B
DFNB3	<i>MYO15A</i>	17p11.2	Sordera profunda, no progresiva
DFNB7	<i>TMC1</i>	9q21-13	Sordera profunda, no progresiva. Ya que la DFNB11 es causada por mutaciones en el mismo gen, actualmente se considera que corresponde a la misma enfermedad
Autosómicas Dominantes			
DFNA1	<i>DIAPH1</i>	5q31.3	Sordera moderada, progresiva
DFNA2A	<i>KCNQ4</i>	1p34.2	Sordera post lingual para frecuencias altas, progresiva
DFNA2B	<i>GJB3</i>	1p34.3	Sordera post lingual para frecuencias altas, progresiva
DFNA3	<i>GJB2/ GJB6</i>	13q11-q12	Sordera pre lingual, progresiva. Mutaciones en estos genes también causan la DFNB1
Ligadas al X			
DFNX1	<i>PRPS1</i>	Xq22.3	En varones sordera congénita profunda. En mujeres sordera moderada para frecuencias altas
DFNX2	<i>POU3F4</i>	Xq21.1	Sordera mixta con el estribo fijo, dilatación anormal de canal acústico interno con una comunicación anormal entre el canal acústico interno y el oído interno

Tabla 1. Ejemplos de la clasificación de la sordera congénita no sindrómica.

II.4 Bases anatomofisiológicas de la audición

II.4.a La Vía Auditiva:

La vía auditiva comprende desde el oído externo hasta la corteza auditiva del cerebro.

Se divide en oído externo (pabellón, conducto auditivo externo y capa externa de la membrana timpánica), oído medio (huesecillos, cavidad timpánica, trompa de Eustaquio, musculatura del oído medio y cara interna de la membrana timpánica), y oído interno (aparato sensitivo primario, cóclea y aparato vestibular) (Moore K., 2000).

La cóclea se encuentra en el oído interno, este es el órgano en el que se afecta la vía auditiva en las sorderas congénitas no sindrómicas y está conformada por tres canales recubiertos de células ciliares, encargadas de transformar las vibraciones del sonido en impulsos nerviosos. Consta de tres tubos enrollados, unidos por sus lados: la rama vestibular, la rama media y la rama timpánica; las rampas timpánica y media esta divididas por la membrana basilar, en la que se localiza el órgano de Corti, en la que se encuentran las células ciliadas que son terminaciones receptoras que generan impulsos nerviosos ante las vibraciones sonoras (Guyton A., 2001).

El sistema auditivo retrococlear comprende desde la salida del nervio auditivo, los diferentes núcleos en el tallo cerebral, los arribos mesencefálicos, la corteza auditiva y la vía eferente.

El análisis final de los estímulos sonoros va a tener lugar en determinadas zonas de la corteza del lóbulo temporal. Las áreas auditivas principales son: 41, 42, 22 y 21 de Brodman. En la corteza auditiva se distinguen dos tipos de regiones funcionales principales: el área auditiva primaria (A-I) o Koniocórtex, esta se corresponde con el área 41 de Brodman y está situada en las circunvoluciones temporales transversas de Heschl del labio inferior de la cisura de Silvio. En ella existe una representación minuciosa de la cóclea ordenada tonotópicamente, situándose los agudos en la parte más externa y los graves en la más interna. Recibe proyecciones directas de región ventral del cuerpo geniculado medial. Cada área 41 recibe información de ambos oídos. Desde aquí se envían fibras hacia áreas auditivas de mayor categoría funcional.

La corteza auditiva primaria está directamente relacionada con la recepción del mensaje auditivo preciso, del análisis frecuencial y produce sensaciones auditivas elementales como zumbidos, ruidos, sensaciones fonémicas. La otra región es el área auditiva secundaria (A-II) o parakoniocórtex (gnósticas) esta se corresponde con las áreas 42, 22 y 21 de Brodman de las circunvoluciones temporales, superior y media. Sobre ellas se proyectan neuronas de NGM dorsal y axones del área primaria. Así tienen lugar las percepciones auditivas, la identificación y relación de los sonidos con los objetos que los producen e imaginar los sonidos aprendidos, recordarlos aunque no los oigamos en ese momento (Guyton A., 2001).

II.4.b Embriología del oído:

El oído proviene de dos orígenes embriológicos, el oído interno surge a partir de una placoda ectodérmica y el oído medio y externo surgen a partir del segundo arco branquial, de la primera hendidura branquial y de la bolsa faríngea (Carlson B., 2000).

El desarrollo del oído comienza con la formación de la placoda ótica de ectodermo superficial a nivel del rombencefalo. Al final de la cuarta semana de gestación, la placoda se invagina por acción de FGF3 para formar la vesícula ótica; esta vesícula se alarga y forma una región dorsal vestibular y una región ventral coclear, para esta diferenciación es importante la expresión de *PAX2*. Alrededor de la quinta semana de gestación surgen dos crestas de la porción vestibular, de las cuales se da la formación de los canales semicirculares, las células de estas porciones expresan el gen *NKX5-1* (Fritzsich B., 2008).

La formación del oído medio se da junto con el desarrollo de los dos primeros arcos branquiales. La cavidad del oído medio y la trompa auditiva (trompa de Eustaquio) proceden de la primera bolsa faríngea.

Los huesecillos auditivos tienen un origen doble, el martillo y el yunque proceden del mesodermo del primer arco branquial, y el estribo proviene del mesodermo del segundo arco. El músculo tensor del tímpano también proviene del mesodermo del primer arco y el músculo estapedio del segundo arco.

El oído externo surge de seis pequeños nódulos de tejido mesenquimatoso de los dos primeros arcos branquiales que flanquean la primera hendidura faríngea. El meato acústico externo se desarrolla del extremo dorsal de la primera hendidura faríngea. Las células ectodérmicas proliferan en forma de embudo y constituyen una placa epitelial sólida que se llama tapón meatal. Posteriormente, en el periodo

fetal, las células centrales de este tapón se degeneran, lo que forma una cavidad que se constituye en la parte interna del meato ó conducto auditivo externo (Carlson B., 2000).

Las neuronas sensoriales del VIII par craneal proceden de células de la pared interna de la vesícula ótica, la generación de precursores neuroblásticos sensoriales depende de la vía de *NOTCH*. Este desarrollo sensorineural del oído requiere de una regulación espacial y temporal muy precisa; se han propuesto muchos genes candidatos que pueden estar jugando un papel muy importante en este desarrollo; se sabe que la reducción de la expresión de *FGF10* que a su vez causa un cambio en la expresión de *TBX1* es esencial para la invaginación de la placoda ótica y la formación de los neuroblastos de esa zona (Fritsch B., 2008).

II.5 Diagnóstico oportuno de la sordera congénita

Como ya se mencionó, durante la infancia, la pérdida auditiva profunda tiene consecuencias que afectan de manera importante al niño, su desarrollo y a sus familias. El efecto más importante que conlleva una hipoacusia profunda es la ausencia de desarrollo de lenguaje oral; lo cual implica dificultad en su comunicación día a día, restringe su adquisición de la lectura y la escritura comprometiendo de manera importante su educación y preparación profesional a la larga, además de los problemas psico-sociales a los que los niños con sordera se enfrentan. Es por esto la gran importancia de la detección oportuna y rehabilitación de la hipoacusia desde edades tempranas. Para realizar esto existe el programa universal de tamiz auditivo neonatal.

Éste se realiza en las primeras semanas de vida, usualmente se lleva a cabo antes de que el recién nacido sea dado de alta del hospital, aunque se puede realizar hasta los 3 meses de edad. Consiste en realizar el estudio con Emisiones Otoacústicas Transientes (EOA). Usualmente se realiza con el paciente dormido y toma unos minutos. Si el estudio se aprueba, se da de alta con seguimiento normal por pediatría. Si el estudio sale afectado, se repite el mismo en un periodo de 15 días. Si pasa el estudio de manera adecuada en 6 meses se realizan Potenciales Evocados Auditivos de Tallo Cerebral (PEATC) para corroborar audición normal y se da de alta posteriormente. Si en una segunda ocasión el paciente no pasa el estudio se refiere a una unidad de Audiología donde se realizan como parte del protocolo unos PEATC. Si los PEATC son compatibles con hipoacusia se inicia el tratamiento y rehabilitación del paciente. Si son compatibles con audición normal, se repiten en 6 meses y si en este segundo estudio hay audición normal, se da de alta al paciente (*Joint committee on infant hearing, 2007*) (Figura 2).



Figura 2. Abordaje diagnóstico de las sorderas. EOA: emisiones otoacústicas, PEA: Potenciales evocados auditivos. Modificado de *Joint committee on infant hearing*, 2007.

II.6 Bases moleculares de la DFNB1

Diferentes estudios en Europa, Asia, Estados Unidos y Sudamérica demuestran que hasta el 50% de los casos de sordera congénita no sindrómica se dan por mutaciones en el locus DFNB1 (OMIM: 220290) en 13q11-q12. En esta región se encuentran dos genes: *GJB2* que codifica para la conexina 26 y es el que se encuentra mutado en el 98% de los casos de DFNB1 y *GJB6* que codifica para la conexina 30 y causa el 2% restante (Usami S., 2010).

II.6.a Gen *GJB2*

Mutaciones en el gen *GJB2* se asocian a sorderas congénitas sindrómicas y no sindrómicas, siendo mucho más frecuentes las no sindrómicas. En el caso de las sorderas sindrómicas se suelen asociar a alteraciones cutáneas, dentro de las entidades sindrómicas causadas por mutaciones en este gen se encuentran:

- Síndrome de Bart-Pumphrey (OMIM 149200): caracterizado por almohadillas en nudillos, leuconiquia y sordera congénita y en algunos casos se desarrolla queratosis palmo –plantar (Richard 2004).
- Síndrome ictiosis “*Hystrix-like*” con sordera (OMIM 602540): sordera neurosensorial congénita con alteraciones dérmicas características que inician con eritroderma y evoluciona a pápulas hiperqueratóticas diseminadas (van Geel 2002).
- Síndrome queratitis- ictiosis-sordera (KID por sus siglas en inglés) (OMIM148210): que cursa con sordera congénita profunda, queratitis y eritroqueratoderma progresivo; estos individuos tienen un riesgo incrementado de cáncer de células escamosas en la piel (van Geel X., 2002).
- Querato-dermo-palmo-plantar con sordera (OMIM148350): sordera progresiva con queratitis limitada a palmas y plantas.
- Síndrome Vohwinkel (OMIM 124500): sordera moderada con queratoderma mutilante, la hiperqueratosis circunferencial puede ocasionar la amputación de dedos.

Los casos de sordera no sindrómicos por mutaciones en este gen tienen un patrón de herencia autosómico recesivo en la gran mayoría de los casos (DFNB2) y autosómico dominante (DFNA3) en algunos casos (Welch K., 2007).

El gen *GJB2* tiene una longitud de 2250 pares de bases (pb); está formado por dos exones, al igual que la mayoría de los genes de la familia de proteínas de uniones de hendidura o brecha (*gap junction*). Sólo el segundo exón es codificante y su marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) está conformado por 681 nucleótidos que codifican para una proteína de 226 aminoácidos (Wu B., 2003) (Figura 3).

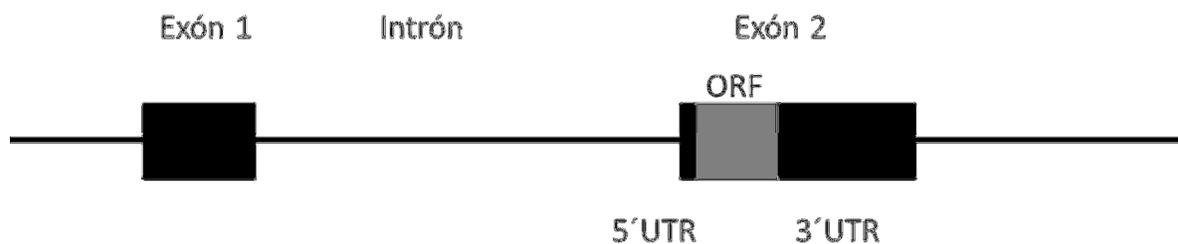


Figura 3. Esquema de la estructura del gen *GJB2*, en la que se observan los dos exones, en negro se muestran las porciones no codificantes, en el exón dos marcado en color gris esta la región codificante. Modificado de www.ensembl.org

II.6.b Proteína conexina 26

Como se dijo anteriormente, el gen *GJB2* codifica para la proteína conexina 26. Las conexinas son proteínas que se unen en un hexámero para formar el conexón que tiene una posición transmembranal, al unirse dos conexones de dos células contiguas forman un canal intracelular, dejando únicamente un espacio de aproximadamente 2nm (Figura 4), y es por esto que llevan el nombre uniones de hendidura o *gap junctions* (Goodenough D., 2009). Cada conexina está formada por cuatro dominios hélice alfa transmembranales, dos asas extracelulares, un asa citoplasmática, un dominio amino terminal y uno carboxilo terminal citoplasmáticos (Pfenniger A., 2011). En el genoma humano se han identificado 21 genes que codifican para conexinas, cada conexina se denomina según su peso en kilodaltones. En muchos tipos celulares se sintetizan varias formas de conexinas y éstas pueden conformar los hexámeros de proteínas ya sea entre el mismo tipo de conexinas (conexón homomérico), o entre distintos tipos de conexinas (conexón heteromérico), si bien no cualquier combinación es posible (Goodenough D., 2009).

Así mismo los conexones se pueden unir a un conexón de la célula contigua que sea idéntico para formar un canal intercelular homotípico, o se puede unir a uno que esté conformado por distintas conexinas y formar un canal heterotípico (Goodenough D., 2009).

Esta situación es importante ya que las características particulares de las conexinas que forman a cada poro le confiere las diferentes propiedades fisiológicas (Pfenniger A., 2011). En algunas células el conexón no se une a otro funcionando como un hemicanal, lo que es importante para las vías de señalización transmembrana, o como ya se mencionó, puede unirse a un conexón contiguo para formar las uniones de hendidura; estas uniones intercelulares permiten el paso de iones entre las células, fenómeno de especial importancia en la células que son excitables eléctricamente (Pfenniger A., 2011).

Otras de sus funciones son que al permitir el paso de iones facilita a su vez que grupos celulares compartan las demandas metabólicas o que el paso a través de ellos de moléculas de señalización genera gradientes de estos mensajeros en los tejidos (Pfenniger A., 2011).

