



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "EDUARDO LI CEAGA" O.D.

SECRETARÍA DE SALUD

**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES ASOCIADOS A LA
HIPOACUSIA AUTOSÓMICA RECESIVA POR MEDIO DE MLPA Y
EXOMA EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS**

TESIS

PARA **OPTAR POR** EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

M. EN C. MIRNA MARTINEZ SAUCEDO

ASESOR DE TESIS: DR. SERGIO CUEVAS COVARRUBIAS

Hospital General de México, SSA.

COMITÉ TUTORAL: DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI

Instituto Nacional de Medicina Genómica

DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR

Hospital General de México, SSA.

Ciudad de México, febrero 2017.



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.

ÍNDICE

1. SIGLAS Y ABREVIATURAS	4
2. RESUMEN	5
3. ANTECEDENTES	7
3.1 Mecanismo de la audición normal	8
3.2 Hipoacusia y genes	14
3.2.1 <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i> : DFNB1	16
3.2.2 <i>SLC26A4</i> / DFNB4	16
3.2.3 <i>WFS1</i> : DFNA6 /14/38 y el síndrome de Wolfram	17
3.3 Diagnóstico	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
5. JUSTIFICACIÓN	21
6. HIPÓTESIS	22
7. OBJETIVO GENERAL	22
8. OBJETIVOS PARTICULARES	22
9. METODOLOGIA	
9.1 DISEÑO DE ESTUDIO	23
9.2 UNIVERSO DE TRABAJO	23
9.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN	24
9.4 VARIABLES DEL ESTUDIO	25
9.5 VALORACIONES MÉDICAS	25
9.6 ESTUDIO MOLECULAR	
a) Obtención de la muestra	26
b) Extracción de DNA	27
c) Verificación de la calidad del DNA.	28
9.7 TECNICA DE MLPA	28

9.7.1 Principios de la prueba de MLPA	29
9.7.2 Protocolo realizado con MLPA	30
9.8 SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO	
9.8.1 Selección de los genes candidatos y mutaciones	32
9.8.2 Confirmación de las mutaciones por medio de secuenciación tipo Sanger	33
9.8.3 Técnica de electroforesis.	33
9.8.4 Purificación de muestras	34
9.8.5 Reacción con BigDye terminator para secuenciación de DNA	35
9.8.6 Purificación y análisis de las secuencias	36
10. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	38
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
12. RESULTADOS	
12.1 MLPA	39
12.2 RESULTADOS DEL EXOMA	41
13. DISCUSIÓN	47
14. CONCLUSIONES	52
15. REFERENCIAS	54
16. ANEXOS	58

1. SIGLAS Y ABREVIATURAS

dB. Decibeles

Hz. Hertz

HNNS. Hipoacusia neurosensorial no sindrómica

AR. Autosómico recesivo

DFN. Deafness

DFNA. Hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica dominante

DFNB. Hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva

EAV. Ensanchamiento del acueducto vestibular

MLPA. Multiplex ligation-dependent probe amplification

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

SCE. Secuenciación completa del exoma

AGRADECIMIENTOS

En breve, quiero agradecer en primer lugar a mi tutor el Dr. Sergio Cuevas C. ya que en todo este tiempo ha sido una guía constante y paciente en mi aprendizaje y pilar fundamental para la realización de éste proyecto. Infinitamente agradecida.

A CONACYT por becarme ya que sin ello yo no hubiese podido continuar con mis estudios de posgrado.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Alessandra Carnevale Catoni y al Dr. Adolfo Martínez Tovar por sus acertadas observaciones y consejos durante cada uno de los coloquios.

A todos los participantes en los seminarios de investigación pues gracias a sus comentarios se fue mejorando el protocolo hasta lograr los objetivos deseados.

Por último y no menos importante, a mi familia por animarme a seguir adelante con mis estudios y no dejarme vencer en el camino, por su paciencia y comprender que debería estar lejos de ellos para seguir mis sueños.

2. RESUMEN

La pérdida auditiva es uno de los trastornos sensorineurales más comunes, afectando a uno de cada 500-1000 recién nacidos. Aproximadamente la mitad de estos casos tienen una base genética.

Las alteraciones auditivas son causadas tanto por factores ambientales como genéticos y la proporción de casos que pueden ser atribuidos a causas hereditarias aumenta en forma continua. En más de la mitad de los casos la causa de la sordera es genética, de éstos, 70% se clasifican como no sindrómicos siendo la transmisión autosómica recesiva la más frecuente.

A pesar del progreso en la identificación de genes relacionados con la sordera, las causas genéticas de la hipoacusia neurosensorial no sindrómica, a menudo siguen siendo poco claras debido a la extrema variación étnica-específica y a la heterogeneidad genética.

En un trabajo previo, se realizó el análisis molecular de los genes *GJB2* y *GJB6* en 60 pacientes mexicanos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica. De estos pacientes, en 54 no se encontró la causa genética de la sordera por lo que se decidió analizar, mediante la prueba de

amplificación múltiple dependiente de ligación (MLPA por sus siglas en inglés) a aquellos casos a los que se les identificó con un solo alelo mutado en el gen *GJB2* ya que esta técnica es rápida, eficiente y de bajo costo e incluye 5 genes frecuentemente asociados a la HNNS.

Además en el presente trabajo se aplicó la secuenciación completa del exoma para investigar en los casos familiares, los posibles genes implicados en la sordera.

Con la técnica de MLPA solamente se confirmó el estado heterocigoto para mutaciones en el gen *GBJ2* en los 21 pacientes previamente estudiados, no encontrando pérdidas o ganancias en el resto de los genes analizados (*GJB6*, *GJB3*, *POU3F4* y *WTS1*).

Mientras que al total de las 5 familias a las cuales se les aplicó la SCE se lograron identificar las mutaciones en los genes implicados en la HNNS. Además se contribuyó al conocimiento de la diversidad de mutaciones en el gen *GJB2* con la publicación de una trimutación en heterocigotos compuestos (p.S19R/ p.R32S/p.E47* y p.F31I/p.W44*/p.V84M) en dos familias mexicanas con HNNS.

3. ANTECEDENTES

La hipoacusia es el padecimiento sensorial más frecuente a nivel mundial. Se estima que uno de cada 500 recién nacidos vivos presentan alguna discapacidad auditiva causada por una variedad de factores tanto ambientales como genéticos.

Los factores genéticos representan 60% de los casos y se presenta clínicamente sin otro fenotipo adicional y el resto (40%) por múltiples factores, tales como medicamentos ototóxicos, prematurez, sufrimiento fetal, infecciones pre y posnatales, hiperbilirrubinemia, traumatismos craneales, etc.¹

Dada la complejidad del oído interno, es de esperarse que la sordera humana también lo sea. De ahí que las alteraciones auditivas de origen genético o hereditarias las podemos estudiar desde varios puntos de vista para su clasificación.

De acuerdo a su modo de presentación las dividimos en *no sindrómicas*, en éstas no se manifiestan otras alteraciones médicas, aunque pueden presentar anomalías en el oído medio o interno, representan el 70%. Y las *sindrómicas* (30%), cuando se asocian con malformaciones del oído externo o con manifestaciones en otros órganos o sistemas como lo es la ceguera (síndrome de Usher), bocio (Pendred) o nefritis (síndrome de Alport), por mencionar algunos, ya que actualmente se reconocen aproximadamente 400 síndromes en los cuales la hipocusia es un componente clínico.²

La hipoacusia autosómica recesiva no sindrómica es la más común (80%), le sigue la hipoacusia autosómica dominante (12-15%), las ligadas al cromosoma X (1-5%) y las de herencia materna por mutaciones en el ADN mitocondrial (1-5%).³

Las características clínicas de este tipo de hipocausias hereditarias siguen un patrón similar aunque hay que tener precaución en hacer generalizaciones al respecto ya que pueden haber excepciones. La hipoacusia de herencia autosómica recesiva es por lo general *prelingual* (presente al nacimiento o congénita) va de severa a profunda, no progresiva. Por su parte, las de herencia autosómica dominante se caracterizan por ser *postlinguales* es decir, comienzan después del habla normal variando ampliamente en la edad de inicio, desde la adolescencia hasta la cuarta o quinta década de la vida y son rápidamente progresivas. En cambio, las ligadas al cromosoma X pueden ser pre o post linguales.⁴

Por el sitio anatómico puede ser *conductiva*, caracterizada por anormalidades del oído externo y/o de los huesecillos del oído medio; *neurosensorial*, debida a la alteración de estructuras del oído interno tales como la cóclea; *mixta*, la combinación de hipoacusia conductiva y neurosensorial y por último *central*, causada por daño o disfunción a nivel del octavo nervio craneal, del tallo o la corteza cerebral.⁵

Otra forma de clasificar el daño auditivo es de acuerdo a su severidad. Puede ser leve 20–40 dB, moderada 41–70 dB, severa 71–95 dB o profunda >95 dB. O bien por el rango de sus frecuencias: baja (500 Hz), media (501-2000 Hz), alta (más de 2000-8000 Hz) y alta ampliada (> 8000 Hz).⁶

3.1 MECANISMO DE LA AUDICIÓN NORMAL

La generación de estímulos auditivos en el ser humano es un proceso complejo, el cual se desarrolla en tres etapas básicas:

- Captación y procesamiento mecánico de las ondas sonoras.
- Conversión de la señal acústica (mecánica) en impulsos nerviosos, y transmisión de dichos impulsos hasta los centros sensoriales del cerebro.
- Procesamiento neural de la información codificada en forma de impulsos nerviosos.

La captación, procesamiento y transducción de los estímulos sonoros se llevan a cabo en el oído propiamente dicho, mientras que la etapa de procesamiento neural, se localiza en el cerebro.

Se distinguen dos partes del sistema auditivo: la región periférica, en la cual los estímulos sonoros viajan como ondas mecánicas hasta el momento de su conversión en señales electroquímicas, y la región central, en donde el cerebro interpreta dichas señales, por ejemplo, como habla o música.⁷

El sistema auditivo consiste de oído externo, el cual incluye el pabellón auricular y el conducto auditivo externo; de oído medio y de oído interno (cóclea o caracol). Las ondas sonoras pasan a través del pabellón auricular y del conducto auditivo externo hacia la membrana timpánica, las vibraciones de ésta son transmitidas a través del oído medio al oído interno por una cadena de tres huesecillos, el martillo, el yunque y el estribo. La base del estribo está adyacente a la ventana oval de la cóclea, su movimiento trasmite las ondas sonoras al oído interno.^{8,9}