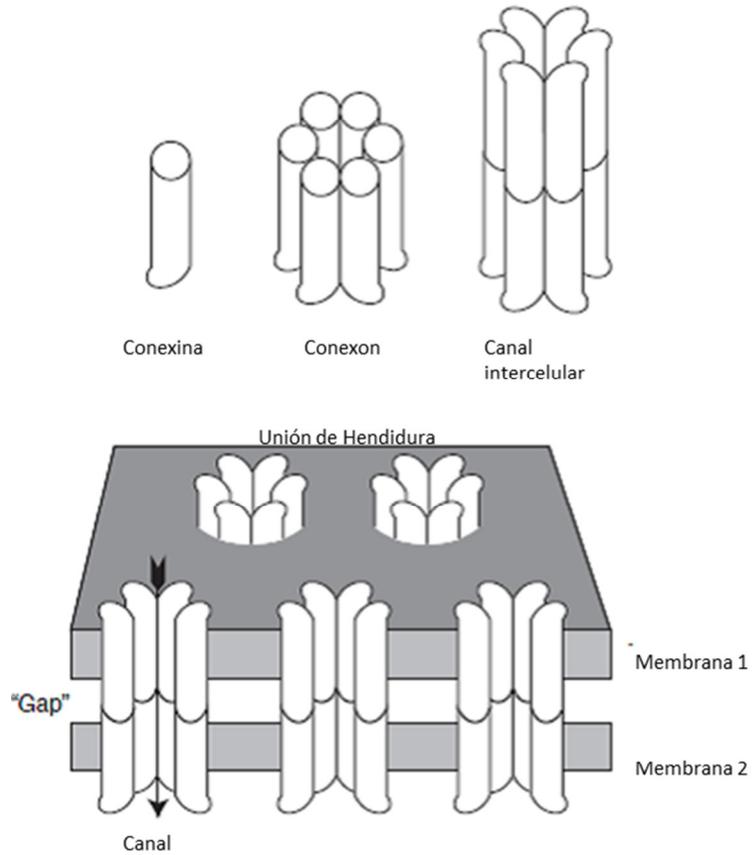


Figura 4. Las conexinas se unen en un hexámero para formar un conexón, éstos pueden formar un hemicanal, o unirse a un hemicanal de una célula adyacente, dejando un pequeño espacio entre ellas para formar la conexina. Modificado de Goodenough D., 2009.

El poro que forma la conexina 26 se caracteriza por tener un “tapón” o compuerta. Para la formación de este cierre la porción amino terminal de la proteína se pliega hacia la boca del canal para así formar el tapón, esta porción amino terminal le da la característica de compuerta dependiente de voltaje a la conexina 26 (Maeda S., 2009).

La conexina 26 tiene dos dominios extracelulares llamados E1 y E2, cuatro dominios transmembrana (M1 a M4), y tres dominios citoplasmáticos (C1 a C3) (Maeda S., 2009) (Figura 5).

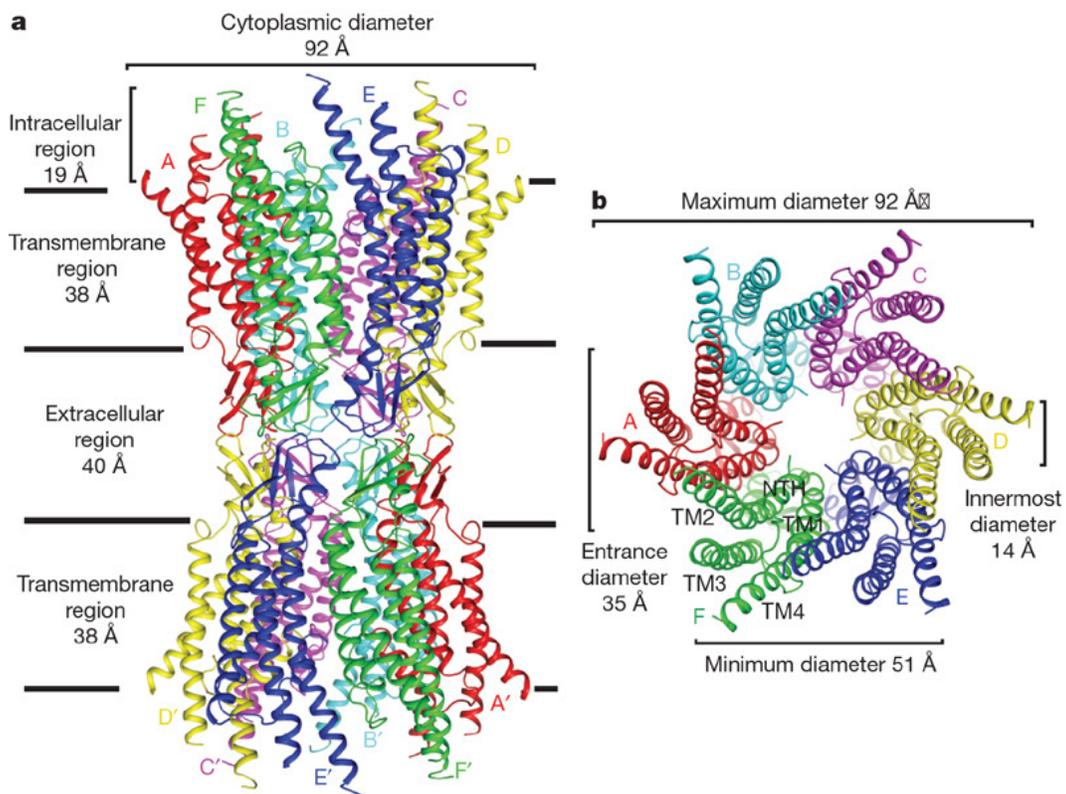


Figura 5. Estructura del canal de hendidura formado por la conexina 26. Tomado de Maeda S., 2009.

II.6.c Mutaciones reportadas en el gen *GJB2*

Hasta la fecha se han identificado más de 100 mutaciones y polimorfismos en el gen *GJB2*. La gran mayoría de estas mutaciones causan sordera congénita no sindrómica con un patrón de herencia autosómico recesivo. Interesantemente, aproximadamente 19 mutaciones están relacionadas a sordera congénita no sindrómica con herencia autosómica dominante (Welch K., 2007); además hay mutaciones relacionadas con sorderas sindrómicas.

Se han identificado tres mutaciones autosómicas recesivas como las más frecuentes: c.35delG en población caucásica, c.167delT en judíos Ashkenazi, y c.235delC en poblaciones asiáticas (Tsukada K., 2010; Nejat M., 2009).

La mutación más frecuentemente reportada es la c.35delG, esta mutación resulta en un cambio en el marco de lectura y la formación de un codón de alto prematuro en el aminoácido 13. Esta mutación podría corresponder hasta 70% de los alelos mutantes relacionados con el gen *GJB2* (Denoyelle F., 2007).

La frecuencia de portador de esta mutación se ha estimado en diferentes poblaciones, así en el estudio de Lucotte y Diéterlen (2005) realizado en 27 poblaciones europeas se determinó que la frecuencia aproximada de portadores es de 1 de cada 88 individuos en Europa central y 1 de cada 63 en el norte de Europa y la frecuencia de portador en países del sur de Europa es de 1/31. Resulta interesante que en este último ejemplo, la frecuencia de portadores de la mutación para *GJB2* es incluso más alta que la frecuencia de portadores del alelo p.delF508 del gen *CFTR* de la fibrosis quística en esa misma región (Lucotte G., 2001).

Se han realizado varios estudios en otras poblaciones para determinar la frecuencia de portadores de esta mutación encontrándose que varía de forma importante entre diferentes poblaciones. Se ha demostrado, por ejemplo, que la mutación más frecuente en judíos Ashkenazis es la c.167delT (Morle L., 2000) mientras que en asiáticos es la c.235delC (Tsudaka K., 2010). Las mutaciones más frecuentes de este gen reportadas en la literatura se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Mutaciones del gen GJB2 y su efecto en la proteína

Mutación	Cambio en la proteína
c.109G>A	p.Val37Ile
c.35delG	p.Gly12ValfsX1
c.56G>C	p.Ser19Thr
c.167delT	p.Leu56ArgfsX26
c.235delC	p.Leu79CysfsX3
c.231G>A	p.Trp77Arg
c.269T>C	p.Leu90Pro
c.339T>G	p.Ser113Arg
c.358_360delGAG	p.Glu120del
c.427C>T	p.Arg143Trp
c.487A>G	p.Met163Val
c.551G>C	p.Arg184Pro

Tabla 2. Se enlistan algunas de las mutaciones más frecuentes del gen *GJB2* relacionadas a *DFNB1* (Hsiao-Yuan T., 2006, OMIM).

En un inicio se consideraba que la c.35delG se originaba por un *hot spot* mutacional, sin embargo estudios más recientes demuestran que la mutación se presenta con un efecto fundador en algunas poblaciones (Van Laer V., 2001).

En las tres mutaciones más frecuentes (c.35delG, c.167delT y c.235delC) el efecto que causan cambio en el marco de lectura que ocasiona un codón de alto prematuro y una proteína truncada (www.ensembl.org).

Esta tesis forma parte del protocolo “Caracterización de mutaciones en el gen *GJB2* en niños con sordera congénita detectada por tamizaje auditivo Neonatal en el Hospital Infantil de México Federico Gómez” HIM-2009-015, el cual se realiza en colaboración con el Departamento de Audiología y Foniatría del HIMFG. La investigadora responsable es la Dra. Verónica F. Morán Barroso, Jefe del Departamento de Genética y la investigadora suplente la Dra. Candy Sue Márquez Ávila, Jefe del Departamento de Audiología y Foniatría. Se analizaron pacientes con sordera congénita no sindrómica desde un punto de vista clínico y molecular; se analizó el gen *GJB2* para las mutaciones c.35delG, c.167delT y c.235delC y en la región secuenciada se analizó el fragmento en búsqueda de otros cambios.

III. Planteamiento del Problema

La sordera congénita es un padecimiento frecuente y se considera un problema de salud pública mundial. Si bien un porcentaje importante de los casos puede asociarse a causas no genéticas, se ha demostrado que en diferentes poblaciones en el mundo, los pacientes con sordera congénita tienen mutaciones en los genes de la familia de conexinas, en particular en el gen *GJB2*, por lo anterior consideramos que este gen podría estar mutado frecuentemente en los pacientes mexicanos con sordera congénita no sindrómica, por lo cual nos planteamos la siguiente:

IV. Pregunta de Investigación

¿Cuáles serán los cambios en el gen *GJB2* en pacientes del HIMFG con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica?

V. Justificación

La sordera representa uno de los principales problemas al nacimiento y de discapacidad auditiva entre la población infantil. Ya que hasta el 50% de las sorderas no sindrómicas son causadas por mutaciones en el gen que codifica a la proteína conexina 26, esta información es necesaria para poder clasificar el tipo de sordera, otorgar asesoramiento genético con diagnóstico molecular de certeza, y conocer la base genética de esta alteración en nuestra población.

A la fecha, no hay ningún estudio publicado que demuestre la prevalencia de mutaciones en el gen *GJB2* en pacientes mexicanos, por lo que tampoco se conoce hasta el momento el tipo de mutación que más frecuentemente se presenta en nuestra población.

Este estudio nos permitirá conocer la presencia de las mutaciones en el gen *GJB2* lo cual a su vez permitirá otorgar asesoramiento genético preciso a los pacientes y a sus familias.

VI. Objetivos

VI.1 Objetivo General:

- Describir las alteraciones moleculares en el gen *GJB2*, en 11 pacientes con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

VI.1 Objetivos Específicos:

- Identificar las alteraciones del gen *GJB2* en estos pacientes.
- Analizar la relación fenotipo-genotipo de las sorderas congénitas no sindrómicas y las mutaciones en el gen que codifica conexina 26 en once pacientes del HIMFG.
- Describir el grado de sordera presente en los pacientes identificados.
- Analizar las características clínicas y antecedentes heredofamiliares de los pacientes para determinar el fenotipo.
- Proporcionar manejo y tratamiento integral (audiológico y genético) a los pacientes diagnosticados con SNCNS.
- Proporcionar asesoramiento genético a los pacientes y sus familias, calculando los riesgos de recurrencia con base en los estudios moleculares.

VII. Material y Métodos

VII.1 Diseño del estudio

Es un estudio de tipo transversal, descriptivo, observacional.

VII.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:

Inclusión:

- Pacientes evaluados en el Departamento de Audiología y Foniatría del HIMFG, con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica.
- Que no presentaron factores de riesgo para sordera.
- Que aceptaron participar en el estudio.

Exclusión:

- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- En quienes se identificó entidad sindrómica o factores de riesgo.

Eliminación:

- Se eliminaron pacientes en que hubiese contraindicación para toma de muestra de estudio.
- Estudio audiológico no concluyente.
- Cantidad insuficiente de DNA o no adecuada para análisis.

VII.3 Tamaño de la muestra

En este protocolo se incluyeron pacientes con sordera congénita no sindrómica que acuden al Hospital infantil de México Federico Gómez, menores de 18 años. Se evaluaron para descartar entidades sindrómicas e identificar aquellos casos secundarios a factores ambientales. Para cumplir el objetivo anterior, se realizaron todas las valoraciones necesarias incluyendo historia clínica con énfasis en especial en los antecedentes heredofamiliares para detectar consanguinidad ó endogamia así como factores de riesgo infecciosos, traumáticos, hipóxicos; examen físico detallado y estudios para descartar alteraciones asociadas (renales, oftalmológicas, cardíacas y vertebrales). La muestra final incluida en esta tesis es de 11 pacientes.

Una vez identificados los casos de sordera congénita no sindrómica que cumplieron con los criterios de inclusión, se les invitó a participar en el estudio, y previo consentimiento informado (Anexo 1) se extrajo 1ml de sangre periférica en un tubo con EDTA para realizar el estudio molecular.

VII.4 Análisis molecular

Este análisis se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética del HIMFG (con la participación de la Biol. Adriana Sánchez Boiso).

Se realizó la extracción de DNA utilizando el kit de Puregene® de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Anexo 2).

Posteriormente se realizó la técnica de PCR para la amplificación de las tres regiones dónde se encuentran las mutaciones más frecuentes por la técnica de PCR (Anexo 3).

En la Figura 6 se muestra la región codificante del exón 2 del gen *GJB2*, y una porción del intrón (www.ensembl.org), se señalan las mutaciones analizadas en este trabajo, así como las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción empleadas.



Figura 6. Secuencia de la región codificante del gen *GJB2* y una porción del intrón (www.ensembl.org). En verde se muestran los sitios de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento para identificar la mutación 35delG, en azul los utilizados para identificar la mutación c.167delT y en amarillo los oligonucleótidos para la c.235delC. En rojo se señalan la secuencia de reconocimiento de las respectivas enzimas de restricción.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se diseñaron mediante el programa primer3®; éstas se estandarizaron y se secuenciaron los fragmentos de interés, con DNA del banco del laboratorio de biología molecular del HIMFG. Las secuencias de los mismos son las siguientes:

Para la amplificación de la región en donde se encuentra la c.35delG:

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño en pb	%GC	Tm
Sentido	AGCATGCTTGCTTACCCAGACTCA	24	50%	58.39
Antisentido	TCCTTTGCAGCCACAACGAGGA	22	54.5%	58.70

El tamaño esperado del producto es de 234 pb.

Para la amplificación de la región en donde se encuentra la c.167delT:

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño en pb	%GC	Tm
Sentido	AGCATTGGAAAGATCTCGCTCACC	24	50%	57.21
Antisentido	GGGAGATGGGGAAGTAGTGATCGT	24	54.1%	57.25

El tamaño esperado del producto es de 163 pb.

Para la amplificación de la región en donde se encuentra la c.235delC:

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño en pb	%GC	Tm
Sentido	GCTGCAAGAACGTGTGCTACGA	22	54.5%	58.14
Antisentido	CGATGCGGACCTTCTGGGTTTT	22	56.52.5%	58.49

El tamaño esperado del producto es de 210pb.

Una vez amplificados los productos de PCR, se secuenció el fragmento para identificar la mutación c.35delG (Anexo 4).