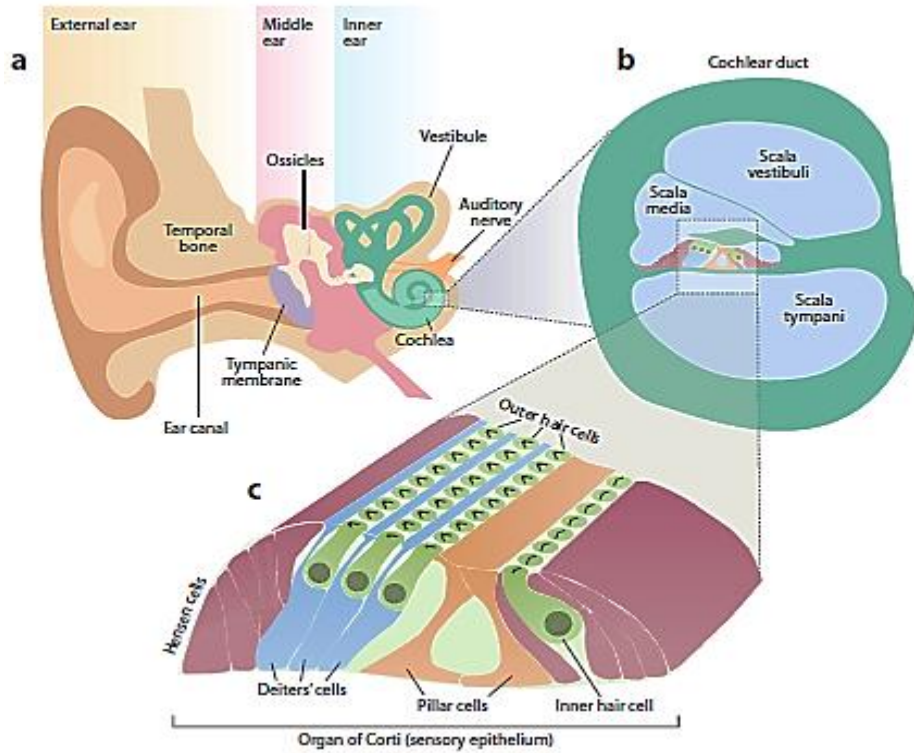


Figura 1. Ilustración esquemática del oído humano. (Referencia 8)

La cóclea (Figura 2) es el sitio en donde la energía mecánica de los ondas sonoras es convertida en potenciales de acción del nervio coclear, iniciando así la transmisión de la información auditiva hacia los centros del tronco cerebral y a centros superiores en la corteza cerebral, proceso necesario para la comprensión e interpretación de los sonidos.^{9,10}

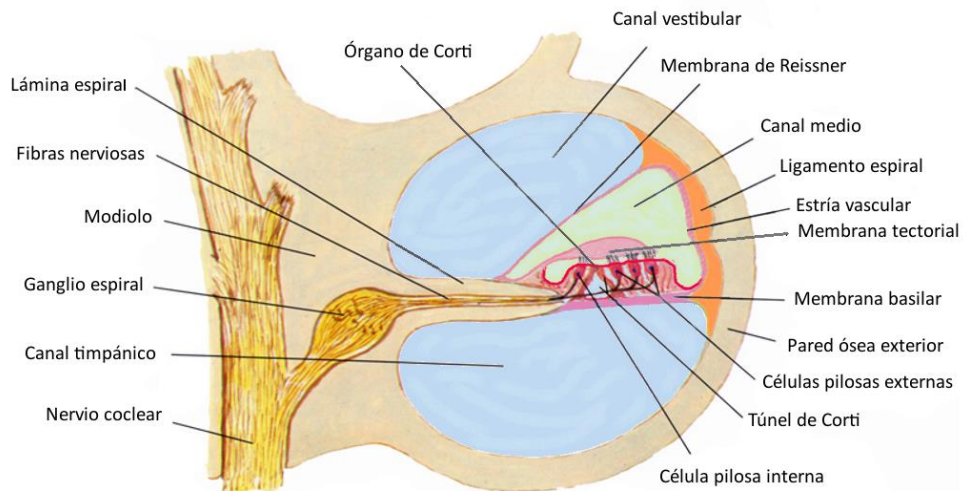


Figura 2. La cóclea.

La cóclea está localizada en la porción petrosa del hueso temporal, tiene forma de espiral o caracol y mide aprox. 35mm, en su longitud está dividida en tres compartimentos: la escala vestibular, la escala media y la escala timpánica (*figura 3*). La escala vestibular y la timpánica, están llenas de un líquido, la perilinfa, de composición diferente a la endolinfa. La escala media, contiene endolinfa con altas concentraciones de potasio y bajas concentraciones de sodio; esta discrepancia en la composición electrolítica de los líquidos del oído interno genera una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de las células ciliadas, que juega un papel central en el proceso de transducción de la información que se lleva a cabo en la cóclea.^{10,11}

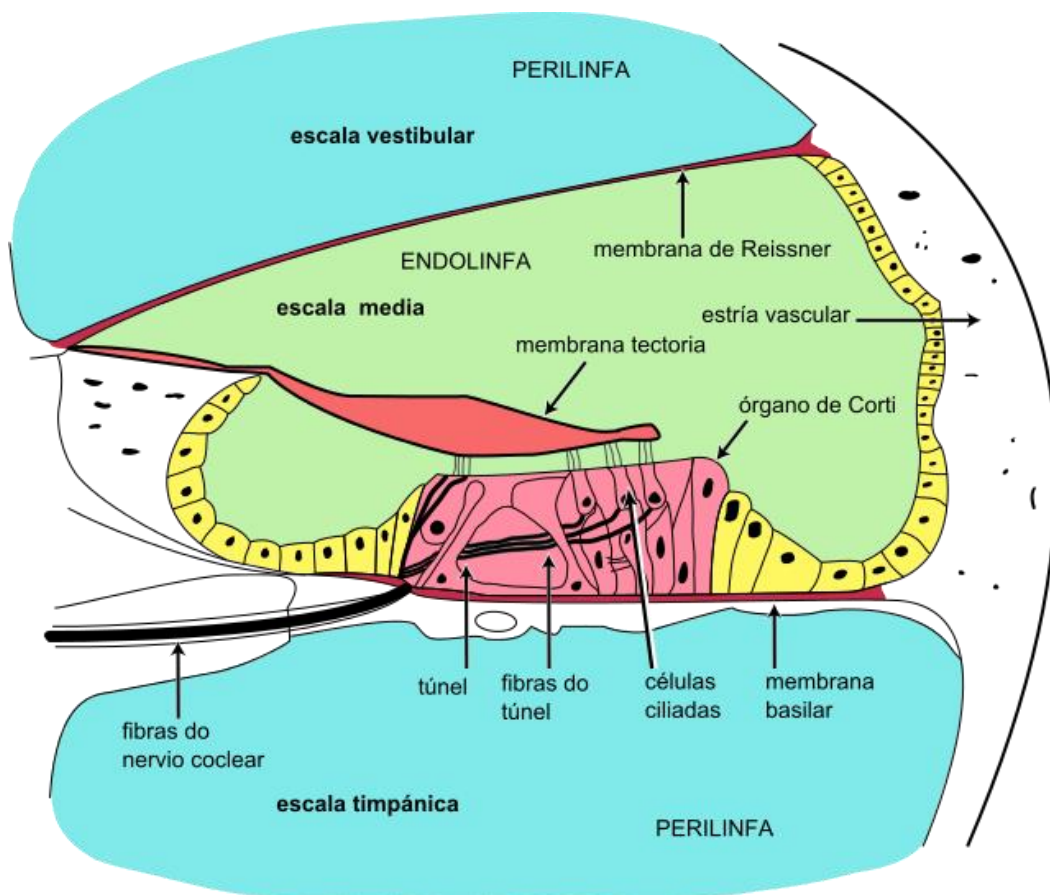


Figura 3. Compartimentos de la cóclea. (Referencia 13)

Los receptores auditivos son las células ciliadas del órgano de Corti, las cuales son de dos tipos: internas y externas.

Las células ciliadas internas son los receptores primarios y reciben la mayoría de las fibras aferentes del nervio coclear; las células ciliadas externas, reciben la mayor parte de la información eferente del mismo nervio, tienen por función promover la discriminación de frecuencia y amplificación de la señal, de forma que modulan el funcionamiento del receptor primario.

Las ondas retransmitidas desde la membrana timpánica hacia la escala vestibular de la cóclea mueven la membrana basilar causando la deflexión de los estereocilios contra la membrana tectoria (*figura 4 y 5*). La deflexión de los estereocilios conduce a la apertura de canales iónicos que permiten la entrada de potasio al interior de la célula ciliada induciendo su despolarización. La despolarización celular genera la activación de canales de calcio conllevando a la movilización de vesículas sinápticas y posterior liberación del neurotransmisor en el espacio sináptico; de esta forma se inicia la activación del nervio coclear.^{12,13}

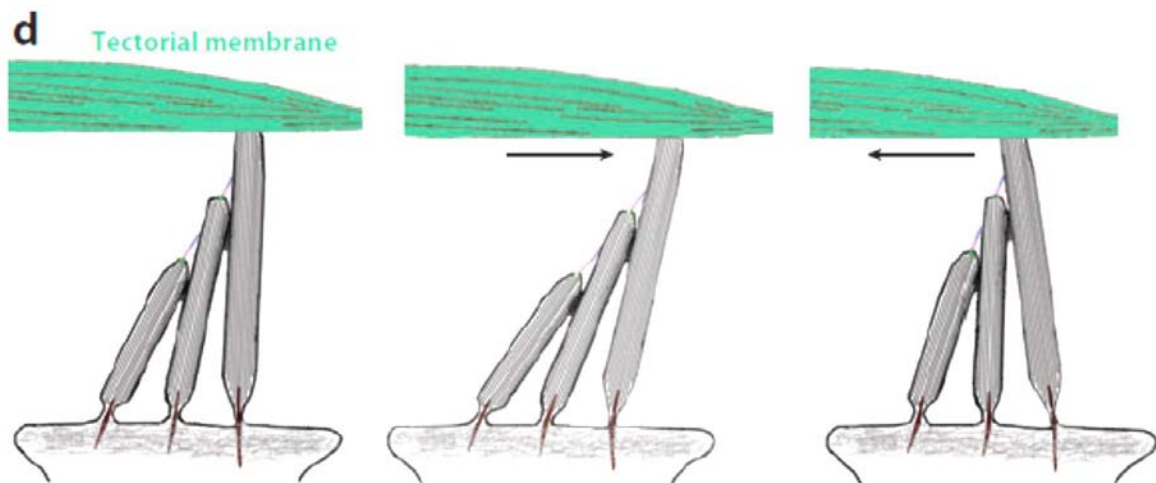


Figura 4. Los estereocilios. (Referencia 12)

Por el contrario, cuando los 8 cilios se doblan en la dirección opuesta, la conductividad de la membrana disminuye y se inhibe la generación de dichos impulsos.