La identificación de las mutaciones c.235delC y c.167delT, se realizó mediante la técnica de análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's por sus siglas en inglés). Las enzimas que se utilizaron fueron: para la identificación de la mutación c.167delT se utilizó la enzima *Pst*I, ésta proviene de la bacteria la *Providencia stuartii* I, y reconoce la secuencia 5'CTGCAG3'; el corte por la enzima *Pst*I produce ante la secuencia normal un fragmento de 116 pb. y uno de 47pb; si la mutación c.167delT esta presente, la enzima no reconoce la secuencia por lo que no se produce el corte.

De manera similar la enzima *Ap*I se utilizó para la búsqueda de la mutación c.235delC, esta enzima proviene del *Acetobacter pasteurianus*, su secuencia de reconocimiento es 5'GGGCCC3'; ante la secuencia normal produce un fragmento de 151pb y otro de 59 pb; si se encuentra la mutación c.235delC, la enzima no realiza el corte (Anexo 5).

Una vez confirmada la amplificación, se realizó la reacción de RFLP's. Los productos de restricción fueron visualizados en gel de agarosa al 2%, usando un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (GeneRuler®) como referencia para confirmar el tamaño esperado de los fragmentos generados por las diferentes PCR (Figura 7).

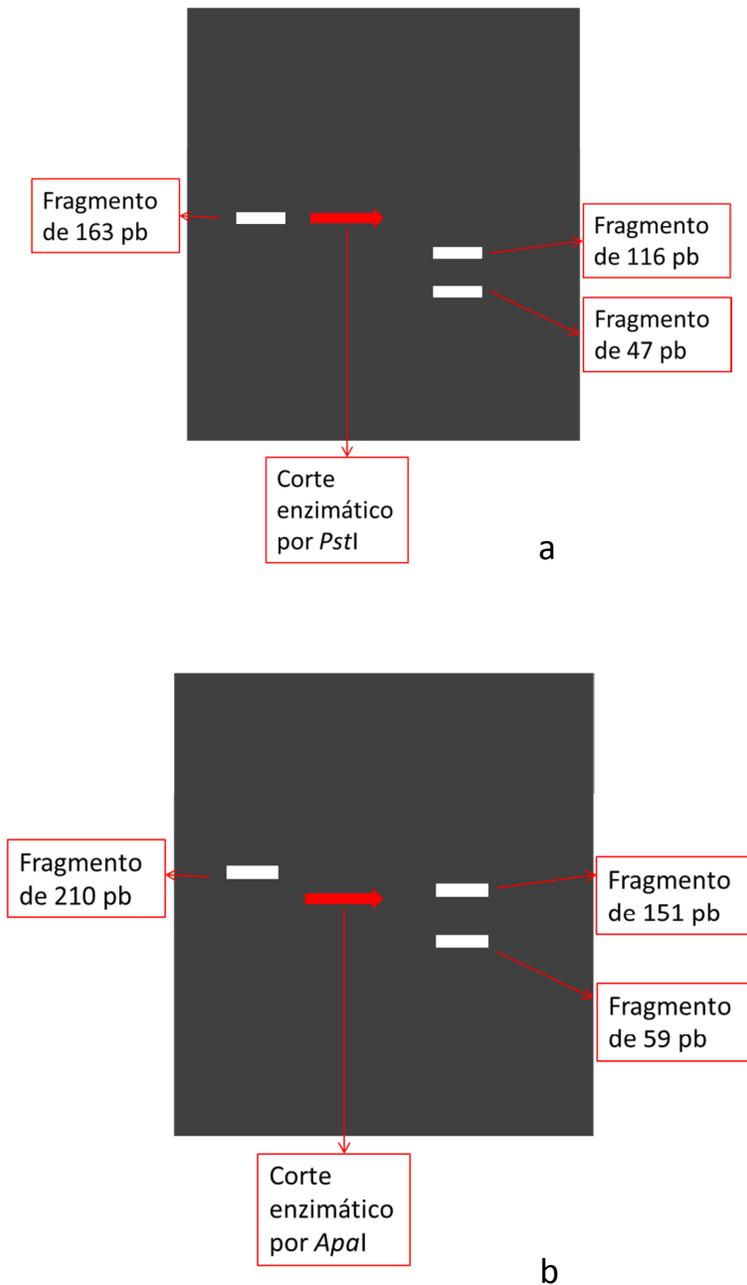


Figura 7. Esquema del gel de agarosa en el que se ejemplifican los fragmentos previos al corte, así como los fragmentos producidos por las enzimas de restricción. A: producto de PCR y fragmentos producidos por el corte enzimático para el análisis de la c.167delT; b: producto de PCR y fragmentos producidos por el corte enzimático para el análisis de la c.235delC.

Cada uno de los pacientes fue analizado para las tres deleciones, en primer lugar por análisis de restricción las delc.167delT y 236delC, en caso de que la reacción de restricción fuese negativa se realizó la secuenciación para confirmar o descartar la presencia de la del35G, como se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 8.

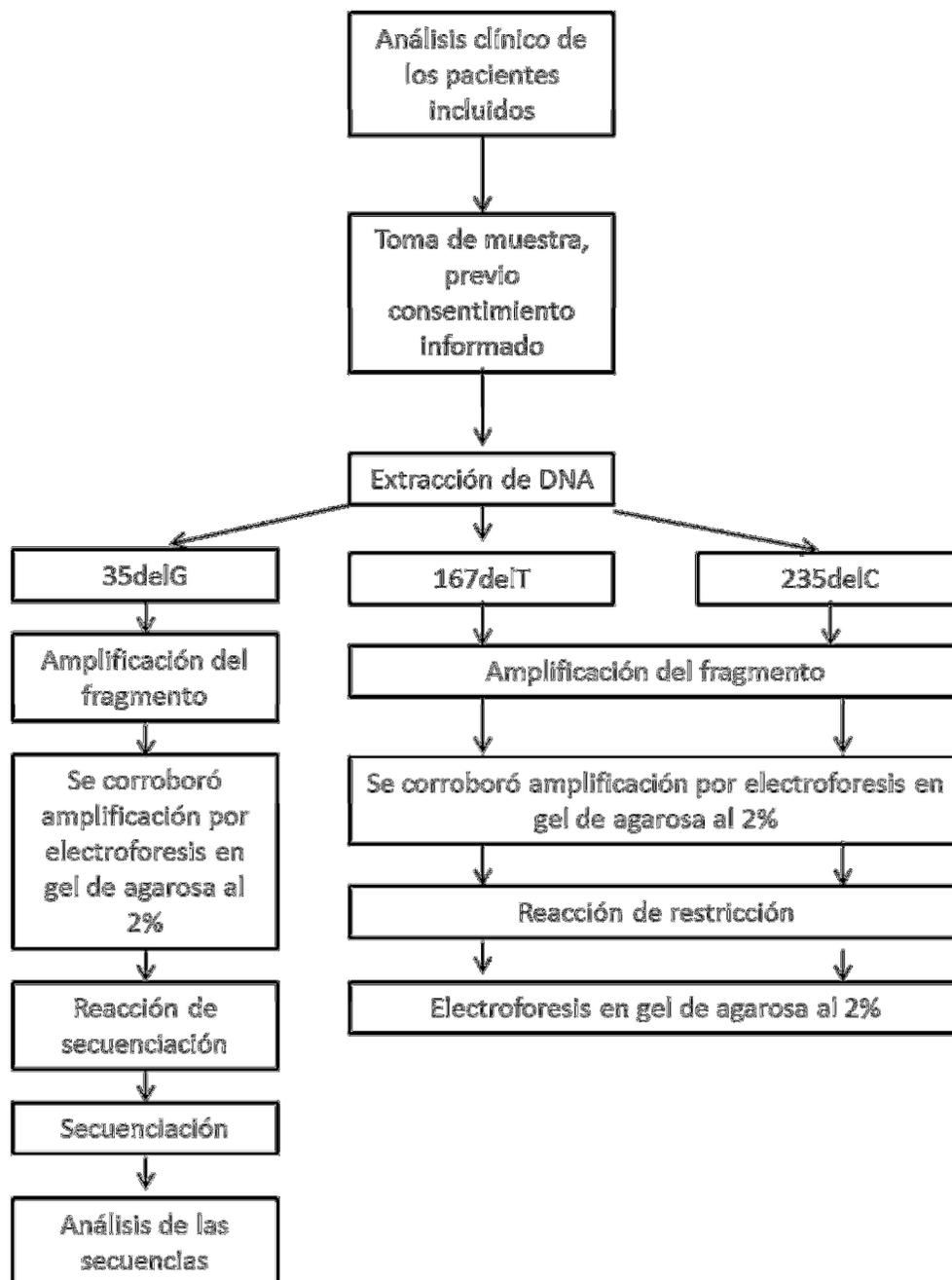


Figura 8. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.

VIII. Resultados

VIII.1 Características clínicas

En colaboración con el Departamento de Audiología y Foniatría, se seleccionaron 96 pacientes con diagnóstico de sordera congénita del archivo del Departamento correspondientes a los años 2007 a 2011 y se procedió a la revisión de los expedientes de los casos. En 66 casos se confirmó que la presentación fenotípica en estudio correspondió a sordera debida a factores adversos al nacimiento, secundarias a infecciones o uso de ototóxicos, además se identificaron casos de sorderas sindrómicas, sorderas con alteraciones renales, cardiológicas o neurológicas, por lo que fueron excluidos del estudio (Tabla 3, Figura 9).

Tabla 3. Casos de sordera congénita analizados para la selección de pacientes

Diagnóstico	Número de casos
SCNS	33
Factores adversos perinatales	26
Alteraciones renales	3
Cardiopatía	3
Alteraciones en SNC	19
Secundario a infecciones	3
Secundaria a ototóxicos	3
TORCH	1
Síndromes específicos	5
Total	96

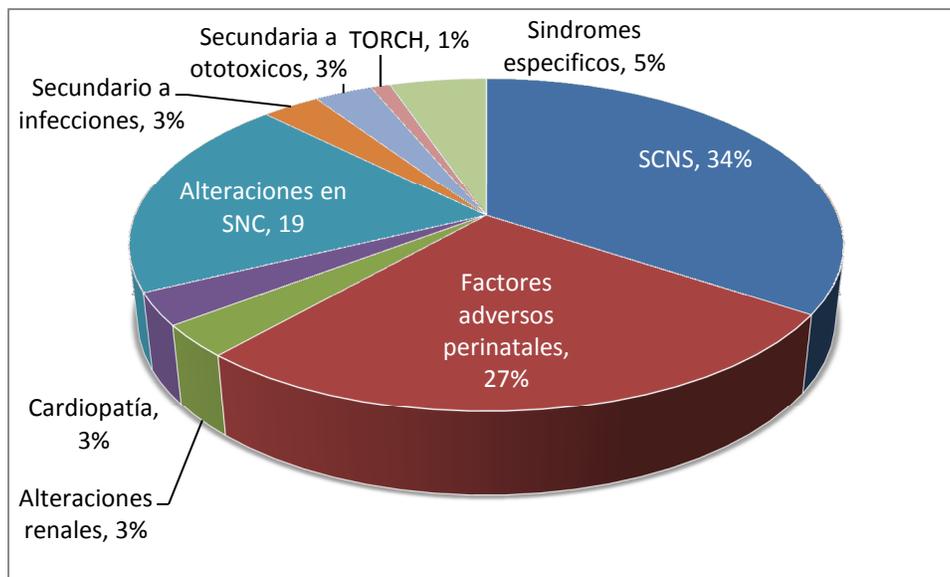


Tabla 3 y Figura 9. Causas de sordera congénita en los pacientes registrados en el Departamento de Audiología y Foniatría (Fuente: Archivo de Audiología, Archivo clínico del HIMFG, Depto. de Bioestadística y Archivo Clínico).

VIII.1.a Pacientes Incluidos

Se identificaron 33 casos de sordera congénita no sindrómica que cumplieron con los criterios de inclusión de la presente investigación. De este grupo, sólo fue posible evaluar e invitar a participar, previo consentimiento informado, a 15 pacientes. Tres de los casos fueron eliminados por obtención de DNA escaso para el análisis, uno más en que fue posible descartar las mutaciones c.167delT y c.235delC, el DNA fue escaso para permitir el análisis de la del35G. Por lo anterior el análisis final de características clínicas incluye a 11 pacientes, los que se presentan en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas y resultado del análisis molecular de los once pacientes incluidos en el estudio

Paciente	Sexo	Edad	Procedencia	Antecedente de consanguinidad	Antecedente familiar de sordera	Grado y tipo de sordera	Mutación en <i>GJB2</i>
1	Femenino	8 meses	Edo. México	No	Si (hermana menor)	Sensorineural profunda bilateral	---
4	Femenino	1 año 3 meses	Edo México	Si	Si (hermana)	Sensorineural media bilateral	Polimorfismo V27I
5	Femenino	16 años	Edo México	No	No	Sensorineural profunda bilateral	Polimorfismo V27I
6	Femenino	5 años 3 meses	Edo México	Si	No	Sensorineural profunda bilateral	G12L
7	Femenino	2 años	Edo México	No	Si (prima hermana)	Sensorineural profunda bilateral	c.35delG
9	Femenino	3 años	Michoacán	No	No	Sensorineural profunda bilateral	---
11	Masculino	2 años	Edo. México	No	No	Sensorinerural profunda bilateral	---
12	Masculino	3 años	Guanajuato	No	No	Sensorineural media derecha, profunda izquierda	Inserción guanina en codon12
13	Masculino	2 años	Michoacán	Si	Si (primo hermano)	Sensorineural profunda bilateral	---
14	Masculino	9 años 3 meses	DF	No	No	Sensorineural profunda bilateral	---
15	Femenino	11 años	Michoacán	No	No	Sensorineural profunda bilateral	---

VIII.1.b Características clínicas, sociodemográficas y heredofamiliares:

De los 11 pacientes incluidos, se encontraron las siguientes características demográficas:

- 7 (63.63%) son de sexo femenino y 4 (36.36%) masculino.
- Las edades de los pacientes incluidos van desde 8 meses hasta 15 años con un promedio de 5 años.
- 6 provienen del Estado de México, 3 de Michoacán, 1 de Guanajuato y 1 del D.F.
- En 3 de ellos se confirmó el antecedente de consanguinidad, en dos casos en tercer grado y en uno en cuarto grado.
- 4 tienen antecedentes familiares de sordera congénita.
- 9 tienen sordera sensorineural profunda bilateral, 1 sensorineural media bilateral y otro paciente tiene sensorineural media derecha y profunda izquierda.
- A 3 se les realizó diagnóstico por tamizaje auditivo neonatal, el resto se diagnosticaron después de los dos años de edad.

VIII.2 Resultados del estudio molecular

VIII.2.a Amplificación de las regiones de interés por PCR.

Se amplificaron los tres fragmentos de PCR a analizar y se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (Figura 10).