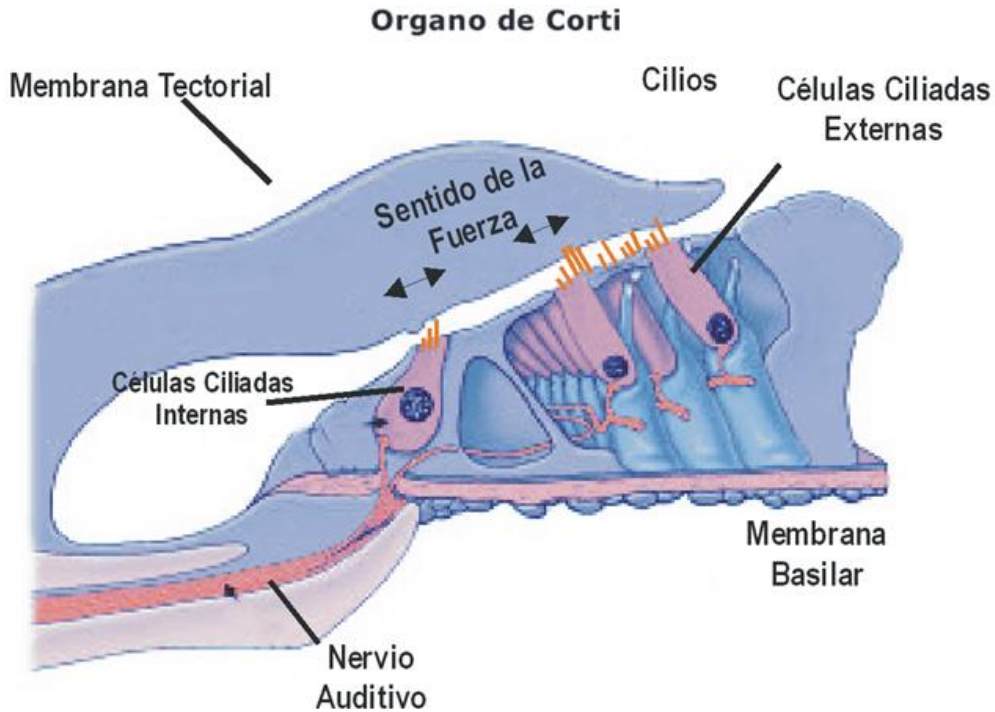


Figura 5. Órgano de Corti. (Referencia 13)

Para mantener el funcionamiento de la célula ciliada, los iones de potasio que entran en su interior deben salir, además debe mantenerse una alta concentración a nivel de la endolinfa (figura 6). Con el fin de mantener este proceso se lleva a cabo un mecanismo de reciclaje del potasio mediante el cual estos iones salen de la célula ciliada a nivel de su membrana basolateral por un canal de potasio, alcanzando las células de soporte del órgano de Corti. Posteriormente difunden en forma pasiva de célula a célula a través de uniones gap, compuestas por una proteína multimérica, denominada conexina, presente en las células de soporte del órgano de Corti, células del limbo y del ligamento espiral. Una vez que los iones de potasio alcanzan la estría vascular son activamente bombeados hacia la endolinfa por canales de potasio dependientes de voltaje.¹⁴

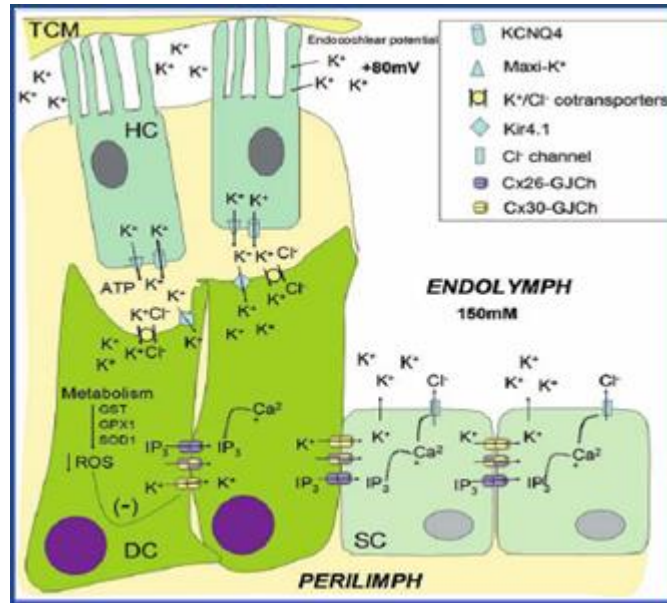


Figura 6. Recaptura de K⁺ en la cóclea. (Referencia 14)

Los desplazamientos de iones y los cambios en la resistencia eléctrica del epitelio sensorial de la cóclea dan origen a los potenciales que se conocen como microfónicos cocleares. Estos potenciales se producen como consecuencia de los desplazamientos de iones entre la endolinfa y la perilinfa. Las CCE tienen normalmente un potencial más negativo (-70 mV) que las CCI (-40 mV).

La disminución en el potencial interno de las células ciliares internas provoca la activación de las terminales nerviosas aferentes, generándose un impulso nervioso que viaja hacia el cerebro. (Figura 7).¹⁵

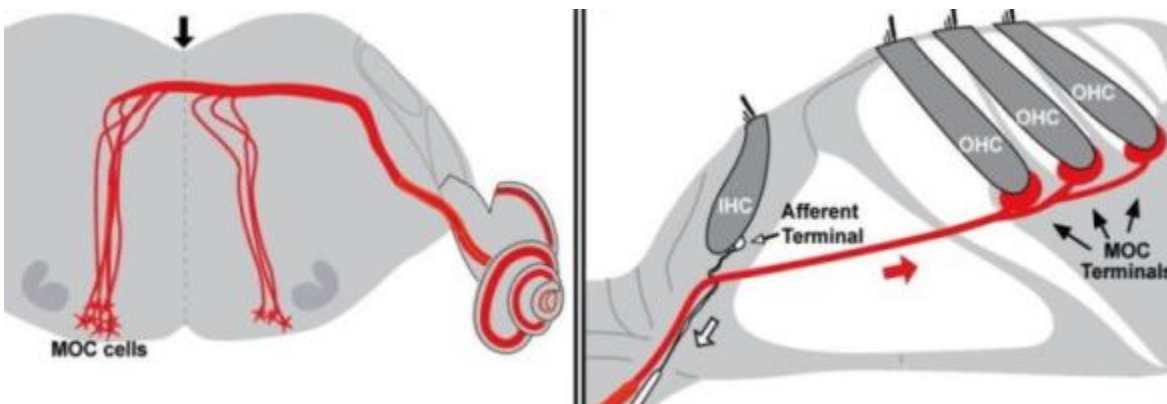


Figura 7. Corteza auditiva. (Referencia 15)

3.2 HIPOACUSIA Y GENES

En la actualidad, han sido indentificados un poco más de 80 genes y 140 loci como responsables de hipoacusia no sindrómica.¹⁶

La nomenclatura de cada uno de estos loci está definida por la forma de herencia en la que se transmite la patología. Aquellos locus donde se encuentren genes que produzcan hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica dominante se denominarán **DFN** (DeaFNess) seguido por una **A**, numerados con base al orden de su identificación, actualmente van del 1 al 67; las formas de herencia autosómica recesiva con una **B** (**DFNB**), numerados del 1 al 105; las formas ligadas al cromosoma X se denominan **DFNX** numerados del 1 al 6. (Figura 8).¹⁷

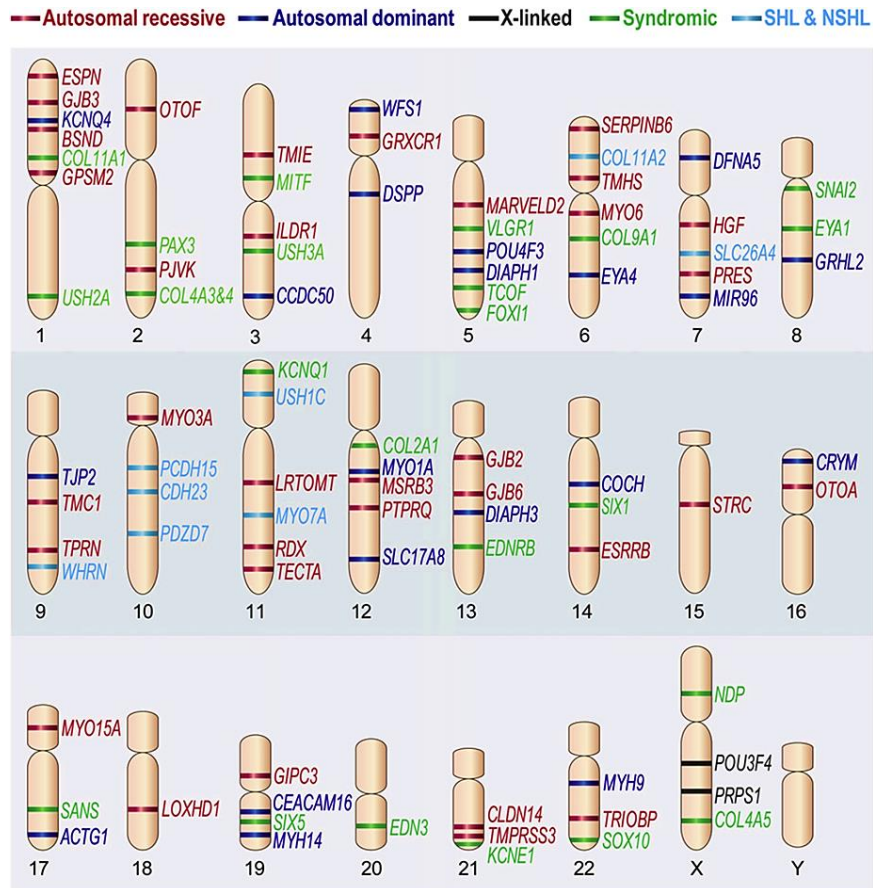


Figura 8. Genes causantes de hipoacusia. Representación esquemática de algunos genes que se asocian con hipoacusia no síndromica autosómica recesiva (rojo), autosómico dominante (azul) y ligada la X (negro); hipoacusia síndromica (verde) y aquellos involucrados tanto en hipoacusias síndromicas como no síndromicas (azul marino). *Tomado de la referencia 9.*

La comprensión de la correlación genotipo-fenotipo de las hipoacusias no síndromicas es un gran desafío debido a la heterogeneidad clínica y genética extrema, su expresividad variable y en algunos casos su penetrancia incompleta.¹⁸ Las mutaciones en amplios subconjuntos de genes le confieren a la hipoacusia hereditaria una mayor complejidad y dificultan la identificación de su etiología genética.

Para aclarar las bases moleculares de un proceso tan complejo y delicado como lo es la audición se requiere una comprensión fundamental de los genes que participan

en ella. A continuación se hará un breve resumen de los genes más frecuentemente implicados en las hipoacusias hereditarias.^{19, 20} (Ver anexos 1, 2, 3, 4)

LOCUS/GEN	PROTEINA	FUNCIÓN
HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDROMICA AUTOSOMICA RECESIVA		
DFNB1/ <i>GJB2</i>	Conexina 26	Homeostasis de iones
DFNB4/ <i>SLC26A4</i>	Pendrina	Homeostasis de iones
DFNB3/ <i>MYO15A</i>	Miosina XVa	Proteína motora poco convencional
DFNB9/ <i>OTOF</i>	Otoferina	Exocitosis en la sinapsis auditiva
DFNB12/ <i>CDH23</i>	Cadherina 23	Unión lateral y en la punta (adherencia)
DFNB36/ <i>TMC1</i>	TMC1	Proteína transmembranal
HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDROMICA AUTOSOMICA DOMINANTE		
DFNA6/14/38/ <i>WFS1</i>	Wolframina	Homeostasis de iones
DFNA2/ <i>KCNQ4</i>	KCNQ4	Homeostasis de iones
DFNA9/ <i>COCH</i>	Cochlina	Estructura del limbo espiral
DFNA3/ <i>GJB2</i>	Conexina 26	Homeostasis de iones
DFNA48/ <i>MYO1A</i>	Miosina Ia	Transporte
DFNA21/ <i>TECTA</i>	Tectorina A	Estructura y estabilidad de la membrana tectoria
HIPOACUSIA LIGADA AL X		
DFN3/ <i>POU3F4</i>	POU3F4	Factor de transcripción
DFN2/ <i>PRPS1</i>	Fosforribosilpirofosfato	Biosíntesis de purina y pirimidina
HIPOACUSIA MITOCONDRIAL		
12S rRNA/MT-RNR1		Traducción del RNA
tRNA ^{Ser} (UCN)/MT-TS1		Traducción del RNA

3.2.1 *GJB2* y *GJB6*: DFNB1

Las conexinas son una familia de proteínas responsables de la formación de canales intercelulares. Cuando estos canales se agrupan dan lugar a las denominadas uniones tipo hendidura (gap junctions). Su correcto funcionamiento es necesario para el mantenimiento de la homeostasia iónica y metabólica de la cóclea.²¹

En algunas poblaciones se considera que las mutaciones en *GJB2* son la etiología más frecuente de sorderas hereditarias. Una mutación específica, 35delG, es responsable de ~50- 70% de las mutaciones patológicas del gen de la conexina 26. En los caucásicos, la frecuencia de portadores de esta mutación es de 1:45, mientras que en otras poblaciones estudiadas es del 1-3%.²²

Algunas familias han sido descritas con mutaciones heterocigotas compuestas es decir, mutaciones en los genes GJB2 y GJB6. Este último gen codifica para la conexina 30, y se han identificado dos deleciones del(GJB6-D13S1830) y del(GJB6-D13S1854) y suponen la segunda causa de hipoacusia hereditria prelingual en población caucásica principalmente española.²³

Otros genes que con mayor frecuencia se asocian a las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas son por orden de frecuencia: SLC26A4, MYO15A, OTOF, CDH23, y TMC1. Para cada uno de estos genes se han descrito por lo menos 20 mutaciones.

Con respecto a la hipoacusia no sindrómica autosómica dominante, se incluyen los genes WFS1, MYO7A Y COCH.²⁴

3.2.2 SLC26A4/ DFNB4

Varios de estos genes también están implicados en la hipoacusia sindrómica, por ejemplo, el gen *SLC26A4* y el síndrome de Pendred (SP) ambos comprenden un espectro fenotípico que va de sordera con o sin otros hallazgos clínicos. El SP se caracteriza por sordera neurosensorial severa a profunda bilateral, con disfunción vestibular variable, anomalías en los huesos temporales y desarrollo de bocio (a menudo eutiroides).

Mutaciones en *SLC26A4* se pueden encontrar en aproximadamente 50% de los individuos afectados con SP o DFNB4. Estos son a menudo heterocigotos compuestos para variantes en *SLC26A4*.

Se ha descrito herencia digénica con el gen *FOXI1* (<1% de los individuos afectados) y el gen *KCNJ10* (<1% de los individuos afectados), lo que sugiere heterogeneidad genética.²⁵

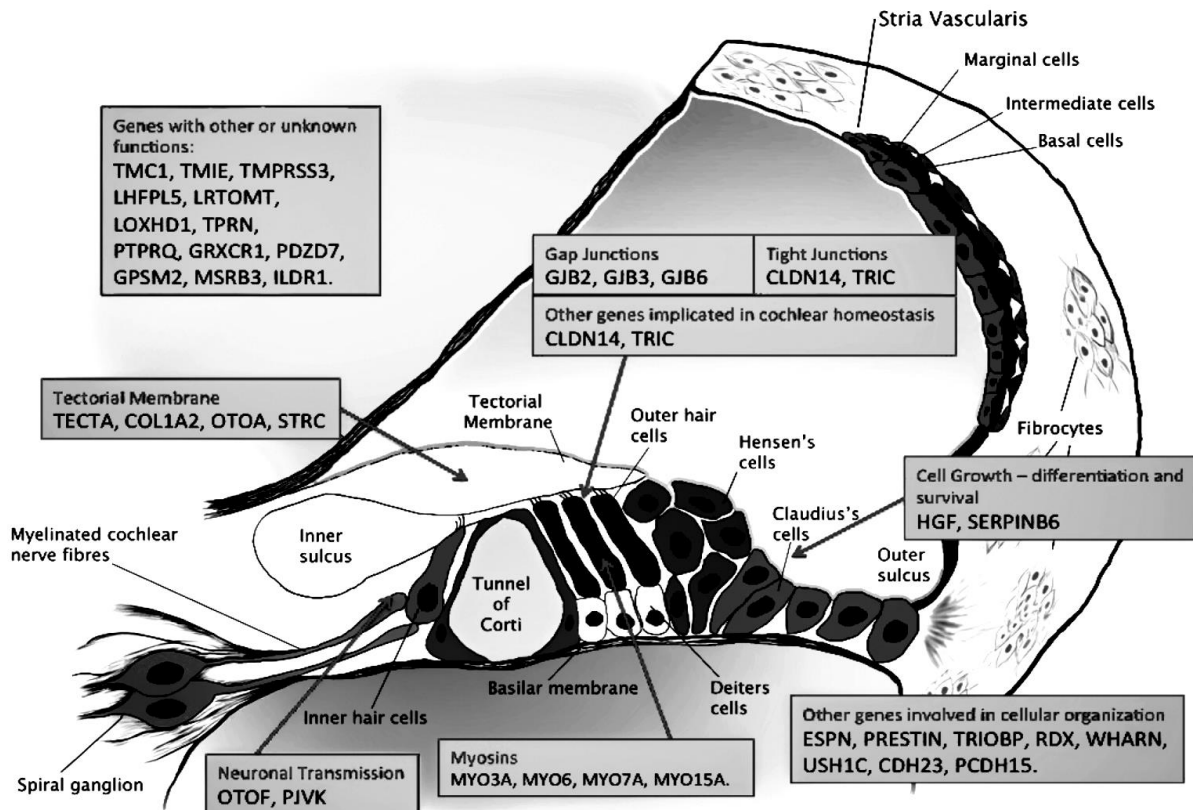
3.2.3 WFS1: DFNA6 /14/38 y el síndrome de Wolfram

Las mutaciones en el gen *WFS1* están asociados con hipoacusia autosómica dominante, que afecta las bajas frecuencias en el audiograma.

Además, existen mutaciones en el mismo gen que se asocian con el síndrome de Wolfram, una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva, caracterizada por

la diabetes mellitus tipo 1, atrofia óptica y sordera progresiva (DIDMOAD) (OMIM 222300).

La siguiente es una representación esquemática de 42 genes implicados en la hipoacusia neurosensorial autosómica recesiva donde se propone el sitio donde el producto proteico lleva a cabo su función en la fisiología auditiva.²⁶ (Figura 9).



3.3 DIAGNÓSTICO

La evaluación de las hipoacusias o sorderas debe ir encaminada en distinguir entre las que son por causas adquiridas y las de origen genético.²⁷

Es importante iniciar con una historia clínica detallada para identificar los factores de riesgo pre y postnatales que pudieran contribuir a su etiología, así como ahondar acerca de los antecedentes familiares (al menos 3 generaciones siendo enfáticos en la consanguinidad).

La exploración física juega un papel importante para la distinción de aquellos rasgos dismórficos, haciendo énfasis en los oídos y cuello, piel, cabello, ojos y extremidades; todo con la finalidad de revelar alguna causa sindrómica.

Además de lo anterior, existe una serie amplia de exámenes que complementan la evaluación clínica dirigida a este tipo de pacientes como lo son:

- La serología y cultivo para descartar alguna infección congénita.
- Examen de oftalmología como lo es la agudeza visual y el fondo de ojo dilatado para buscar retinopatía pigmentaria, signos de infección congénita o malformaciones de desarrollo ocular. Electroretinografía si se sospecha en retinopatía pigmentaria o examen vestibular pensando en insuficiencia vestibular.
- Análisis de orina, (proteinuria) para descartar nefritis o síndrome nefrótico.
- La ecografía renal para revelar displasia renal (hipoparatoriodismo, síndrome braquio-oto-renal)
- TC Neuro-imagen y / o resonancia magnética, para excluir acueductos vestibulares dilatados y malformación de Mondini.
- ECG si la pérdida de audición es congénita y severa / profunda, en busca del intervalo QT prolongado (especialmente si no se retrasan los hitos motores).
- Audiometría en familiares de primer grado, para determinar si más de una generación está afectada.
- Contemplar el examen vestibular (hipofunción en el síndrome de Usher tipo 1, síndrome de Jervell y Lange-Nielsen, síndrome de Pendred, DFNA9 (COCH), DFNA11 (MYO7A), DFNB2 (MYO7A), DFNB4 (SLC26A4), DFNB12 (CDH23).

En todo paciente, las pruebas fisiológicas son fundamentales ya que determinan objetivamente el estado funcional del sistema auditivo y se pueden realizar a cualquier edad.²⁸ Estos incluyen los siguientes: Potenciales auditivos evocados, emisiones otoacústicas evocadas y las pruebas de impedancia (timpanometría, umbrales de reflejo acústico, fatiga del reflejo acústico).

Por otra parte, la audiometría determina subjetivamente cómo el individuo procesa la información auditiva, es decir, si oye. Incluye las siguientes: Pruebas de comportamiento, que incluyen la audiometría observacional conductual y audiometría de refuerzo visual; audiometría de tonos puros (conducción aérea y

ósea), audiometría condicionada por juego, para niños de 2.5 a 5 años de edad y audiometría convencional para mayores de 5 años.

El programa del tamiz auditivo neonatal ayuda a identificar, de manera temprana, si las condiciones auditivas de los recién nacidos son deficientes desde las primeras horas después de nacidos, lo que posibilita una atención inmediata al problema audiológico pues las estructuras corticales pueden modelarse y van madurando.²⁹

En las sorderas genéticas, además de las evaluaciones y exámenes antes mencionados, se aplican pruebas genéticas moleculares pues desempeñan un papel destacado en el diagnóstico y asesoramiento genético.

El análisis molecular de un solo gen se basa en datos epidemiológicos y / o fenotípicos. Por ejemplo, las pruebas de genética molecular para *GJB2* (conexina 26) y *GJB6* (conexin 30); se realizan en aquellas personas con sordera neurosensorial no sindrómica autosómica recesiva, que son la causa de aproximadamente el 50% de los casos.

Sin embargo, existe una amplia heterogeneidad genética y fenotípica en este tipo de sorderas, lo que dificulta su diagnóstico usando técnicas de detección de un solo gen. Por esta razón, se han desarrollado paneles de detección multi-genes. Cabe mencionar que estos paneles de detección varían según el laboratorio tanto en las técnicas utilizadas y el número de genes secuenciados.³⁰ Algunos laboratorios solo analizan las variantes más frecuentes en algunos cuantos genes, mientras que otros laboratorios secuencian todos los genes implicados en la HNNS.

La secuenciación del exoma (WES por sus siglas en inglés) y la secuenciación del genoma completo (WGS) se pueden considerar si el fenotipo no es suficiente para justificar las pruebas genéticas dirigidas a genes específicos. Tanto WES y WGS deben complementarse con un asesoramiento genético apropiado antes y después de la prueba.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según datos de la OMS, 5% de la población mundial tiene algún grado de disfunción auditiva; es decir, 360 millones de personas y de estos, 32 millones son niños. Estamos hablando de que 5 de cada 1000 recién nacidos vivos tienen una hipoacusia profunda o sordera; siendo ésta, por lo tanto, una de las enfermedades congénitas más comunes. La mayoría de estos niños viven en países de bajos y medianos ingresos como lo es México.

La hipoacusia infantil es un problema importante de salud por las repercusiones que tiene en el desarrollo emocional, académico y social del niño ya que gracias a la adquisición del lenguaje, en los primeros años de vida, en el cerebro humano es cuando se da la mayor plasticidad neuronal, donde la información adquirida a través de la audición es básica para el desarrollo normal de la corteza cerebral y permite la apropiación global y automática del lenguaje así como de los procesos cognitivos generales.

Se estima que aproximadamente 60% de los casos es debido a mutaciones en un solo gen y corresponden a la hipoacusia neurosensorial no sindrómica autosómica recesiva (HNNSAR) sin embargo esto varía de acuerdo a la población estudiada. Hasta el momento, no quedan claras las diferencias clínicas que se han encontrado entre los demás genes implicados en los mecanismos fisiopatológicos de la pérdida de la audición ya que mutaciones en un mismo gen producen sorderas de distintos grados (expresividad variable) en miembros de una misma familia así como mutaciones en genes distintos pueden producir una misma manifestación clínica (heterogeneidad genética) lo que dificulta la correlación fenotipo-genotipo.