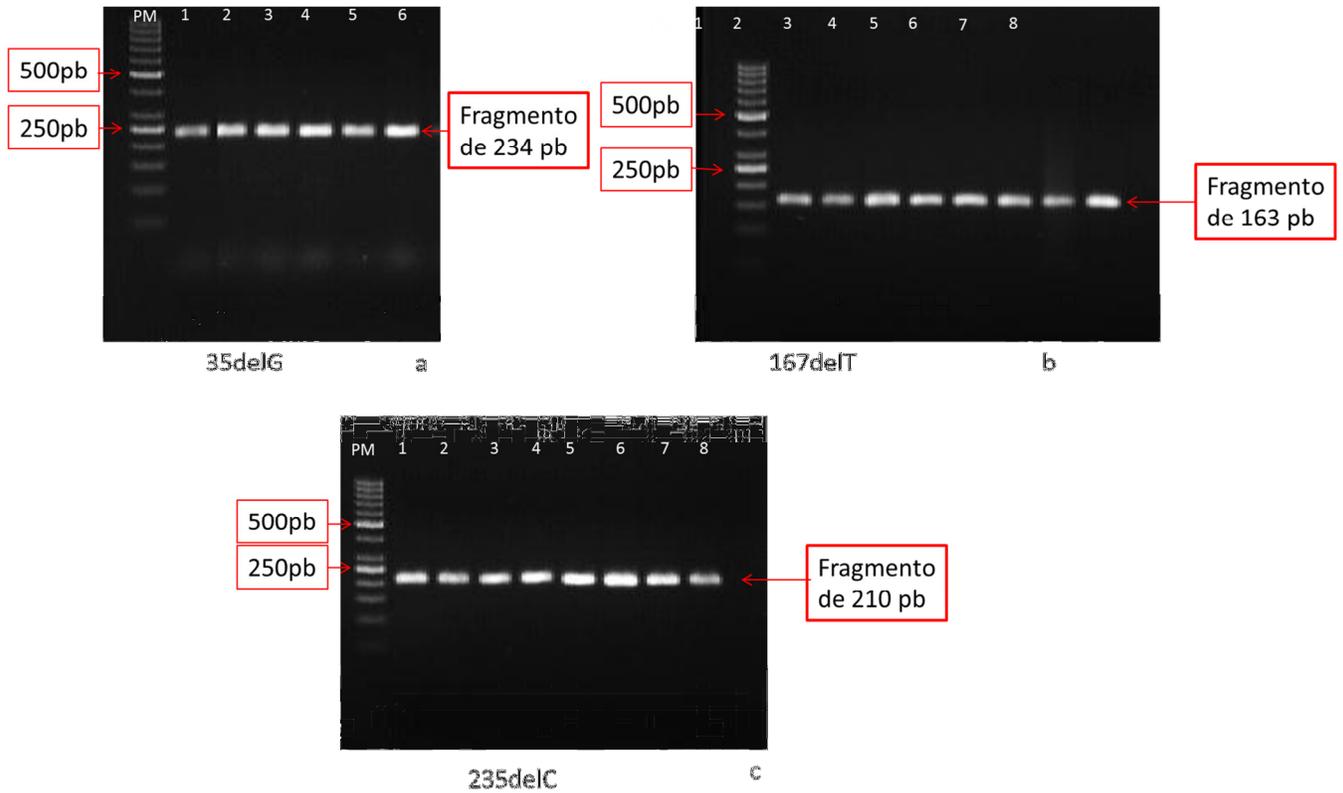


Figura 10. Fotografías de los geles de agarosa al 2% en donde se visualizan las regiones amplificadas. a. Producto para el análisis de la 35delG, b. Producto para el análisis de la c.167delT, c. Producto para el análisis de la c.235delC.

VIII.2.b Análisis mutacional por RFLP's

Mutación c.167delT:

En todos los casos analizados se observó corte por la enzima *Pst*I, por lo que se concluye que ninguno de estos tiene la delección de la timina en la posición 167 (Figura 11).

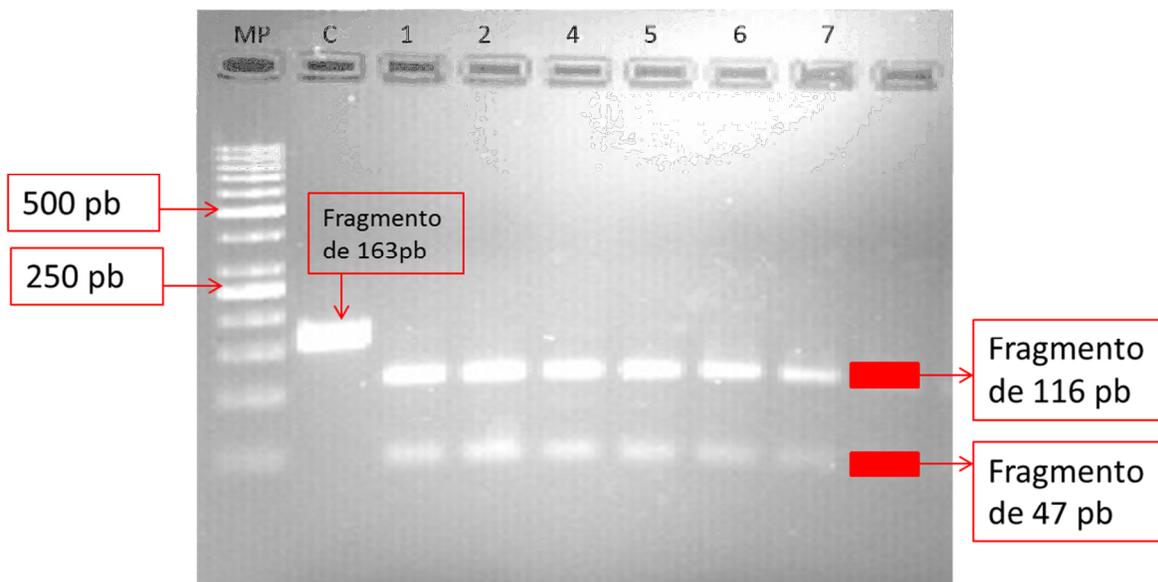


Figura 11. Fotografía del gel de agarosa al 2% en donde se observan los dos fragmentos producidos por el corte enzimático. Se observa el control sin enzima y cinco de los pacientes. MP: Marcador de peso molecular. C: control sin enzima de restricción.

Mutación c.235delC:

En todos los casos analizados se observó corte por la enzima *ApaI*, por lo que ninguno de estos tiene la delección de la citosina en la posición 235 (Figura 12).

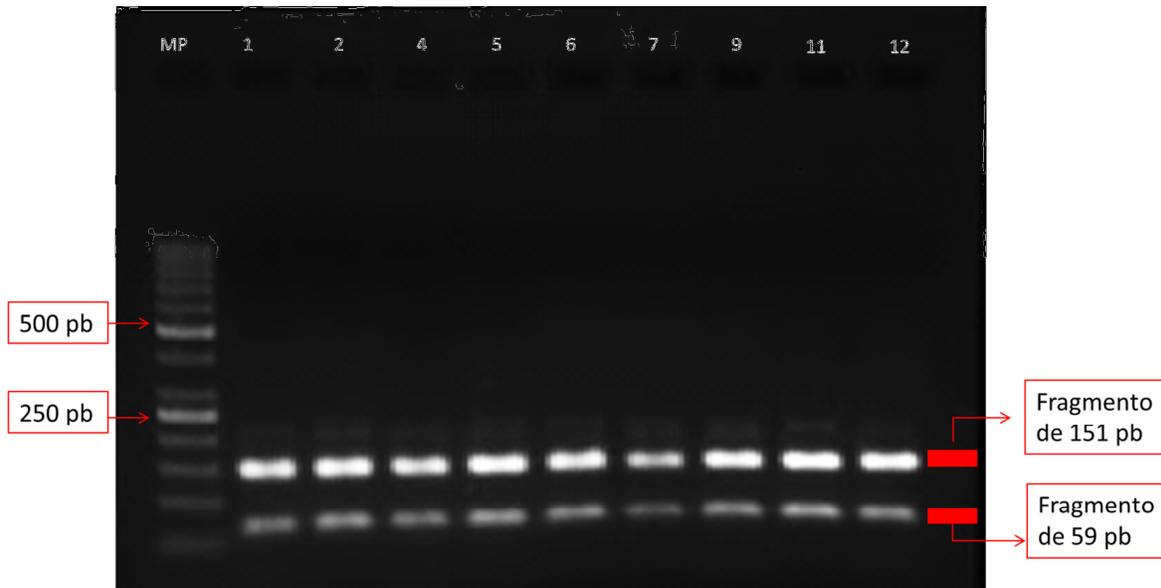


Figura 12. Fotografía del gel de agarosa al 2% en donde se observan los dos fragmentos producidos por el corte enzimático. Se observa que en ninguno de los pacientes se encontró la mutación, ya que en todos ellos ocurrió el corte enzimático. MP marcador de peso molecular.

VIII.2.c Análisis mutacional por secuenciación

Mutación c.35delG:

Los once pacientes fueron analizados por secuenciación directa en el fragmento del exón 2 previamente especificado para estudiar el sitio reportado de la c.35delG. De los once pacientes, se encontró un paciente con la delección c.35delG en estado homocigoto y además se encontraron otras mutaciones y polimorfismos en cuatro pacientes diferentes (análisis asesorado por el Dr. Jesus Aguirre Hernández y el M. en C. Ricardo Vázquez Martínez).

Análisis Clínico molecular del paciente con la mutación c.35delG

Paciente 7:

Paciente femenino de 2 años, originaria y residente del estado de México. Producto de la segunda gesta de padres de 37 años, aparentemente sanos y no consanguíneos (Figura 13). Producto de embarazo planeado con percepción del mismo al mes de gestación, adecuado control prenatal, embarazo aparentemente normo evolutivo. Fue obtenida a las 37 semanas de gestación vía abdominal por ruptura prematura de membranas, peso al nacer de 2,560 g. (percentil 25), talla de 48 cm. (percentil 25) y Apgar de 9/9. Dándose de alta al binomio sin complicaciones.

Al nacimiento se le realizó tamizaje auditivo neonatal, el cual no aprobó por lo que fue referida.

Conocida en nuestra institución desde los 4 meses de vida. Fue valorada por los Departamentos de Audiología y Otorrinolaringología, en donde se realizaron estudios de potenciales evocados auditivos de tallo cerebral en los que se corroboró una sordera sensorineural profunda bilateral.

En el Departamento de Genética fue valorada al 1 año 6 meses de edad, se realizó historia clínica y exploración física en la que no se encontró ningún dato patológico. Se solicitaron estudios de extensión:

- Valoración oftalmológica: Normal.
- Electrocardiograma: Normal.
- Ultrasonido renal y pruebas de función renal: Normales.
- Radiografía de columna: Normal.

Por lo que se diagnosticó sordera congénita no sindrómica.

Postoperada de implante coclear, actualmente a los 2 años 4 meses, presenta lenguaje de palabras sueltas, dirigido.

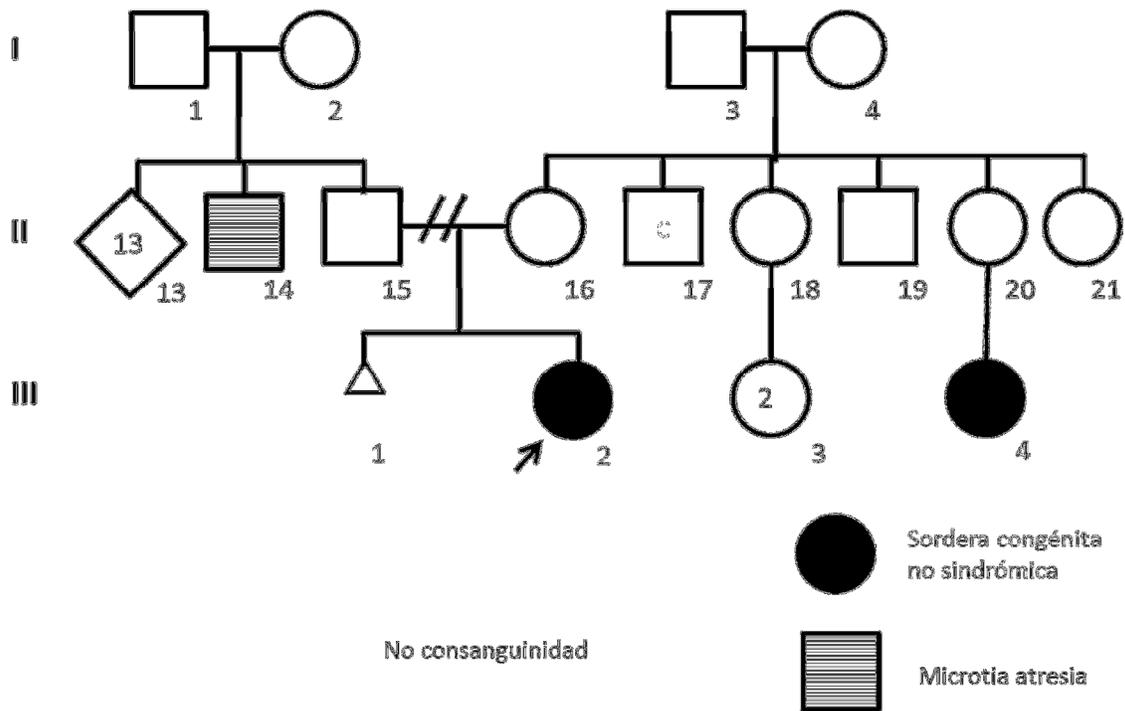


Figura 13. Árbol genealógico de tres generaciones en el que se observa el propositus (III.1), así como su prima hermana por rama materna (III.4), ambas con diagnóstico de sordera congénita no síndrómica.

Como ya se mencionó previamente, se realizaron estudios de RFLP's para descartar las mutaciones c.167delT y c.235delC; los cuales resultaron normales por lo que se descartó la presencia de estas dos mutaciones. Se realizó la secuenciación del fragmento de interés para la búsqueda de la mutación c.35delG, en la cual se encontró la delección en ambos alelos; se realizó la secuenciación del fragmento antisentido en la que se corroboró la presencia de la mutación de forma heterocigota (Figura 14).