Lo anterior complica el estudio molecular de las sorderas congénitas ya que si clínicamente no hay datos adicionales que permitan deducir un gen candidato, realizar un estudio a ciegas de cualquiera de ellos eleva los costos que ello implica, así como la alta posibilidad de obtener resultados negativos haciendo aún más difícil el asesoramiento genético a las familias que lo solicitan.

5. JUSTIFICACIÓN

La identificación de la causa genética que origina hipoacusia o sordera permite al médico tomar mejores decisiones en el tratamiento y en el control de la enfermedad. En los casos de hipoacusia neurosensorial no sindrómica, la información genética puede ayudar a predecir si la pérdida auditiva permanece estable o si empeora con el transcurso del tiempo.

El conocimiento de la biología molecular de las hipoacusias es útil para determinar qué tipo de daño puede ocurrir en el oído interno, su diagnóstico temprano y el posible manejo del paciente, ya sea a través de un implante coclear u otro dispositivo auditivo. Por ejemplo, los pacientes con mutaciones en los genes *GJB2* o *GJB6* se benefician más de los implantes cocleares que los pacientes sin mutaciones en ellos, con resultados frecuentemente excelentes.^{31, 32}

Los pacientes con hipoacusias hereditarias con predominio en tonos agudos y medios, estables a lo largo del tiempo, se sabe que pueden ser candidatos al uso de implantes cocleares más cortos, apoyados por audífonos.³³

Además de permitir mejores elecciones de tratamientos, la información genética facilita de alguna manera el asesoramiento genético a las familias con algún miembro afectado, incluso es un apoyo para identificar a los posibles portadores y su modo de herencia a las siguientes generaciones.

Así mismo, con la identificación de numerosos loci y genes involucrados en la pérdida auditiva, se ha avanzado en el conocimiento de las hipoacusias. Sin embargo, en nuestro país aún no se profundiza en el estudio de éstas y se desconoce la prevalencia de las mutaciones y qué genes están implicados con mayor frecuencia. Es por ello que, sin duda, se necesitan realizar estudios tendientes a aclarar la situación de nuestro país con respecto a las causas de sordera congénita de origen genético.

En un estudio previo hecho en el hospital general de México, donde se analizaron los dos genes más frecuentemente implicados (*GJB2* y *GJB6*), 55% de los pacientes estudiados no presentaron mutaciones en estos genes, lo que nos llevó a la siguiente

pregunta de investigación: ¿Cuáles genes están implicados en la hipoacusia neurosensorial no sindrómica prelingual y qué tipo de mutaciones se presentan en una muestra de pacientes mexicanos?

6. HIPOTESIS

Por medio de MLPA y secuenciación del exoma, llegaremos a saber de algunos genes implicados en la hipoacusia neurosensorial no sindrómica en una muestra de pacientes mexicanos.

7. OBJETIVO GENERAL

Identificar genes asociados a la hipoacusia neurosensorial no sindrómica en una muestra de pacientes mexicanos.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

Aplicación del MLPA para el análisis y caracterización de defectos moleculares en los pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica que son alelos silvestres y heterocigotos para los genes GJB2 y GJB6 en una muestra de pacientes mexicanos.

Aplicación de exoma para el análisis y caracterización de defectos moleculares en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica en los casos familiares en una muestra de pacientes mexicanos.

9. METODOLOGÍA

9.1 DISEÑO DE ESTUDIO

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

9.2 UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluyeron 54 pacientes no relacionados con sordera moderada a profunda, bilateral, prelingual no sindrónica que acudieron al Servicio de Audiología y al Servicio de Genética del Hospital General de México.

Los pacientes provenían del Distrito Federal 18 (33.33%), Estado de México 28 (51.85%), Hidalgo 2 (3.70%), Querétaro 3 (5.55%), Guerrero 2 (3.70%) y uno de Veracruz (1.85%).

Cuarenta y nueve fueron casos esporádicos y 5 casos familiares.

El promedio de edad fue de 12.2 con un rango de 12 meses a 25 años, 25 hombres y 29 mujeres.

A estos pacientes se les realizó, con anterioridad, el estudio molecular de los genes *GJB2* y *GJB6* para el protocolo de maestría. Se buscaron mutaciones en ambos genes por medio de secuenciación, resultando heterocigotos para el gen *GJB2* 21 casos y alelos silvestres 33 casos; en el caso del gen *GJB6* todos alelos silvestres.

MUTACIONES EN <i>GJB2</i>	PACIENTES	MUTACIONES EN <i>GJB6</i>
HETEROCIGOTOS		
c.35delG/wt	10	
p.V84M/wt	5	
p.V63A/wt	1	
p.S19R/wt	2	
p.F31I/wt	3	
NORMAL Wt/Wt	20	54
POLIMORFISMO V27I	13	NA
TOTAL DE SUJETOS	54	54

También se incluyeron como controles a 100 sujetos fenotípicamente y audiológicamente sanos (estudiantes de pregrado, médicos residentes de distintas especialidades del Hospital General de México y voluntarios que acuden a donar sangre para distintos protocolos a la unidad de farmacología clínica).

9.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Inclusión:

Familias con dos o más hijos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica prelingual que se desconozca la causa recesiva de la enfermedad.

Casos aislados de hipoacusia neurosensorial no sindrómica prelingual que son alelos silvestres y heterocigotos para los genes *GJB2* y *GJB6* en una muestra de pacientes mexicanos.

Audiometría con registro de hipoacusia neurosensorial moderada a profunda bilateral.

Exclusión:

- 1.- Pacientes con hipoacusia de causa no hereditaria o sindrómica o de tipo conductiva.
- 2.- Pacientes que no deseen participar en el estudio.

Eliminación:

- 1.- Familias en las que no se completen los estudios genético y/o audiológico.
- 2.- Cuando no sea posible el procesamiento de las muestras.

9.4 VARIABLES DEL ESTUDIO

a) Dependiente:

Mutaciones detectadas en las regiones codificantes de todo el genoma de cada paciente.

b) Independiente:

Pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica.

9.5 VALORACIONES MÉDICAS

Previo consentimiento informado sobre su participación en este protocolo, cada caso fue sometido a los siguientes estudios:

Evaluación audiológica:

a) Audiometría tonal. Se les realizó a ambos padres de cada caso o propósito así como a los pacientes mayores de 5 años de edad.

b) Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral. Para los pacientes de 1 a 4 años de edad.

Evaluación genética:

a) Historia clínica.

b) Exploración física, haciendo énfasis en la búsqueda de fenotipos sugerentes de algún síndrome.

c) Árbol genealógico.

d) Toma de muestra de 10 ml de sangre periférica a los afectados, y en quienes fue posible a sus padres, para la obtención de DNA y el análisis de las mutaciones, mediante la técnica de MLPA para los casos esporádicos o aislados y secuenciación del exoma completo para los casos familiares.

En cuanto al grupo control, bajo consentimiento informado, se les realizaron las evaluaciones antes mencionadas para ser incluidos en el protocolo.

Evaluación paraclínica:

- a) Tomografía de oído interno. Se les realizó a los 5 pacientes con un hermano afectado y en aquellos casos esporádicos a los que les fue posible pagar el estudio.

A todas las familias se les entregó copias de sus resultados de todos los estudios y se les orientó sobre la mejor opción terapéutica audiológica y de desarrollo del lenguaje para los afectados.

9.6 ESTUDIO MOLECULAR

a) Obtención de la muestra.

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

b) Extracción de DNA.

Se utilizó el método salino para la extracción de DNA.

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

- Centrifugamos el contenido del tubo eppendorf a 11,000 rpm por 30 minutos a 4 °C.
- Preparamos un tubo de ensayo con 4 ml de etanol al 100%. Después del centrifugado vaciamos el contenido del tubo eppendorf al tubo de ensayo, posteriormente podremos observar el DNA precipitado.
- Tomamos el DNA de los tubos con una pipeta Pasteur cuya punta sellamos con calor, y lo sumergimos brevemente en otro tubo de ensayo con etanol al 70% para retirar el exceso de proteínas.
- Dejamos la pipeta con el DNA secar cerca del mechero, y posteriormente lo resuspendemos en un tubo eppendorf de 500 µl con 150 a 300 µl de agua estéril.

c) Verificación de la calidad del DNA.

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

- Colocamos los tubos eppendorf con el DNA en un termoblock a 50°C por aproximadamente dos horas. Esto para asegurar la homogeneidad de la mezcla y la desnaturalización del DNA.
- Preparamos un gel de agarosa al 0.8% con tantos pocillos como muestras de DNA tengamos.
- Mezclamos 3 µl de DNA más 1 µl de buffer de carga y lo colocamos en uno de los pocillos del gel. Lo dejamos correr en la cámara de electroforesis a 70 volts.
- Para cuantificar el DNA se utilizó el NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (Thermo Scientific). La concentración se detectó con el software que mide la densidad óptica a 260 y 280 nm.

9.7 TECNICA DE MLPA

La prueba de amplificación múltiple dependiente de ligación (MLPA por sus siglas en inglés) analiza en una sola reacción arriba de 50 secuencias de DNA y detecta variaciones en el número de copias de genes específicos incluyendo pequeños rearrreglos intragénicos.

9.7.1 Principios de la prueba de MLPA

MLPA es un ensayo de PCR múltiple que utiliza más de 40 sondas, cada una específica para diferentes secuencias de DNA (principalmente exones del gen de interés), para evaluar el número relativo de copias de cada secuencia de DNA.

Cada sonda está compuesta de dos semi-sondas (semi-sonda 5' y 3'), consisten en una secuencia blanco específica y una secuencia de cebador universal lo que permite la amplificación de manera simultánea de todas las sondas en la PCR múltiple.

La reacción de MLPA se divide en cinco pasos:

- (1) Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas.
- (2) Reacción de ligación.
- (3) Amplificación por PCR.
- (4) Separación de productos de amplificación por electroforesis.
- (5) Análisis de datos.