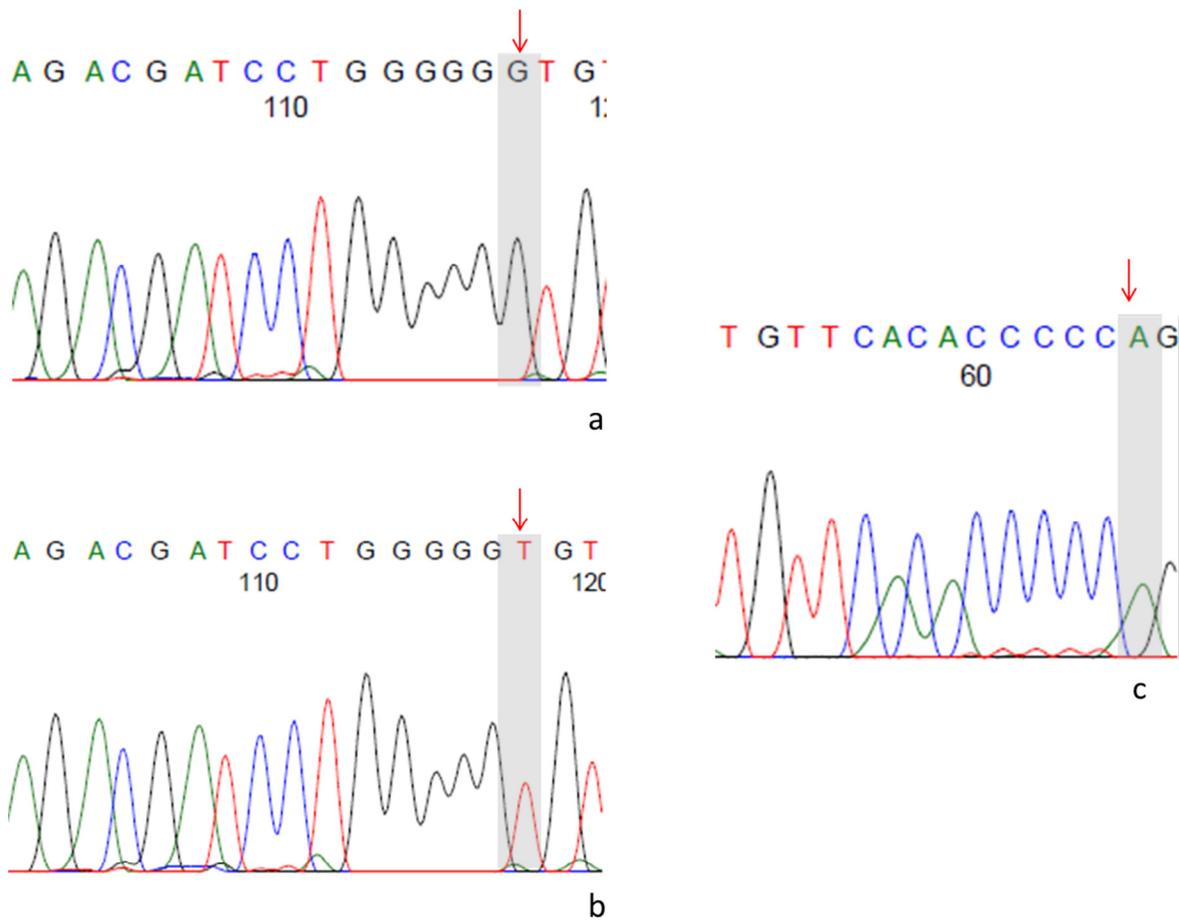


Figura 14. Electroferogramas de la secuencia en la que se encuentra la c.35delG, con una flecha roja y sombreado en gris se marca el sitio de la delección. a. Secuencia normal (tomada del paciente 1). b. secuencia del paciente 7 en la que se observa la delección de la guanina en la posición 35 de forma homocigota (oligonucleótido sentido). c. secuencia antisentido (oligonucleótido antisentido) en a que se corrobora la delección.

VIII.2.d Otras mutaciones detectadas

Se encontraron otros tres cambios (en 4 pacientes) dentro del fragmento analizado por secuenciación para la detección de c.35delG:

- Inserción con cambio en el marco de lectura (c.35insG) que no ha sido reportada previamente.
- Mutación de sentido equivocado c.34G>T, con probable efecto patológico.
- Polimorfismo V27I previamente descrito, el cual esta presente en dos de los pacientes analizados en estado heterocigoto.

En el paciente 12 se detectó una mutación por inserción en la que se incorpora una guanina, lo que causa un cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido 12, y finalmente un codón de alto prematuro en el aminoácido 67.

Esta mutación se encontró de forma heterocigota y no ha sido descrita anteriormente.

A continuación se presenta el análisis del paciente 12.

Paciente 12

Paciente masculino de 3 años 2 meses, originario y residente de Guanajuato. Producto de la tercera gesta de padres no consanguíneos. Padre de 30 años y madre de 22 años al momento de la concepción; ambos aparentemente sanos (Figura 15).

Producto de embarazo planeado con percepción del mismo a los dos meses de gestación, adecuado control prenatal, embarazo aparentemente normo evolutivo. Fue obtenido a las 40 semanas de gestación vía abdominal por falta de progresión de trabajo de parto, peso al nacer de 3, 000 g. (percentil 50), talla de 50 cm. (percentil 50) y Apgar de 8/9. Dándose de alta al binomio sin complicaciones.

Al año 3 meses de edad la madre notó que el paciente no respondía a estímulos auditivos, por lo que acudió al DIF en donde se diagnosticó hipoacusia, se indicó manejo con auxiliares auditivos y terapia del lenguaje. Fue referido a esta Institución a los 2 años 6 meses. Fue valorado por los Departamentos de Audiología y Otorrinolaringología y se estableció el diagnóstico de cortipatía bilateral.

En el Departamento de Genética fue valorada a los 4 años 6 meses de edad, se realizó historia clínica y exploración física, no se encontró ningún dato patológico, ni antecedentes de factores de riesgo para sordera. Se solicitaron estudios de extensión:

- Valoración oftalmológica: Normal.
- Electrocardiograma: Normal.
- Ultrasonido renal y pruebas de función renal: Normales.
- Radiografía de columna: Normal.

Por lo que se diagnosticó sordera congénita no sindrómica.

Actualmente en protocolo de estudio para implante coclear, presenta lenguaje a través de señas, sonidos vocálicos, trata de imitar sonidos onomatopéyicos, y sonidos silábicos con intención comunicativa.

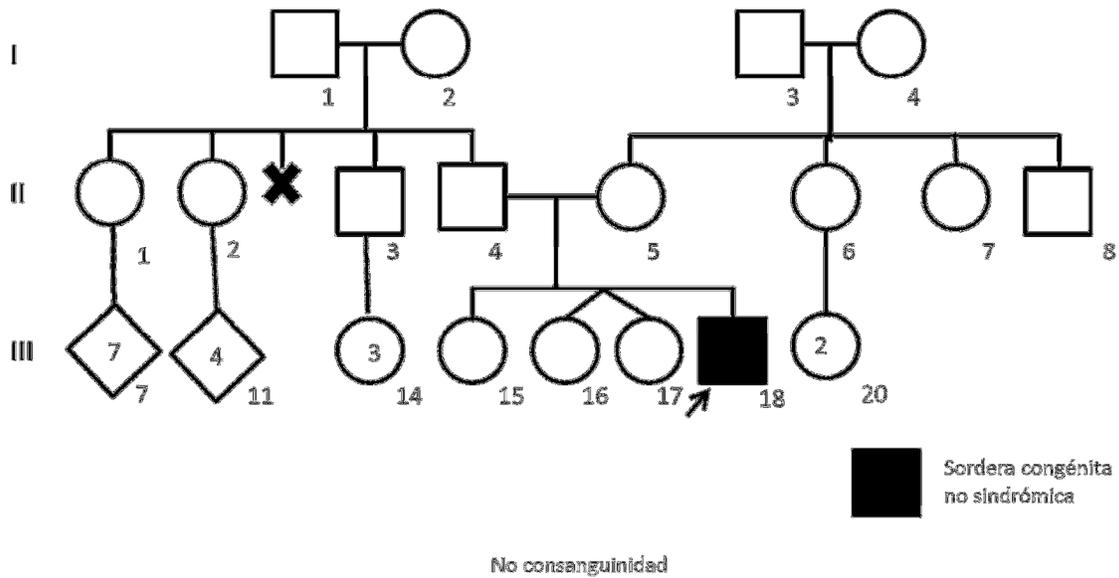


Figura 15. Árbol genealógico de tres generaciones en el que se observa el propositus (III.7), con diagnóstico de sordera congénita no síndrómica.

Se realizaron estudios de RFLP's para descartar las mutaciones c.167delT y c.235delC; los cuales resultaron normales por lo que se descartó la presencia de estas dos mutaciones. Se realizó la secuenciación del fragmento de interés para la búsqueda de la mutación c.35delG, en la que se encontró la inserción de una guanina en el codón 12 en uno de los alelos; se realizó la secuenciación del fragmento antisentido en la que se corroboró la presencia de la mutación de forma homocigota (Figura 16).

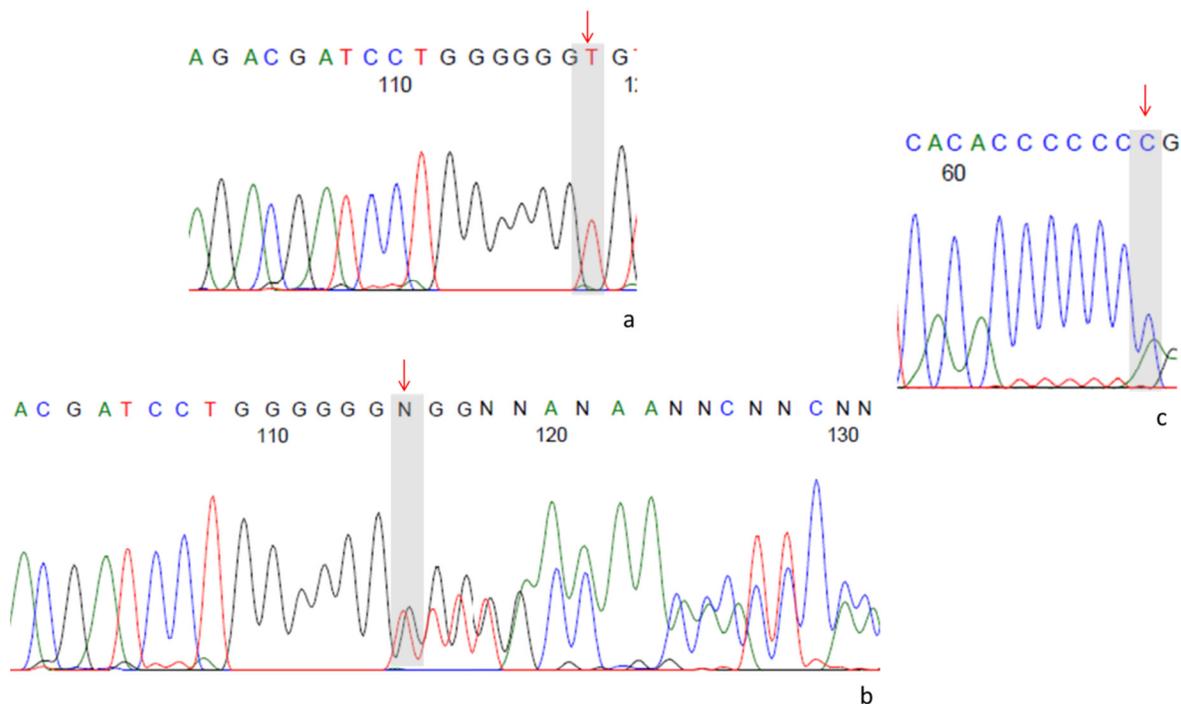


Figura 16. Electroferogramas de la secuencia en la que se encuentra la inserción de una guanina, con una flecha roja se marca el sitio. a. Secuencia normal (tomada del paciente 1). b. secuencia del paciente 12 en la que se observa la inserción de la guanina de forma heterocigota.(oligonucleótido sentido) c. secuencia antisentido en la que se corrobora la inserción (oligonucleótido antisentido).

En el paciente 6, se detectó una transversión de una guanina por una timina en la posición 34 (c.34G>T), que ocasiona un cambio de glicina por cisteína en el aminoácido 12; esta es una mutación ya reportada previamente con probable efecto patológico.

A continuación se describe el caso del paciente 6

Paciente 6

Paciente femenino de 5 años 3 meses de edad, originario y residente del estado de México. Producto de la segunda gesta de padres consanguíneos en quinto grado. Padre de 24 años y madre de 27 años al momento de la concepción; ambos aparentemente sanos (Figura 17).

Producto de embarazo no planeado, si deseado, con percepción del mismo a los dos meses de gestación, adecuado control prenatal, embarazo aparentemente normo evolutivo. Fue obtenida a las 40 semanas de gestación vía vaginal, eutócico, peso al nacer de 3,500 g.(percentil 75), talla de 49 cm. (percentil 50) y Apgar de 8/9, dándose de alta al binomio sin complicaciones.

Al año 6 meses de edad la madre notó retraso en el lenguaje, por lo que acudió a hospital en donde se diagnosticó hipoacusia, se indicó manejo con auxiliares auditivos y terapia del lenguaje. Fue referida a esta Institución a los 3 años 6 meses. Fue valorado por los Departamentos de Audiología y Otorrinolaringología y se estableció el diagnóstico de cortipatía bilateral.

En el Departamento de Genética fue valorada a los 4 años 6 meses de edad, se realizó historia clínica y exploración física, no se encontró ningún dato patológico, ni antecedentes de factores de riesgo para sordera. Se solicitaron estudios de extensión:

- Valoración oftalmológica: Normal.
- Electrocardiograma: Normal.
- Ultrasonido renal y pruebas de función renal: Normales.
- Radiografía de columna: Normal.

Por lo que se diagnosticó sordera congénita no sindrómica.

Actualmente, presenta lenguaje a través de señas, sonidos vocálicos con intención comunicativa.

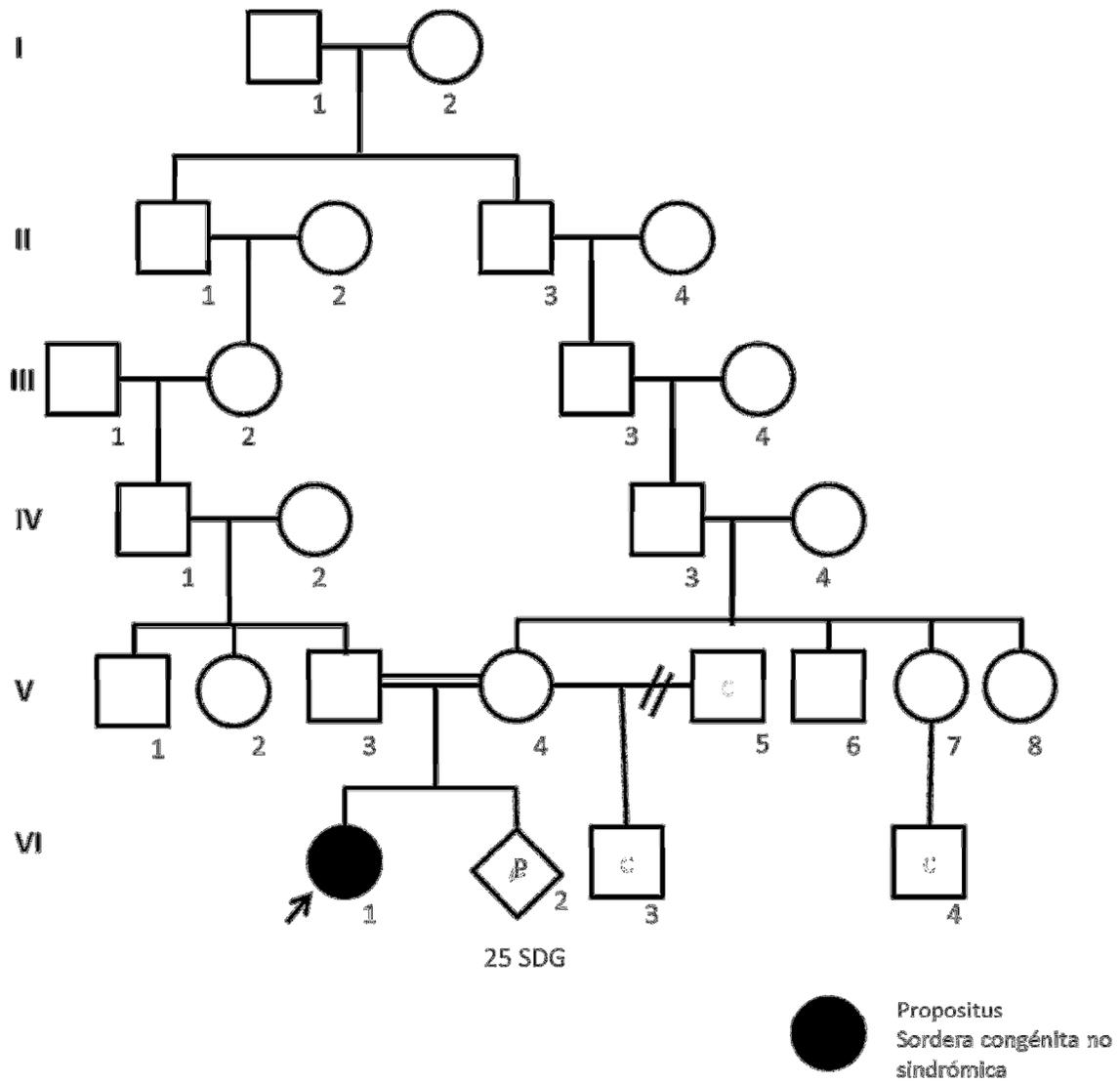


Figura 17. Árbol genealógico de seis generaciones en el que se observa el propositus (VI.1) con diagnóstico de sordera congénita no síndrómica.
Consanguinidad: 1/256, coeficiente de parentesco: 1/128

Se realizó análisis de RFLP para descartar las mutaciones c.167delT y c.235delC; los cuales resultaron normales. Se secuenció el producto amplificado para la búsqueda de la mutación c.35delG, la cual no se encontró. Se detectó una transversión de una guanina por una timina en la posición 34 (C.34G>T), lo que causa un cambio de glicina por cisteína en el aminoácido 12.