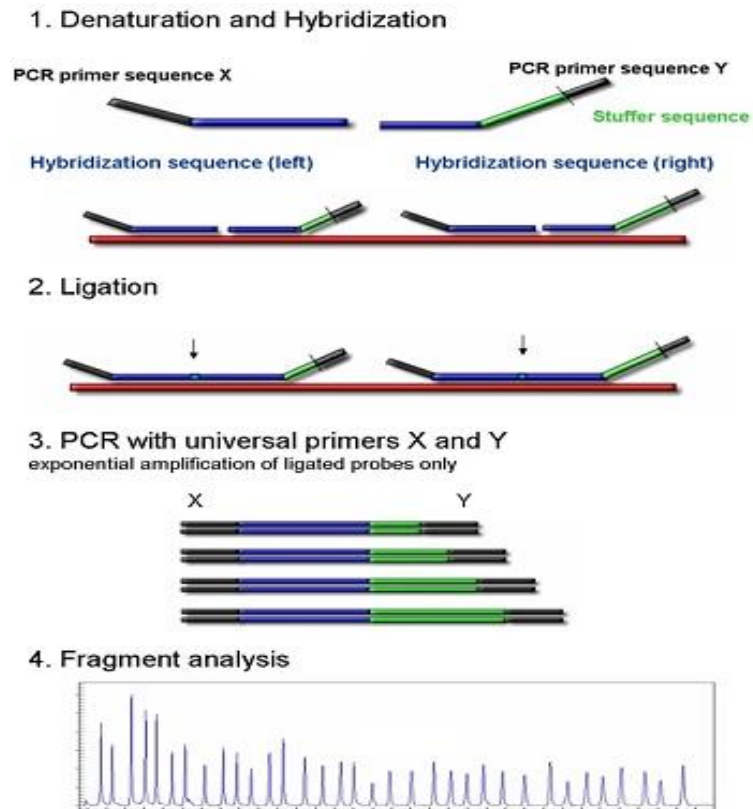


Figura 10. Tomada de la página <https://mlpa.com>

La amplificación por PCR se realiza utilizando sólo un par de cebadores, uno de los cuales está marcado fluorescentemente. Debido a que sólo las sondas ligadas se amplificarán durante la reacción de PCR subsiguiente, el número de productos de ligación de sonda es una medida del número de secuencias diana en la muestra. Los productos de PCR se separan después por tamaño usando electroforesis capilar bajo condiciones desnaturizantes. Se mide la altura o el área de los picos de fluorescencia derivados de la PCR, cuantificando la cantidad de producto de PCR después de la estandarización y comparándola con muestras de DNA control, indicando así la cantidad relativa de secuencia de DNA diana en la muestra de DNA. La calidad de la reacción se evalúa por la presencia de picos de control que proporcionan información acerca de la eficiencia de la amplificación y la correcta cantidad de DNA usada en la reacción. Un punto clave en la MLPA es que la PCR no amplifica las secuencias diana sino las sondas ligadas. Por lo tanto, se usa un par de cebadores para la amplificación, a diferencia de una PCR múltiple la cual requiere el uso de cebadores específicos para cada secuencia diana.

9.7.2 Protocolo realizado con MLPA

Se llevó a cabo la técnica de MLPA con el kit comercial de la empresa MCR-Holland llamado SALSA® MLPA® P163-D1 probemix el cual contiene sondas para todos los exones de los genes *GJB2* y *GJB6*, para el gen *GJB3* son cuatro sondas; dos sondas para el gen *POU3F4*, así como 6 sondas dirigidas a regiones conservadas 1 Mb río arriba de este último gen. También incluye sondas para cada uno de los 8 exones del gen *WFS1*.

En total son 48 sondas con productos de amplificación entre 127 y 500 nt. Contiene 9 fragmentos control, cuatro fragmentos de cantidad de DNA (fragmentos Q) a 64-70-76-82 nt, tres fragmentos de control de desnaturización (fragmentos D) a 88-92-96 nt; un fragmento X a 100 nt y un fragmento Y a 105 nt.

Se incluyeron 49 muestras que corresponden a los casos esporádicos.

- 1) Desnaturización de DNA.
 - a. Se colocan 5 µl del DNA problema en cada tubo previamente rotulado. Mismo procedimiento para los controles.

- b. Desnaturalizar por 5 minutos a 98°C y atemperar a 25°C
- 2) Reacción de hibridación.
 - c. Se mezclan en el vórtex el buffer de MLPA y la sonda antes de usarlos.
 - d. Tomar 1.5 µl de cada uno, homogeneizar en el vórtex y agregarlo a cada tubo del DNA.
 - e. Incubar 1 minuto a 95°C más 16-20 horas a 60°C, detener a 54°C 25 minutos.
- 3) Reacción de ligación.
 - f. Mezclar en el vórtex los buffers de ligasa A y B.
 - g. Tomar 3 µl de cada uno y hacer un mastermix de ligasa.
 - h. Agregar al mastermix de ligasa 25 µl de dH₂O y 1 µl de ligasa.
 - i. Agregarlo al tubo de DNA.
 - j. Incubar por 15 minutos a 54°C más 5 minutos a 98°C, detener a 20°C 5 minutos.
- 4) Reacción de PCR.
 - k. Mezclar en el vórtex el mastermix de PCR.
 - l. Atemperar en la mano y tomar 2 µl para hacer un mastermix con 0.5 µl de polimerasa y 7.5 µl de dH₂O.
 - m. Colocar el mastermix de polimerasa en cada tubo de DNA.
 - n. 35 ciclos:
 - 95°C 30 segundos.
 - 60°C 30 segundos.
 - 72°C 60 segundos.
 - o. 72°C 20 minutos.
 - p. 15°C pausa.
 - q. Retirar del termociclador y conservar a 4°C una semana y a -20°C para periodos más largos en la oscuridad.
- 5) Separación de los fragmentos de hibridación por medio de electroforesis capilar.
 - r. Los productos obtenidos de la PCR se cuantificaron por electroforesis capilar en un analizador ABI 3130, modificando tiempo de inyección, tiempo de corrida y voltaje de corrida.
- 6) Análisis de datos.
 - s. Se realizó con el software Coffalyser V 1.0 aplicación propia de MRC-Holland.

9.8 SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO

9.8.1 Selección de los genes candidatos y mutaciones

Esta técnica se empleó para los casos familiares en donde habían dos hermanos afectados con sordera congénita previamente elegidos cuidadosamente con los criterios de inclusión anteriormente mencionados. En total fueron 5 propósitos, uno por familia.

Se enviaron 5 µg de DNA genómico a la empresa Axeq Technologies para la secuenciación del exoma completo (SEC) usando SureSelect Human All Exon 50 Mb kit (Agilent Technologies) la cual llevó a cabo la validación de las muestras, la preparación de las bibliotecas, técnica de enriquecimiento, agrupación y secuenciación de exón, usando illumina HiSeq 2000 Sequencer.

El diseño del exoma cubre 51 Mb del genoma humano correspondiente a los exones y regiones intrónicas flanqueantes de 20 766 genes (220 000 exones) en la secuencia de referencia humana UCSC (hg19 / GRCh37, publicada en febrero de 2009).

Posteriormente, aproximadamente 63,000,000 lecturas de tamaño promedio de 107 bp por muestra se nos enviaron en dos archivos fastq (un archive por orientación). Cada par de archivos fastq se alinearon con el genoma humano (hg19) usando Novoalign (<http://www.novocraft.com>). Todos los parámetros se mantuvieron en la configuración predeterminada, como recomienda Novocraft.

Se empleó SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) (Li et al., 2009) para ordenar los archivos SAM, crear archivos BAM y generar sus archivos de índice.

Se usó Picard (<http://picard.sourceforge.net/>) para eliminar todos los PCR duplicados de los archivos BAM.

El Genome Analysis Toolkit(GATK) (McKenna et al., 2010) se usó para realineamientos locales, de la base de calidad y variantes. Los parámetros se ajustaron como se describe en GATK's Best Practices v3.

GATK generó archivos llamados variantes estándar (VCF <http://www.1000genomes.org/wiki/Analysis/Variant%20Call%20Format/vcf-variant-call-format-version-41>). Los archivos VCF fueron anotados usando snpEff (snpeff.sourceforge.net) (Cingolani et al., 2012) y ANNOVAR (Wang et al., 2010).

A partir de este punto, nuestro análisis se centró sólo en las variantes codificantes no sinónimas putativas. Se eliminaron lo que se conoce como falsos positivos por medio de un filtro el cual verifica que cada variante cumpla con una calidad de mapeo >30, una calidad de base >20 y una cobertura >= 10 y la presencia de variantes en lecturas de ambas orientaciones.

Las variantes comunes se eliminaron utilizando la información de alelos de frecuencia de la NHLBI ESP (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>).

Una variante común se definió como variante presente en el ESP con una frecuencia alélica menor de más del 1%. Cada variante se anotó como *posible efecto funcional en la proteína* usando tres predictores de efectos variantes: SIFT (Kumar et al., 2009), PolyPhen-2 (predicción de efectos funcionales de nsSNPs humanos, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) (Adzhubei et al., 2010) y MutationTaster (www.mutationtaster.org) (Schwarz 2010).

Un segundo análisis se limitó a aquellas variantes que pudieran tener un efecto en la secuencia de codificación de proteínas, incluyendo cambios de codón no sinónimas, variantes de cambio en el marco de lectura, variantes en el sitio de empalme y deleciones e inserciones.

Adicionalmente aplicamos filtros para considerar algunos potenciales patrones de herencia:

- a) De novo. Variante nueva presente en el paciente pero en ninguno de los padres.
- b) Homocigoto (recesivo). Variante candidata única presente en estado homocigoto en el paciente y heterocigoto en cada uno de los padres.
- c) Heterocigoto compuesto. Dos o más variantes candidatas en un solo gen con al menos una variante candidata única presente en cada uno de los padres.
- d) Ligada al X en pacientes masculinos. Variante candidata heredada por vía materna en el cromosoma X.

9.8.2 Confirmación de las mutaciones por medio de secuenciación tipo Sanger

Las variantes candidatas observadas vía SEC fueron confirmadas usando la técnica de secuenciación tipo Sanger para validar cada mutación probablemente deletera y para confirmar su presencia en estado homocigoto, heterocigoto compuesto o digénico (según sea el caso) en cada paciente afectado así como el estado heterocigoto en los padres y hermanos no afectados; además en 100 controles sanos.

Los cebadores fueron diseñados usando el programa BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Ver anexos, tabla 3) y las secuencias de referencia se tomaron de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

9.8.3 Técnica de electroforesis.

Es la migración del DNA a través de un gel al aplicarse un campo eléctrico, en base a su carga y peso. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite analizar los productos de PCR por visualización de la banda deseada.

Para cada producto de PCR se prepara un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio.

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

9.8.4 Purificación de muestras

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

Utilizamos resina y buffers Qiaex II.

- Una vez visualizada en el transluminador, cortamos la banda del gel y la colocamos en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Le agregamos de 3.5 a 4.5 µl de resina Qiaex II, más 570 µl de buffer Qx1.
- Dejamos incubar el tubo por 10 minutos a 50 °C. Lo centrifugamos a 10,000 rpm por 3 minutos.
- Decantamos y colocamos 570 µl del mismo buffer, se homogeniza la muestra. Lo centrifugamos en las mismas condiciones. Decantamos con pipeta para quitar cualquier resto de buffer.
- Agregamos 570 µl de buffer PE y disolvemos el botón. Centrifugamos en las mismas condiciones. Decantamos y repetimos el paso, retirando el buffer con pipeta.

- Colocamos el tubo con la tapa abierta en el termoblock a 50 °C por aproximadamente 15 minutos, para secar la muestra. Le agregamos de 15 a 20 µl de agua inyectable dependiendo del tamaño del botón obtenido. Este tubo se dejará en reposo a temperatura ambiente por 24 horas.
- Centrifugamos el tubo a 10,000 rpm durante 3 minutos y retiramos el sobrenadante, sin tocar el botón. La colocamos en un tubo para PCR.

Los amplicones se analizaron con el kit ABI BigDye secuenciación de ciclos de terminación v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el analizador de DNA ABI3100 (Applied Biosystems).

9.8.5 Reacción con BigDye terminator para secuenciación de DNA.

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

La mezcla de BigDye contiene los siguientes reactivos:

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

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

- Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- Tris-HCL (pH 9.0)
- MgCl 2
- Mutante de una taq polimerasa

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

28 ciclos

Temperatura inicial: 94 °C por 5 minutos

- Segmento 1, desnaturalización: 94°C por 1 minuto

- Segmento 2, alineamiento: 55°C por 50 segundos

- Segmento 3, polimerización: 60°C por 3 minutos

Extensión: 60°C por 5 minutos.

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

9.8.6 Purificación y análisis de las secuencias

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

- A las columnas Centri Sep con cephadex (0.06 gr) les agregamos 800µl de agua inyectable. Las homogeneizamos con vórtex, y las dejamos reposar por una hora.