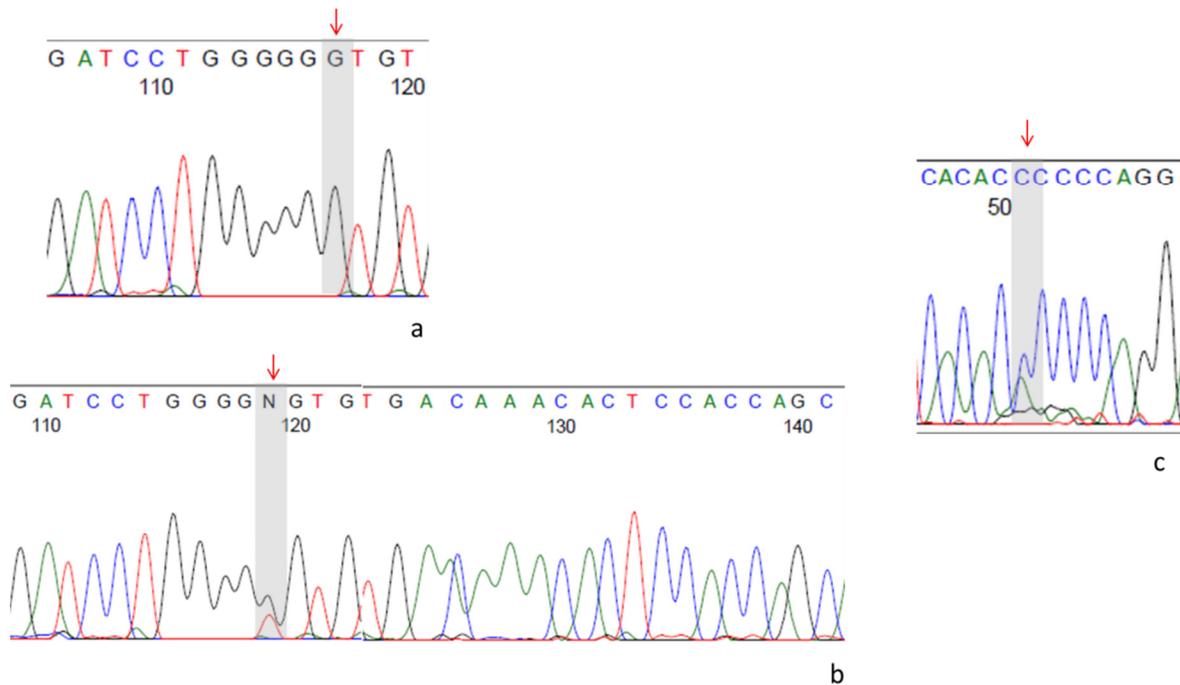


Figura 18. Electroferogramas de la secuencia en la que se encuentra la transversión de la guanina por la timina, con una flecha roja y sombreado se marca el sitio. a. Secuencia normal (tomada del paciente 1). b. secuencia del paciente 6 en la que se observa el cambio de la guanina por timina de forma heterocigota.(oligonucleótido sentido) c. secuencia antisentido en que se corrobora la transversión (oligonucleótido antisentido).

En dos de los pacientes se detectó un polimorfismo; una transición de una guanina por una adenina en el codón 27, que en la proteína causa un cambio de valina por isoleucina (V27I), el cual es un cambio ya identificado como polimorfismo por Kelley P. y colegas en 1998 (Kelley P., 1998). Este cambio se encontró en los pacientes 4 y 5 corroborados en la secuencia antisentido; en ambos el polimorfismo se encontró de forma heterocigota (Figura 19).

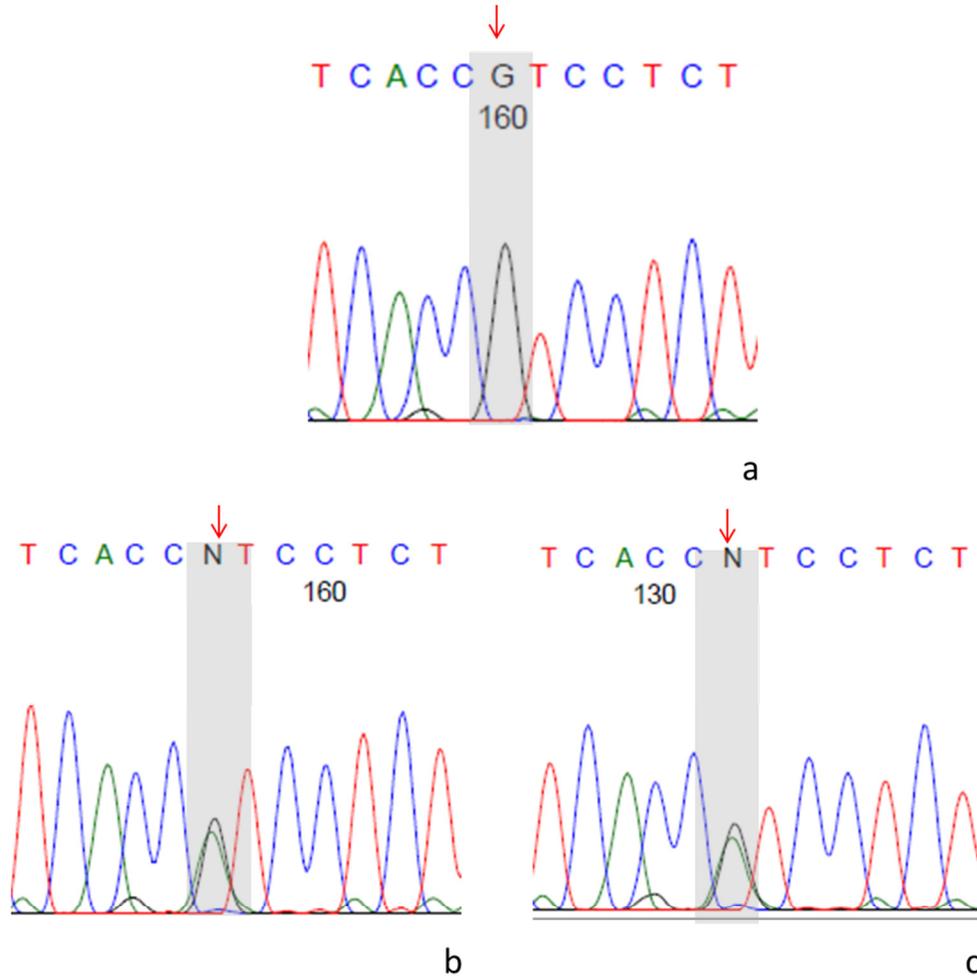


Figura 19. Electroferogramas de la región en la que se encuentra el polimorfismo V27I, con una flecha roja y sombreado se marca el sitio. a. Secuencia normal (tomada del paciente 1). b. secuencia del paciente 4 en la que se observa el cambio de guanina por adenina de forma heterocigota (oligonucleótido sentido). c. secuencia del paciente 5 en la que se observa el mismo cambio (oligonucleótido sentido).

De manera resumida, se muestran los resultados encontrados por el análisis molecular de las tres mutaciones de interés (Figura 20).

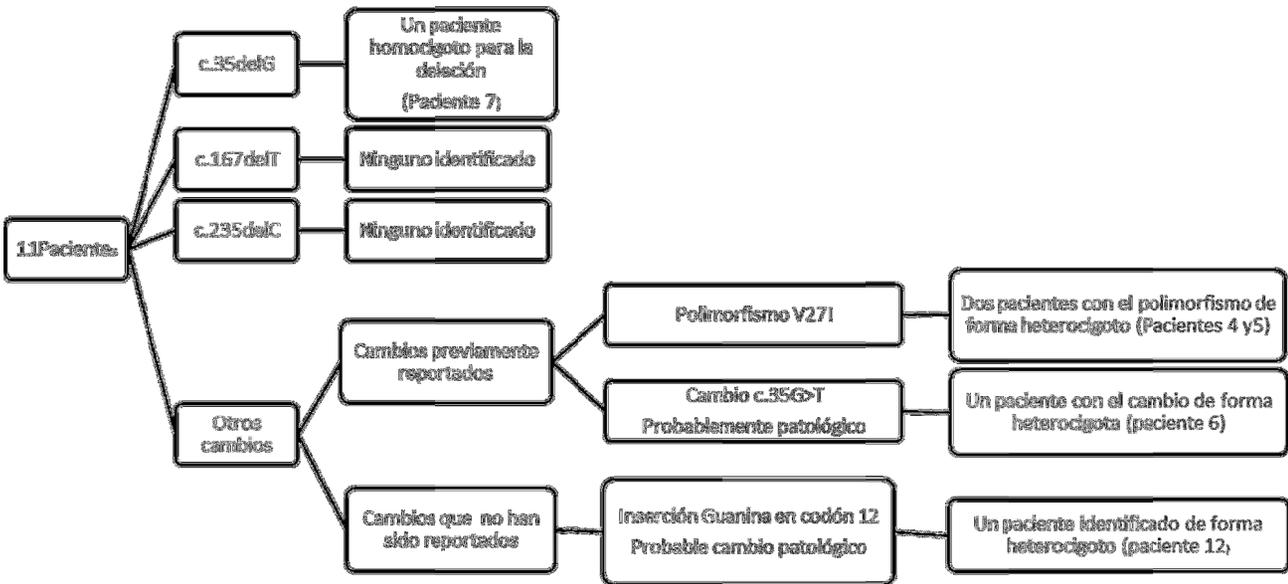


Figura 20. Diagrama que demuestra en resumen los resultados del análisis molecular

IX. Discusión:

La sordera congénita es un problema importante de salud pública, siendo una de las principales causas de discapacidad. Tiene múltiples etiologías y en particular las bases genéticas hacen que su herencia sea compleja.

En el presente trabajo de tesis se tuvo como objetivo describir las alteraciones moleculares en el gen *GJB2*, en 11 pacientes con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez

IX.1 Datos sociodemográficos

De los casos estudiados en este trabajo de tesis, la mayoría provienen del Estado de México, dato que concuerda con la población atendida en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Así mismo llama la atención que tres (27.27%) de los pacientes provienen del estado de Michoacán, pero se considera que esto es debido a que nuestra institución cuenta con un programa de referencia de niños de ese estado con diagnóstico de sordera a nuestro hospital y no porque en este estado se tenga una mayor prevalencia de sordera que en otros lugares de la República de donde es originaria el resto de la población atendida.

IX.2 Datos clínicos

De los pacientes incluidos, únicamente a tres se les realizó el diagnóstico por tamizaje auditivo neonatal; el resto se diagnosticó de forma más tardía (rango de edad entre los 2 y 5 años) dentro de este último grupo de pacientes, 6 no han logrado desarrollar lenguaje hablado, lo cual nos resalta la enorme importancia de la detección temprana de la hipoacusia mediante el programa de tamizaje auditivo neonatal, ya que algunos de los pacientes diagnosticados tempranamente entraron de manera inmediata al programa de evaluación de implante coclear y empezaron su rehabilitación y tratamiento oportuno desde el momento de la sospecha clínica, lo cual confiere un mejor pronóstico para la integración y calidad de vida de estos pacientes.

En tres de los casos (pacientes 4, 6 y 13) se corroboró la existencia de consanguinidad entre los padres de los pacientes, y en cuatro pacientes (pacientes 1, 4, 7 y 13) se cuentan con antecedentes heredofamiliares de sordera, en todos ellos los demás individuos afectados de la familia son de la misma generación (hermanos o primos), es decir se observa una herencia horizontal.

Todos estos datos sugieren una herencia autosómica recesiva, el cual como ya se mencionó es el patrón de herencia más frecuente en las sorderas congénitas no sindrómicas.

En la gran mayoría de los pacientes la sordera es de tipo sensorineural profunda bilateral, siendo éste el tipo de sordera más frecuente en los casos de sordera congénita no sindrómica, por lo que esta población analizada refleja lo reportado previamente en la literatura.

IX.3 Análisis Molecular

Se identificaron mutaciones en el gen *GJB2* en dos pacientes (pacientes 7 y 12), de los once pacientes analizados, lo cual corresponde al 18% de los casos; siendo ésta una proporción similar a la esperada por lo reportado en la literatura, ya que se calcula que hasta 20% de los casos de sordera congénita no sindrómica se dan por mutaciones en este gen (Kelley P., 1998). Sin embargo la muestra analizada en este trabajo de tesis es muy pequeña para poder establecer frecuencias, además de que solo se buscaron las tres mutaciones más frecuentes, incluyendo la secuenciación de sólo 210 pb por lo que no podemos descartar la presencia de mutaciones en el gen en regiones no analizadas.

En un caso (paciente 7) se identificó la c.35delG, siendo ésta la mutación más frecuentemente asociada a esta enfermedad. Este caso representa el 9% de los casos estudiados; lo cual corresponde a un porcentaje menor al reportado en la literatura, ya que se calcula que la c.35delG corresponde a alrededor de 28 a 63%, de las mutaciones en *GJB2*, dependiendo de la población estudiada (Nejat M., 2009); pero como ya se mencionó nuestra muestra es aún muy pequeña para analizar frecuencias.

Es interesante que en esta población no se encontraron ninguna de las otras dos mutaciones reportadas como las siguientes en frecuencia (c.167delT y 235delT); sin embargo como ya se mencionó éstas son frecuentes en poblaciones de ascendencia judía ashkenazi y asiática respectivamente, y por el tipo de población que se atiende en nuestra institución es probable que estas mutaciones se encuentren realmente en baja frecuencia.

Interesantemente se encontró otra mutación (paciente 12), que correspondió a una inserción de una guanina dentro de la secuencia de las seis guaninas en las que ocurre la c.35delG; como ya se mencionó esta mutación no ha sido reportada y causa un cambio en el marco de lectura con un codón de alto prematuro en el codón 67, sin embargo hay que ampliar el estudio de este caso para determinar el efecto que tiene este cambio en el fenotipo del paciente, como se discutirá más adelante.

También se encontró otro cambio (paciente 6,) la mutación c.34G>T, éste es un cambio previamente reportado (Grish V., 2007), pero que no se ha demostrado definitivamente su efecto patológico, actualmente está clasificado como un cambio

probablemente patológico (rs104894408). Este cambio se encontró de forma heterocigota, por lo que sería importante clonar el fragmento para poder analizar la secuencia de cada alelo por separado y así corroborar la presencia de este cambio.

Se identificaron 2 pacientes (pacientes 4 y 5) con el polimorfismo V27I, ambos de forma heterocigota, lo cual representa el 9% de los alelos analizados; ambos pacientes son originarios del Estado de México, por lo habrá que descartar que este sea un polimorfismo frecuente en nuestra población, como ya se ha mencionado previamente no hay estudios que determinen la frecuencia de cambios en el gen *GJB2* en pacientes mexicanos. Sin embargo Pandya en el 2001, reportó que la presencia de este polimorfismo, junto con otro cambio (p.E114G) es causal de sordera congénita no sindrómica; por lo que en estos dos pacientes es importante ampliar la secuenciación de todo el gen para descartar la presencia de éste u otros cambios.

IX.4 Análisis de casos particulares

En relación al paciente 7, en este caso se identificó la mutación más frecuentemente reportada, la c.35delG en estado homocigoto. De forma interesante, llama la atención que a pesar de haberse encontrado la mutación en estado homocigoto, los padres no se conocen consanguíneos, ni provienen de comunidades endogámicas. Por este antecedente, sería interesante corroborar el estado de portadores heterocigotos en ambos padres, para así descartar que se trate de una mutación *de novo*, lo que sería importante para el asesoramiento genético de la familia.

Como se mencionó previamente en este caso la sordera se identificó mediante tamizaje auditivo neonatal, la paciente fue referida al Hospital Infantil de México antes de cumplir los 6 meses de edad, y fue operada de implante coclear al año de edad, actualmente la paciente se encuentra en tratamiento por parte del departamento de Audiología y Foniatría y ya logra a los 2 años 4 meses, lenguaje de palabras sueltas, dirigido. Lo cual nos ejemplifica la importancia de la detección oportuna de la sordera congénita y el impacto positivo que puede tener el programa de tamizaje auditivo neonatal que se realiza actualmente en nuestro país y que uno de los aspectos dentro del abordaje y manejo multidisciplinario de estos pacientes es el diagnóstico molecular y el asesoramiento genético, como de hecho se señala en las guías internacionales (*Joint commitee on infant hearing*, 2007).

En el caso del paciente 6 se detectó la mutación c.34G>T, en estado heterocigoto. Éste es un cambio previamente reportado (Grish V., 2007), pero que no se ha

demostrado bien su efecto, actualmente está clasificado como un cambio probablemente patológico.

Esta mutación de sentido equivocado, causa un cambio de glicina por cisteína en la posición 12 dentro de la cadena de aminoácidos (G12C). La glicina es un aminoácido que en su estructura tiene cadenas laterales alifáticas y es un aminoácido hidrofílico y polar; mientras que la cisteína es un aminoácido hidrofílico y polar, pero que en su estructura tiene cadenas laterales con átomos de azufre, esta última característica le confiere a éste aminoácido la capacidad de producir enlaces disulfuro por lo que puede alterar la estructura proteica.

Sin embargo, es de llamar la atención que el cambio de un aminoácido en esa misma posición (aminoácido 12), sí se conoce como patológico: la mutación G12R en estado heterocigoto, que se da por la transversión de una guanina por una citosina en el codón 12 es una de las causas del síndrome queratosis ictiosis sordera o KID por sus siglas en inglés (OMIM 148210), que como ya se mencionó es una enfermedad autosómica dominante (Richard G., 2002); sin embargo en esta mutación el cambio de aminoácidos si cambia una glicina que es un aminoácido polar y que en su estructura tienen cadenas laterales alifáticas por una arginina que tiene cadenas laterales con grupos básicos, a diferencia de la mutación G12C que se encontró en el presente trabajo que cambia por un aminoácido estructuralmente distinto pero con cargas similares como se mencionó previamente. Para asegurar que este cambio no sea un polimorfismo, se tendrían que analizar 100 alelos en controles normoyentes. Además, el fenotipo del paciente no recuerda en absoluto ninguna patología y en particular no tenía datos de KID, siendo considerado como un paciente con fenotipo normal y sordera congénita.

Éste cambio ha sido previamente reportado en pacientes con sordera congénita no sindrómica, en un estudio realizado por Putchá et al en el 2007, en el que analizaron los genes *GJB2* y *GJB6* en más de siete mil pacientes con sordera congénita no sindrómica en Estados Unidos, encontraron esta mutación como único cambio en el 0.4% de todas las mutaciones detectadas en estos dos genes. Sin embargo, falta conocer más al respecto del efecto que este cambio pudiera tener sobre la proteína.

El caso del paciente 12 es muy interesante, ya que se identificó una mutación, la inserción de una guanina en el codón 12, que no ha sido previamente descrita, por lo que, como ya se mencionó previamente, falta ampliar el análisis, pero por causar un corrimiento en el marco de lectura y codón de alto prematuro en el codón 67, es muy probable que se trate de una mutación causal de enfermedad.

En este caso la inserción se encontró en estado heterocigoto. Por lo que existen varias posibilidades a considerar:

No podemos descartar que este caso se trate de un heterocigoto compuesto, ya que como se mencionó previamente, no se realizó el análisis molecular de todo el gen, únicamente de dos fragmentos por RFLP's y uno por secuenciación, por lo que no conocemos la presencia o ausencia de una mutación en el otro alelo en otra región del gen, lo cual sí ha sido descrito (Welch K., 2007).

Otra consideración sería que se trate de un doble heterocigoto, ya que como se mencionó previamente las conexinas funcionan en grupos de 6 y se pueden unir a otras conexinas, en particular a la conexina 30 formando un conexón heteromérico, y se han descrito casos de dobles heterocigotos con una mutación en un alelo en el gen *GJB2* y otra mutación en un alelo de otro gen de esta familia, principalmente en el gen *GJB6*, que codifica para la conexina 30, y que como ya se mencionó se encuentra en el mismo locus (Stevenson V., 2007).

Otra posibilidad es que esta mutación, que no ha sido descrita previamente, sea una causa de sordera congénita no sindrómica con patrón de herencia autosómico dominante; ya que como ya se mencionó, mutaciones en el gen *GJB2* causan DFNB1 y en menor frecuencia DFNA3. En este aspecto es interesante que en este caso, no hay antecedentes heredofamiliares de sordera ni antecedente de consanguinidad, por lo que no es sugestivo de algún patrón de herencia en particular, de hecho en este caso sería interesante hacer la secuenciación en los padres para igualmente determinar en ellos si alguno presenta el cambio y dado que tienen fenotipo normal audiológico por lo que podría descartarse esta una herencia autosómica dominante.

En este caso la sordera se detectó después de año de edad, el paciente fue manejado con auxiliares auditivos y actualmente se encuentra en protocolo de estudio para implante coclear. Actualmente presenta lenguaje a través de señas, sonidos vocálicos, trata de imitar sonidos onomatopéyicos y sonidos silábicos con intención comunicativa. Esto muestra la diferencia en el desarrollo del lenguaje cuando hay una rehabilitación oportuna en comparación con otros casos más tempranos como es el caso de la paciente 7, la cual fue diagnosticada por tamizaje auditivo neonatal con intervención de manejo oportuno, lo que nos vuelve a demostrar el importante impacto del programa de tamizaje auditivo neonatal.

X. Conclusiones

En esta tesis se realizó el estudio clínico y molecular de pacientes con diagnóstico de sordera congénita no sindrómica atendidos en el HIMFG, se incluyeron 11 pacientes, en 5 de ellos fue posible identificar un cambio en la secuencia del gen *GJB2*, que corresponde al 45%.

Tanto el perfil sociodemográfico, como las características clínicas de los pacientes estudiados corresponden a lo reportado en la literatura, ya que no hay predominio por algún sexo y en la mayoría de los casos la sordera es prelocutiva, sensorineural profunda y bilateral.

Cuatro de ellos tienen antecedentes heredofamiliares sugestivos de herencia autosómica recesiva, siendo éste el patrón de herencia más frecuente en las sorderas congénitas no sindrómicas.

De los casos analizados en este trabajo de tesis, cuando se comparan aquellos pacientes diagnosticados por tamizaje auditivo neonatal, con aquellos a los que se les realizó un diagnóstico tardío es evidente una diferencia importante en el desarrollo del lenguaje ya que aquellos pacientes diagnosticados mediante tamizaje auditivo neonatal y que se les otorgó manejo oportuno, tienen un mayor desarrollo del lenguaje a diferencia del otro grupo de pacientes; lo cual nos demuestra la importancia del programa de tamizaje auditivo neonatal.

No se identificó ningún paciente con las mutaciones c.167delT y c.235delC.

Se identificó otra mutación que no ha sido reportada previamente, así como otro cambio que podría o no ser patológico, como ya se explicó previamente. En estos casos es importante determinar si estas mutaciones y polimorfismos son causales de enfermedad y su frecuencia en la población general.

En dos pacientes se identificó un polimorfismo previamente descrito; es importante conocer la frecuencia de este cambio ya que no hay estudios que demuestren los cambios en el gen *GJB2* en población mexicana.

En este estudio se analizaron únicamente dos SNP's por RFLP y se secuenció un fragmento de 210 nucleótidos, por lo que es importante completar la secuenciación de todo el gen y descartar la presencia de heterocigotos compuestos, así como estudiar el gen *GJB6* para detectar dobles heterocigotos, lo cual tiene importantes consecuencias en el asesoramiento genético.

Este trabajo, demuestra la importancia del estudio integral de los pacientes con sordera, desde su diagnóstico y manejo oportuno, y su estudio molecular lo que nos permite calcular los riesgos e identificar portadores para así otorgar un

asesoramiento genético al paciente y su familia; así como la importancia de estudiar este tipo de patologías que no han sido analizadas en población mexicana.

XI. Bibliografía:

American College of Medical Genetics. Genetics evaluation guidelines for the etiologic diagnosis of congenital hearing loss. *Genet Med.* 2002; 4:162–171.

Arnos K.S., Israel J. Cunningham M. Genetic counseling of the deaf. Medical and cultural considerations. *Ann N Y. Acad Sci.* 1991; 630:212–222.

Arnos K. The implications of genetic testing for deafness. *Ear Hear.* 2003; 24:324–331.

Bruce M Carlson. *Embriología Humana y biología del desarrollo.* Segunda edición. Harcourt. Madrid. 2000.

Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M.A., Wilcox, S A., Lench, N.J., Allen-Powell, D. R., Osborn, A.H., Dahl, H.H.M., Middleton, A., Houseman, M.J., Dode, C., Marlin, S., and 17 others. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Molec. Genet.* 1997; 6: 2173-2177.

García-Pedroza F., Peñaloza López Y., Poblano A. Los trastornos auditivos como problema de salud pública en México. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana.* 2003; 48:1

Fritsch, B., Beisel, K. *Mammalian Inner Ear Development: Of Mice and Man, in Cell Signaling and Growth Factors in Development: From Molecules to Organogenesis.* Wiley-VCH Verlag GmbH. 2008; Weinheim, Alemania.

Genetic Evaluation of Congenital Hearing Loss Expert Panel. *Genet Med.* 2002; 4:162–171.

Gerlach L.M., Hutson M., Germiller J.A., Nguyen-Luu D., Victor J., Barald K. Addition of the BMP4 antagonist, noggin, disrupts avian inner ear development. *Development.* 2000; 127, 45-54.

Goodenough D.A., Paul D.L. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1:2576.

Gravina L.P., Foncuberta M. E., Prieto M. E., Garrido J., Barreiro C., Chertkoff L. Prevalence of DFNB1 mutations in Argentinean children with non-syndromic deafness. Report of a novel mutation in GJB2. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010; 74:250-4.

Guyton Arthur C., Hall John E., *Tratado de fisiología médica.* McGraw Hill Interamericana. 2001. Madrid, España.

Hilgert N., Smith R.J., Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics. *Mutat Res.* 2009; 681:189–96.

Hoskins B.E., Cramer C.H., Silvius D., Zou D., Raymond R.M., Orten D.J., Kimberling W.J., Smith R.J., Weil D., Petit C., Otto E.A., Xu P.X., Hildebrandt F. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007; 80:800–4.

Iossa S., Marciano E., Franzé A. GJB2 Gene Mutations in Syndromic Skin Diseases with Sensorineural Hearing Loss. *Curr Genomics.* 2011; 12(7):475-785.

Joint committee on infant hearing. *The Volta Review.* 2007. 107-2: 141–189.

Kelley P.M., Harris D.J., Comer B.C., Askew J.W., Fowler T., Smith S.D, Kimberling W.J. Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) That Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62:792–799.

Kenna M. A. Additional Clinical Manifestations in Children With Sensorineural Hearing Loss and Biallelic GJB2 Mutations: Who Should Be Offered GJB2 Testing?. *Am J Med Genet Part A.* 2007; 143A:1560–1566.

Kontorinis G., Lenarz T., Lesinski-Schiedat A., Neuburger J. Cochlear implantation in Pendred syndrome. *Cochlear Implants Int.* 2011; 12:157-63.

Kwak B.R. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41: 103–116.

Lucotte G., Mercier G.. Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe. *Genet Test.* 2001; 5: 149–152. 34.

Luque E. *Biología Molecular e Ingeniería Genética.* El Sevier .Madrid. 2009.

Maeda S. et al. Gap Junctions. *Nature.* 2009; 597-602.

Martini. *Definitions, protocols and guidelines in genetic hearing impairment.* Primera edición. Whurr Publishers .Londres. 2001.

Martini. *Genetic and hearing impairment.* Segunda edición .Whurr publishers. Londres. 2006.

McHugh R.K., Freidman R.A. Genetics of Hearing Loss: Allelism and Modifier Genes Produce a Phenotypic Continuum. *The Anatomical Record*. 2006; 288A:370–381.

Morell R.J., Kim H.J., Hood L.J., Goforth L., Friderici K., Fisher R., Van Camp G., Berlin C.I., Oddoux C., Ostrer H., Keats B., Friedman T.B. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med*. 1998 ;339:1500–5.

Morle, L., Bozon, M., Alloisio, N., Latour, P., Vandenberghe, A., Plauchu, H., Collet, L., Edery, P., Godet, J., Lina-Granade, G. A novel C202F mutation in the connexin26 gene (GJB2) associated with autosomal dominant isolated hearing loss. *J. Med. Genet*. 2000; 37: 368-370.

Moore Kieth, Dalley Arrthur. *Anatomía con orientación clínica. Editorial médica Panamericana. España. 2000.*

Nejat M., Bahareh R. Statistical study of c.35delG mutation of GJB2 gene: A meta- analysis of carrier frequency. *Int J Audiology*. 2009; 48:363-370.

Oshima A., Doi T., Mitsuoka K., Maeda S., Fujiyoshi Y. Roles of Met-34, Cys-64, and Arg-75 in the assembly of human connexin 26: implication for key amino acid residues for channel formation and function. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 1807-1816.

Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., Bondurand, N. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum. Mutat*. 2010; 31: 1-16.

Poblano A, Arteaga C, García-Sánchez G. Prevalence of early neurodevelopmental disabilities in Mexico: a systematic review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009; 67:736-740.

Richard G., White T. W., Smith L. E., Bailey R. A., Compton J. G., Bale S. J. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum. Genet*. 1998; 103: 393-399.

Richard, G., Brown, N., Ishida-Yamamoto, A., Krol, A. Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2. *J. Invest. Derm*. 2004; 123: 856-863.