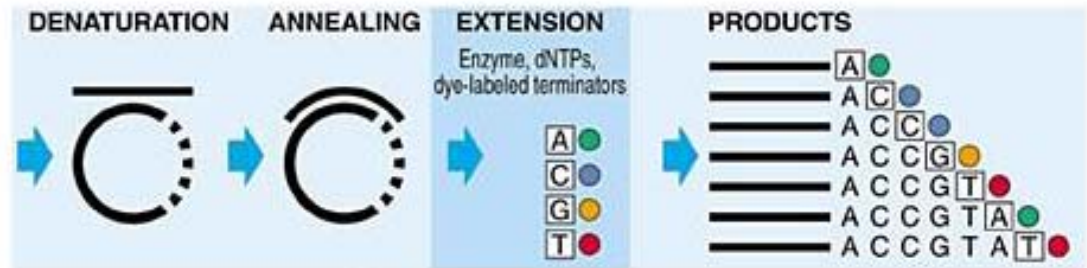
- Retiramos el sobrenadante y centrifugamos las columnas durante 3 minutos a 3,000 rpm.

- Con pipeta introducimos la reacción de BigDye en la columna, centrifugamos de nuevo por 3 minutos a 3,000 rpm, colocando debajo de la columna un tubo de secuenciación. Esto con la finalidad de que el exceso de ddNTPs se eliminen en la columna de cephadex, mediante una cromatografía en columna a pequeña escala. De esta manera se deposita ya purificada en el tubo de secuenciación.

- Secamos la muestra colocando los tubos de secuenciación en un concentrador de vacío.

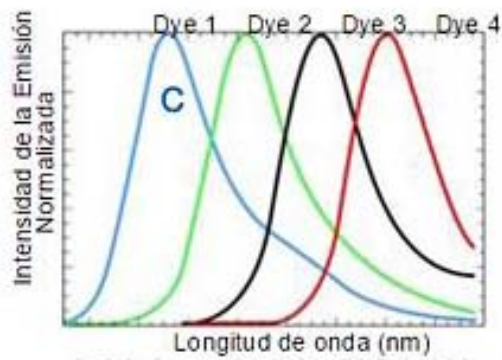
- Posteriormente se sometió a secuenciación automatizada para su análisis.

Secuenciación cíclica



Ciclo de secuenciación de Dye terminator (Applied Biosystems 2013)

Marcadores fluorescentes



Emisión espectral de los cuatro tintes (Applied Biosystems 2013)

10. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

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

Esta investigación se considera como de riesgo mínimo.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los electroferogramas obtenidos por medio de la técnica de MLPA se comparan midiendo las intensidades de fluorescencia (altura) contra el tamaño de la sonda (número de pares de bases) con respecto al patrón del kit.

Los criterios los marca el fabricante y se consideraron satisfactorias las pruebas cuando las sondas control, Q, D y tres fragmentos de tamaño constante, concuerdan con estos últimos y la altura del pico más bajo fue mayor a un tercio con respecto a la altura del pico más alto.

Se realizaron dos tipos de normalización en el área del pico de la sonda: intramuestra e interanalítica con respecto a las muestras de referencia, tanto para hombres como mujeres. Esto para disminuir las variaciones en las condiciones experimentales y evitar las diferencias cuantitativas.

Los resultados recabados se expresan como la relación media por cromosoma con un intervalo de confianza de 95%. El valor medio esperado es de 1.0 el cual representa dos copias de la secuencia diana de la muestra. Las proporciones máximas entre 0,7 y 1,3 se consideran normales. Los valores por encima de 1,3 indican la presencia de una ganancia de la secuencia diana mientras que las relaciones por debajo de 0,7 indican pérdida. Las razones teóricas para una delección y duplicaciones heterocigóticas son 0,5 y 1,5, respectivamente, aunque los valores reales pueden variar de 0,3 a 0,7 para delecciones heterocigóticas y de 1,3 a 1,7 para duplicaciones heterocigóticas.³⁴

Para los resultados de la secuenciación del exoma, se aplicó filtración discreta la cual consiste en buscar variantes en un mismo gen en los diferentes afectados y descartar variantes normales o wildtype por comparación con bases de datos como dbSNP y 1000 genomas.

A través de los programas computacionales PolyPhen-2 ³⁶ y Mutation Taster ³⁷ se predijo la patogenicidad de la mutación candidata y con SIFT ³⁸, un software empleado para calcular el o los posibles cambios en la estructura de la proteína con base en el grado de conservación de los residuos de aminoácidos en las alineaciones de secuencias derivadas de secuencias estrechamente relacionadas.

Una vez hecho esto se estratificaron las variantes candidatas por clase funcional: Codones de paro, cambios del marco lectura, splicing, cambios en sentido equivocado.

Se buscó información sobre la función del/los gen(es).

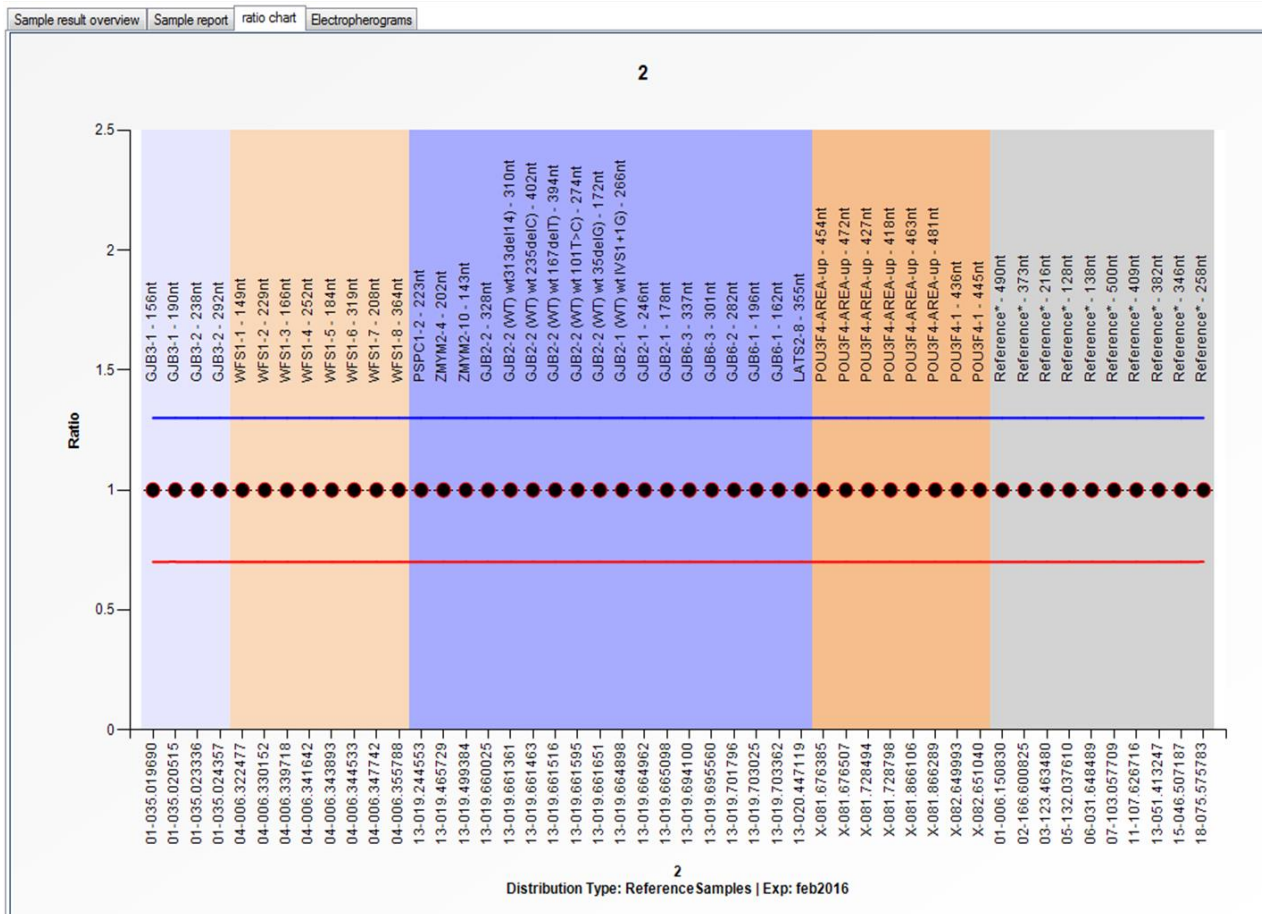
12. RESULTADOS

12.1 MLPA

Se procesaron 49 muestras de pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica a las cuales se les realizó previamente el análisis molecular de los genes *GJB2* y *GJB6*.

Se corroboraron los 21 casos heterocigotos para el gen *GJB2*, representados en las gráficas de dispersión como disminución de la altura del pico en un 50% para las sondas del gen mencionado.

Ninguna de las pruebas reveló cambios en el número de copias para el resto de los genes incluidos en el kit (*GJB6*, *GJB3*, *WFS1* y *POU3F4*).



Gráfica de dispersión normal representativa de los análisis de MLPA.

12.2 RESULTADOS DEL EXOMA

Se les realizó secuenciación del exoma completo a 5 familias las cuales cuentan con dos hijos afectados con sordera neurosensorial no sindrónica, sin antecedentes de consanguinidad. Siguiendo la metodología descrita previamente, identificamos variantes candidatas en cada paciente seleccionado.

Para cada uno de ellos, se hizo la búsqueda en OMIM (Online Mendelian Inheritance of Man) y en PubMed para asociar las variantes encontradas con las ya reportadas en esas bases de datos.

Posteriormente, la predicción del efecto funcional de los cambios en el DNA de los genes candidatos, se llevó a cabo con PolyPhen2, SIFT y Mutation Taster. (Tabla 4).

GEN	CAMBIO EN cDNA	CAMBIO EN AA	POSICIÓN	dbSNP ID	MUTATION TASTER	SIFT	POLIPHEN 2	CONSECUENCIA FUNCIONAL	HGMD
<i>SLC26A4</i>	c.626 G>T (6)	p.G209V	Chr7:107315415	rs111033303	Patógena	Deletérea	1	Missense	SI
<i>SLC26A4</i>	c.706 C>G	p.L236V	Chr7:107315495	rs111033242	Potencial	Tolerable	0.055	Missense	NO
<i>OTOA</i>	c.2359 G>T	p.E787*	Chr16:21747639	rs200988634	Patógena	Incierto	----	Stop, pérdida de 353 aa	NO
<i>OTOA</i>	c.44 T>A	p.F15Y	Chr16:21689879	rs78970023	Polimorfismo	Tolerable	0.40	Missense	SI
<i>GIPC3</i>	c.701 A>C	p.E234A	Chr19:3589549	Nueva	Patógena	Deletérea	0.97	----	NO
<i>GJB2</i>	c.95 G>T	p.R32L	Chr13:20763626	rs111033190	Patógena	Deletérea	1	Missense	SI
<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Val	Chr13:0189547	rs1801002	Patógena	Deletérea	1	Missense	SI
<i>MYO1A</i>	c.1277 C>T	p.P426L	Chr12:57433051	rs4759043	Polimorfismo	Tolerable	0.50	Missense	SI
<i>MYO6</i>	c.3824 A>G	p.Y1275C	Chr6:7662469	rs146461956	Potencial	Tolerable	0.20	Missense	SI

Finalmente se les realizó el análisis molecular de dichas variantes al resto de los integrantes de cada familia por medio de secuenciación tipo Sanger para conocer su genotipo. (Anexo 5).