Sansović I., Knezević J., Matijević T., Balen S., Barisić I. Prevalence of the 35delG mutation in the GJB2 gene of patients with nonsyndromic hearing loss from Croatia. 2005 ;9:297-300.

Stevenson V.A., Ito M., Milunsky J.M.. Connexin-30 deletion analysis in connexin-26 heterozygotes. *Genet Test*. 2003; 7:151–4.

Strachan T., Andrew P. Read. *Human Molecular Genetics*. Tercera edición. Garland Publishing. 2004. Nueva York, Estados Unidos.

Tang H., Fang P., Ward P.A. DNA Sequence Analysis of GJB2, Encoding Connexin 26: Observations From a Population of Hearing Impaired Cases and Variable Carrier Rates, Complex Genotypes, and Ethnic Stratification of Alleles Among Controls. *Am J Med Genet Part A*. 2006; 140A:2401–2415.

Tu Z.J., Kiang D.T. Mapping and characterization of the basal promoter of the human connexin26 gene *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1443:169-81.

Tsukada K., Nishio S., Usami S., and the Deafness Gene Study Consortium. A large cohort study of GJB2 mutations in Japanese hearing loss patients. *Clin Genet*. 2010; 78: 464–470.

Usami S. Deafness Gene Study Consortium. A large cohort study of GJB2 mutations in Japanese hearing loss patients. *Clin Genet*. 2010; 78: 464–470.

Van Geel M., van Steensel M.A., Kuster W., Hennies H.C., Happle R., Steijlen P.M., Konig A. HID and KID syndromes are associated with the same connexin 26 mutation. *Br J Dermatol*. 2002; 146:938.

Van Laer L., Coucke P., Mueller R.F, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet*. 2001; 38:515–518.

Van Laer L., et al. A common founder for the 35delG GJB2 genemutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet*. 2001 ;38:515–518.

Welch K.O., Marin R.S., Pandya A., Arnos K.S. Compound heterozygosity for dominant and recessive GJB2 mutations: Effect on phenotype and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A:1567–1573.

White K.R. Early Hearing Detection and Intervention Programs: Opportunities for Genetic Services. *Am J Hum Genet*. 2004; 130A:29–36.

Wilcox S.A., Saunders K., Osborn A.H., Arnold A., Wunderlich J., Kelly T., Collins V., Wilcox L.J., McKinlay Gardner R.J., Kamarinos M., Cone-Wesson

B., Williamson R., Dahl H.H. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet.* 2000; 106:399–405.

Winbo A, Stattin E.L., Diamant U.B., Persson J., Jensen S.M., Rydberg A. Prevalence, mutation spectrum, and cardiac phenotype of the Jervell and Lange-Nielsen syndrome in Sweden. *Europace* .2012; 26.

Wu B., Va Lip M., Irons M., Platt O. Use of a Multiplex PCR/Sequencing Strategy to Detect Both Connexin 30 (GJB6) 342 kb Deletion and Connexin 26 (GJB2) Mutations in Cases of Childhood Deafness *Am J Med Genet.* 2003; 121A:102–108 .

Yan, D., Ouyang, X. M., Angeli, S. I., Du, L. L., Liu, X. Z. Paternal uniparental disomy of chromosome 13 causing homozygous 35delG mutation of the GJB2 gene and hearing loss. *Am J Med Genet.* 2007; 143A: 385-386.

Yuelin L. Assessing Parental Attitudes Toward Genetic Testing for Childhood Hearing Loss: Before and After Genetic Consultation. *Am J Med Genet Part A.* 2007; 143A:1546–1553.

Referencias electrónicas:

Ensembl: www.ensembl.org

OMIM: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

CONADIS: www.conadis.salud.gob.mx

Anexos

Anexo 1: Carta de consentimiento Informado

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DEPARTAMENTO DE AUDIOLOGÍA

Carta de consentimiento para participar en el protocolo de investigación:

**“CARACTERIZACION DE MUTACIONES EN LOS GENES *DFNB1/GJB2* EN NIÑOS
CON SORDERA CONGÉNITA DETECTADA POR TAMIZAJE AUDITIVO NEONATAL
EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ”**

INVESTIGADORES

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso.

Dra. Candy Sue Márquez Avila

Investigador Principal

Investigador Suplente

Departamento de Genética

Departamento de Audiología

Estimado paciente y/o tutor:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, el cual es una investigación que pretende conocer y entender mejor porque se presenta la enfermedad que tiene su hijo. Esta investigación estudia las características y los cambios

que pudiera haber en el material hereditario que contiene la información para un desarrollo adecuado de la audición y que, al haber cambios puedan estos causar alteraciones en este desarrollo. Por ello esta investigación puede proporcionarnos conocimientos que ayuden a otras personas en un futuro.

Queremos que usted sepa que participar en esta investigación es totalmente voluntario y que usted puede decidir no participar en el estudio y en este caso no perdería ninguna prestación a la que tiene derecho.

Si ustedes están de acuerdo en participar y dependiendo de la edad y condiciones de su hijo, además de explicarles a ustedes las características del estudio podemos también explicarle a él o a ella, las características del referido estudio y solicitar también su consentimiento.

En este estudio contamos con la autorización para incluir, además de los niños diagnosticados a través del análisis llamado tamizaje auditivo neonatal, a niños que tengan el diagnóstico de sordera congénita, aún cuando esta no haya sido diagnosticada en el periodo neonatal (al nacimiento) por el método de tamizaje.

En los párrafos siguientes se describe el estudio.

FINALIDAD DEL ESTUDIO: Su hijo tiene una alteración del desarrollo de la audición presente desde el nacimiento (congénita). Se sospecha que estas enfermedades tienen varias causas y una de ellas tiene que ver con alteraciones en el material hereditario, este material contiene la información para desarrollarnos. A la manera en que esta arreglada esta información se le llama gen y en el caso de las enfermedades mencionadas se piensa que un gen llamado *GJB2* (pero podrían ser otros) podría estar alterado o con cambios llamados y esto contribuiría a que se presentara la enfermedad. El propósito de este estudio es buscar los posibles cambios en el material genético de su hijo y el de ustedes, y saber si este gen está alterado, lo que nos ayudará a saber si realmente este gen tiene alguna participación en causar este tipo de enfermedades.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

Para este estudio, necesitamos tomarle a su hijo y a usted, una muestra de sangre, mediante el siguiente procedimiento:

1.- Con una jeringa desechable se le tomará a su hijo y a Usted una muestra de sangre de la vena del brazo, 1ml. Esta muestra será usada para el análisis de la molécula que contiene nuestros genes y se llama ADN.

2.- Queremos que sepa, que no daremos a conocer ninguna información acerca de usted ni de su familia que los pueda identificar, debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación y esta sí se publicará en revistas científicas internacionales.

BENEFICIOS: Se les dará a ustedes asesoramiento genético con toda la información que llegue a integrarse. Su colaboración permitirá obtener conocimiento que tal vez ayudará a otras familias que presenten problemas similares en un futuro.

RIESGOS Y MOLESTIAS: Los posibles riesgos de la extracción de sangre son los siguientes: molestia leve en el sitio por donde se le extrajo la sangre; a veces, la formación de moretones, desmayos y rara vez infección.

COSTOS: Tanto la extracción de muestras de sangre como las pruebas y cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación, así como los resultados no tendrán ningún costo para usted.

Si surgiera algún problema o tuviese usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá usted comunicarse con los médicos del departamento de audiología o genética o con el investigador principal al teléfono 52 28 99 17 ext. 2037. Si deseara hablar con alguien más acerca del protocolo, aparte de los investigadores relacionados, puede usted dirigirse a la Dirección de Investigación a la ext. 2163.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlos y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en el estudio.

México, D.F. _____ de _____ del _____

Nombre y firma del paciente _____

(De ser el caso)

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Dirección

Dirección

**EL PRESENTE DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO HA SIDO APROBADO PARA
USARSE ENTRE LOS DÍAS DE 2010 Y DE 2012**

Anexo 2: Extracción de DNA genómico

1. Lisis de Glóbulos Rojos: Se colocaron 300 μ L de sangre periférica en un tubo con 900 μ L de solución de lisis de glóbulos rojos, se invirtió varias veces y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó durante 20 segundos a 13000 revoluciones por minuto; se eliminó el sobrenadante y se agitó para resuspender el botón.
2. Lisis Celular: Se agregaron 300 μ L de lisis celular al botón previamente resuspendido. Utilizando la pipeta se agita hasta obtener una solución homogénea.
3. Precipitación de proteínas: Una vez obtenida la solución homogénea del paso dos; se agregó la solución de precipitación de proteínas, se agitó en el vórtex y se centrifugó a 1300 revoluciones por minuto durante 1 minuto.
4. Precipitación de DNA: El sobrenadante del tubo que salió en el paso 3 de la centrifuga, se transfirió a nuevo tubo que contenía 300 μ L de isopropanol, se invirtió el tubo 50 veces hasta que se observó el cúmulo de DNA. Posteriormente se centrifugo a 13000 revoluciones por minuto durante 1. minuto. Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante y se agregaron 300 μ L de etanol al 70%; se centrifugó a 13000 revoluciones por minuto por 1 minuto y se decantó el sobrenadante. Se colocó el tubo en un desecador a velocidad media durante 15 minutos.
5. Hidratación de DNA: Se resuspendió el DNA en 50 μ L de solución de hidratación y se incubó 1 hora a 60°C.

Cuantificación del DNA:

El DNA extraído se cuantificó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop®, en la que una unidad de densidad óptica corresponde a 50 mg/mL de DNA de doble cadena.

Para determinar la pureza, se utilizó la razón DNA/proteínas, en la que valores menores a 1.75 indican la presencia de proteínas.

Determinación de la Integridad del DNA

Para confirmar la integridad del DNA ya cuantificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Anexo 3: Reacción en cadena de polimerasa (PCR):

La PCR es una técnica de biología molecular basada en la expansión logarítmica de una secuencia de DNA o RNA conocida.

Etapas de la PCR:

1. Desnaturalización: Separación de las dos cadenas de DNA por medio de calentamiento. Se aplica una temperatura de 94 a 97°C durante 15 a 30 segundos.
2. Alineamiento: También llamada templado; en esta etapa se enfría por debajo de la T_m para permitir la hibridación de las cadenas sencillas con los oligonucleótidos (*primers*, cebadores) correspondientes. Se aplica una temperatura de 55 a 68°C por 30 a 60 segundos.
3. Elongación: Es la etapa de amplificación, la DNA polimerasa termoestable. Se lleva a cabo a una temperatura intermedia de 68 a 72° C.

Estas etapas forman 1 ciclo de PCR, este ciclo se repite entre 25 y 35 veces, para lograr una acumulación exponencial de la secuencia a estudiar.

Los componentes de la PCR son:

- DNA blanco: Corresponde el DNA a amplificar.
- Taq Polimerasa: Es una DNA polimerasa, termoestable. Es una enzima recombinante extraída de *Thermusaquaticus*, esta DNA polimerasa presenta una tasa de incorporación de nucleótidos de aproximadamente 150 nucleótidos por segundo.
- Oligonucleótidos: También llamados cebadores o *primers*, son secuencias complementarias a la cadena blanco que delimitan la región a amplificar; deben de tener una longitud de 18 a 25 nucleótidos, tener un contenido de guanina y citosina del 5%0 a 60%.
- Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's): Son las bases que se van a incorporar para la amplificación; se utiliza una mezcla con los cuatro dNTP's: dATP, dCTP, dGTP y dTTP.
- Cloruro de Magnesio: El magnesio es cofactor de la Taq Polimerasa.
- Amortiguador:

Para la amplificación de los fragmentos estudiados, se utilizó:

- 2.5 μ l de Amortiguador.
- 0.5 μ l de DNPT's a 10mMol.
- 0.75 μ l de $MgCl_2$ a 50mMol.
- 1.0 μ l de Oligonucleótido F a 10pMol.
- 1.0 μ l de Oligonucleótido R a 10pMol.
- 0.2 μ l de Taq Polimerasa.
- 20 ng de DNA.

Las temperaturas utilizadas para los ciclos de la reacción fueron:

- Desnaturalización inicial: 96 °C por 2 minutos.
 - Desnaturalización: 96 °C por 30 minutos.
 - Alineamiento: 58.3 °C por 30 minutos.
 - Extensión: 72 °C por 30 minutos.
- 
- Se repitió por 35 ciclos y posteriormente permaneció a 72 °C por 10 minutos para la extensión final.

Anexo 4: Reacción de secuenciación:

Como ya se mencionó para la identificación de la mutación del35G, se realizó la técnica de secuenciación directa.

Esta técnica permite determinar la secuencia de nucleótidos exacta de un fragmento. La técnica utilizada en esta tesis es una técnica modificada de la descrita por Sanger.

Primero, se purificó el producto de PCR, por el método de ExoSAP-IT®, el cual elimina el exceso de oligonucleótidos y nucleótidos, ya que éstos pueden interferir en la reacción de secuenciación. Una vez purificado el producto, se llevó a cabo la reacción de secuenciación. Los reactivos utilizados para esta reacción fueron:

- Big Dye 3.1 (Applied Biosystems ®) : 8 µl
- Oligonucleótidos: 5 pMol.
- Producto de la reacción de PCR: 20 ηg.
- Se ajustó a un volumen final de 20 µl.

Las condiciones que se utilizaron para la reacción fueron:

- Desnaturalización inicial: 95 °C por 5 minutos.
- 25 ciclos:
 - Desnaturalización: 95 °C por 30 segundos.
 - Alineamiento: 58 °C por 10 segundos.
 - Extensión: 60 °C por 4 minutos.

Una vez terminada la reacción, esta se purificó mediante columnas CENTRI-SEP® por el método de filtración en gel para recuperar fragmentos de DNA mayores a 16 pb y eliminar hasta el 98% de sales nucleótidos trifosfatados y otros compuestos de bajo peso molecular.

Posteriormente, se colocaron en el secuenciador ABI PRISM 310®. En este, los productos de cadena sencilla de diferentes longitudes son separados por electroforesis en capilar. El secuenciador detecta la fluorescencia emitida por cada uno de los fluoróforos que permiten la identificación de las cuatro bases ya que cada uno de los fluoróforos emite una luz a diferente longitud de onda cuando es excitado por el láser de Argón, lo que permite la detección de dichas bases en una sola inyección del capilar. El software del equipo reproduce las señales recibidas como un electroferograma que corresponde a la secuencia de nucleótidos.

Anexo 5: Reacción de restricción:

Como ya se comentó, para el análisis de las mutaciones c.167delT y c.235delC se realizó la técnica RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica).

Para el análisis de la mutación c.167delT se utilizó la enzima *Pst*I (Fermentas®).

Para el análisis de la mutación c.235delC, se utilizó la enzima *Apa*I (Fermentas®).

Las condiciones utilizadas para la reacción de restricción fueron:

- 2.5µl de amortiguador.
 - 0.2 µl de enzima de restricción.
 - 7.3 µl de agua.
 - 15 µl de producto de PCR.
- 
- Volumen final de 25 µl.

Las temperaturas utilizadas fueron:

- Incubación: 37 °C por 3 horas.
- Inactivación: 65 °C por 20 minutos.
- Mantenimiento: 4 °C

Para identificar si se realizó el corte de enzimático se corrió en un gel de agarosa al 2% durante 120 minutos a 100 volts, y fueron visualizados bajo luz UV.