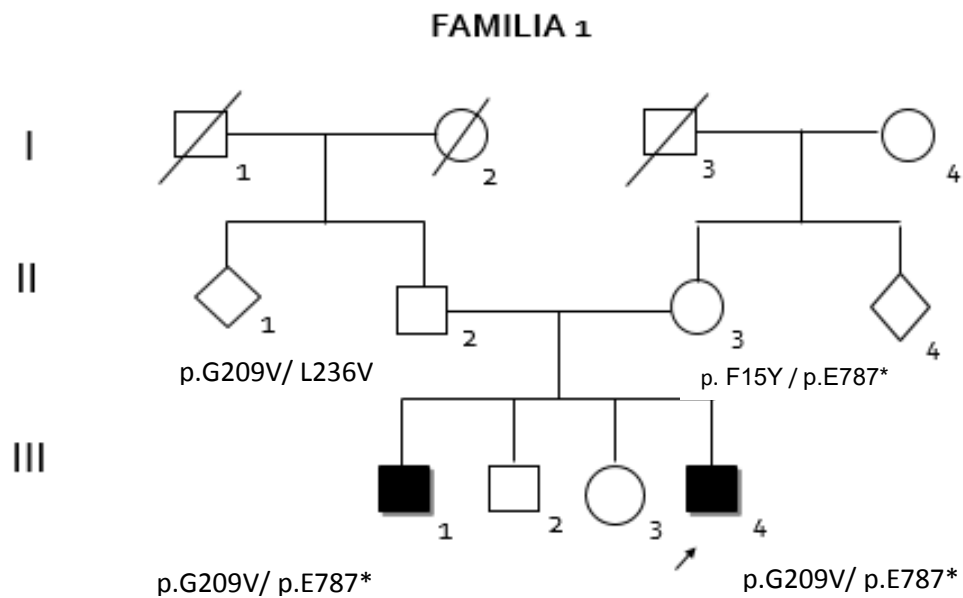
FAMILIA 1

En la familia 1 hay dos varones afectados con sordera profunda bilateral de acuerdo con el reporte de la audiometría (III:1 y III:4) Clínicamente sin dismorfias aparentes. La tomografía axial computarizada del oído interno no muestra alteraciones estructurales.

El análisis del exoma en ambos pacientes reporta cambios en dos genes que se han asociado a hipoacusia neurosensorial no sindrómica: *SLC26A4* y *OTOA*. En el gen *SLC26A4* se encontraron dos variantes heterocigotas, p.L236V y p.G209V en cada uno de los afectados. La primera es considerada como un polimorfismo según el análisis en las diferentes plataformas donde se comparó. Mientras que la segunda variante es deletérea.

Por su parte, en el gen *OTOA* se hallaron dos variantes heterocigotas en ambos pacientes. La primera es p.E787*, una mutación que ocasiona paro prematuro afectando la proteína con una pérdida de 353 aminoácidos, y según el análisis en los distintos programas bioinformáticos se considera patógena. El segundo cambio encontrado fue p.F15Y, cuyo análisis de datos revela una baja posibilidad de patogenicidad, es una variante considerada como polimorfismo.

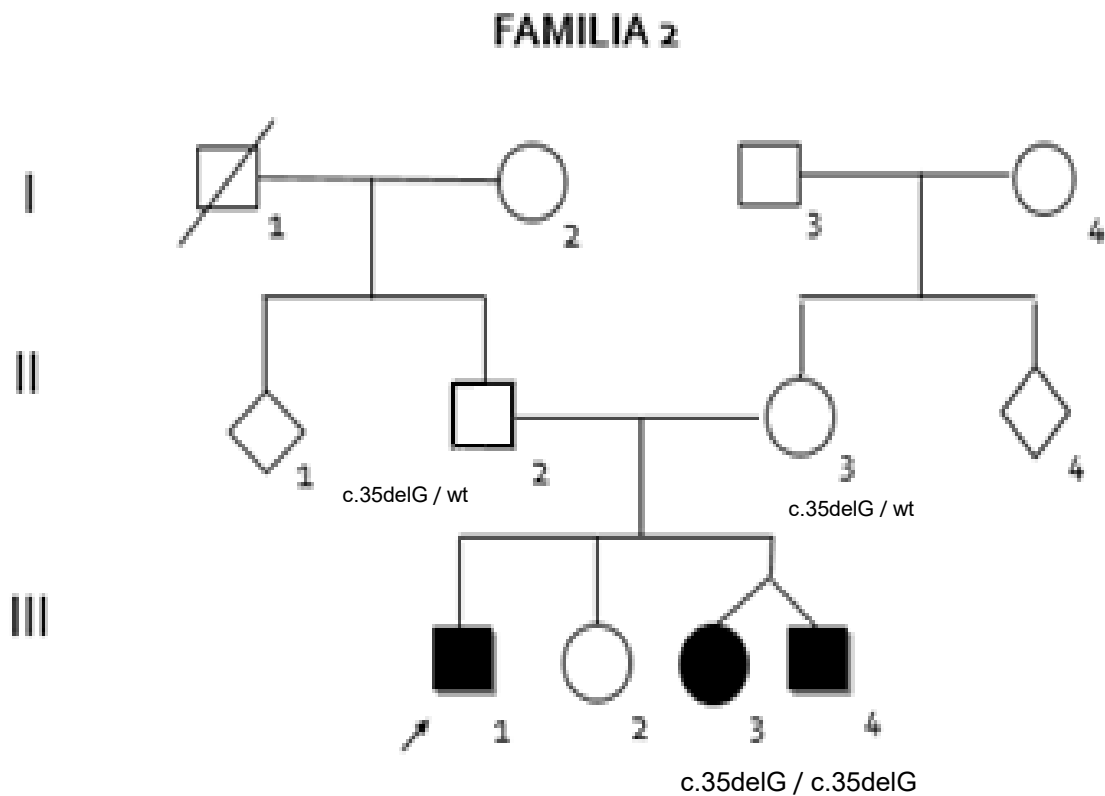
La secuenciación tipo Sanger se llevó a cabo para cada una de las variantes encontradas en el resto de los integrantes de la familia no afectados, para confirmar la segregación de dichas mutaciones y aclarar el estado de portador en cada uno de ellos. El individuo II:2 es portador de las variantes del gen *SLC26A4* (p.G209V y p.L236V); mientras que el individuo II:3 es portador de p.F15Y y p.E787* del gen *OTOA*. Por su parte, los individuos afectados tienen el genotipo p.G209V/p.E787*. Finalmente el individuo III:2 es L236V/wt y el III:3 es wt/wt.



FAMILIA 2

En esta familia hay 3 miembros afectados con hipoacusia neurosensorial de moderada a profunda, bilateral, prelingual; sin antecedentes familiares de discapacidad auditiva ni de algún síndrome asociado a sorderas; no consanguinidad ni endogamia. Se le realizó secuenciación de exoma completo al sujeto III:1 encontrando mutación homocigota en el gen *GJB2*, la c.35delG. Con estos resultados se procedió a la búsqueda de ese cambio en el resto de los sujetos afectados y los normo-oyentes.

Como era de esperarse ambos padres son portadores heterocigotos de dicha mutación. En el caso de III:2 no es portadora de esa variante ya que su genotipo es wt/wt para el gen *GJB2*; mientras que los sujetos III:3 y III:4, que son gemelos dicigotos tienen la mutación homocigota.



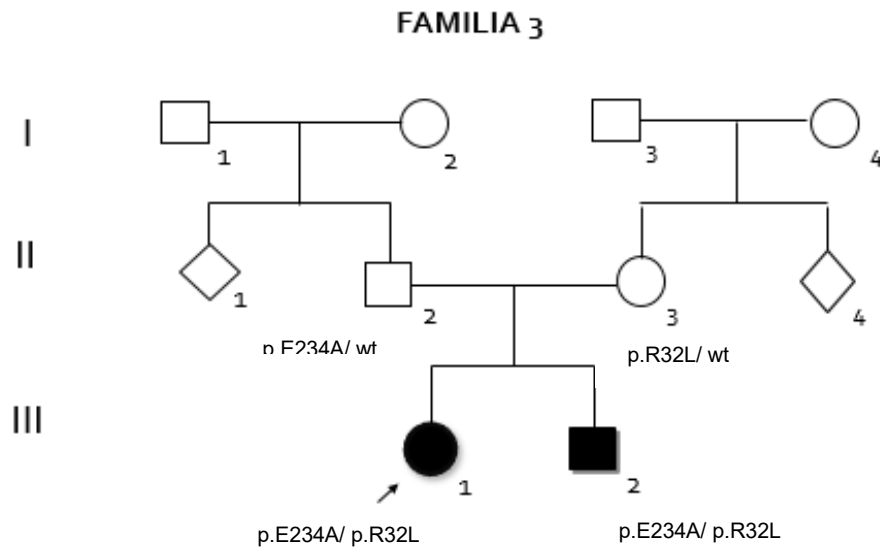
FAMILIA 3

Esta familia cuenta con dos miembros afectados con hipoacusia neurosensorial no sindrómica prelingual, bilateral, sin antecedentes de endogamia ni consanguinidad, los estudios de imagen de la TAC de oído interno no reportan cambios estructurales de importancia. En el caso de III:1 la hipoacusia es moderada y el III:2 profunda.

Con la secuenciación del exoma que se les realizó a ambos afectados, se eligieron 4 genes asociados a HNNAR y las variantes se seleccionaron basándonos en una frecuencia de <1% en la base de datos dbSNP137 y 1000 genomas, además aquellos que presentaron puntuaciones de alta patogenicidad calculada mediante Polyphen-2, SIFT y Mutation Taster.

Como se muestra en la tabla, solo dos genes fueron los que se consideraron patógenos y posibles causantes de la sordera en estos pacientes. El primero de ellos, el gen *GIPC3* (c.701 A>C, p.E234A) y el gen *GJB2* (c.95 G>T, p.R32L) deletérea. El resto de los genes seleccionados, *MYO1A* y *MYO6* se descartaron por la baja posibilidad de patogenicidad de sus variantes.

Posterior a esto, se les realizó la secuenciación de los genes seleccionados a ambos padres y a ambos sujetos afectados para corroborar esos cambios en el DNA. El individuo II:1 es heterocigoto para la variante del gen *GIPC3* (p.E234A), el caso del II:2 es heterocigoto para *GJB2* (p.R32L), mientras que ambos individuos afectados (III:1 y III:2) son doble heterocigotos para dichos genes, con el siguiente genotipo: p.E234A/ p.R32L.



FAMILIA 4

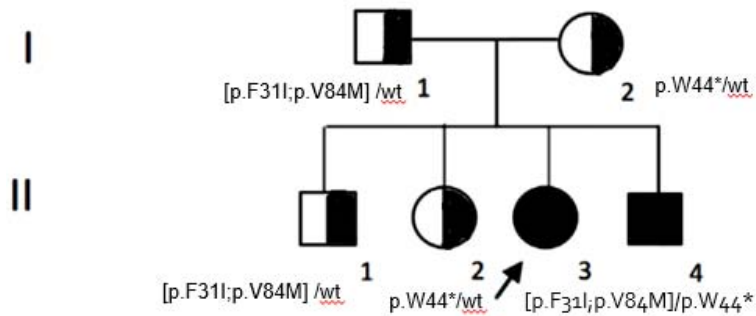
Esta familia cuenta con dos afectados con HNNS, profunda, bilateral, prelingual, no progresiva; a la exploración física sin manifestaciones clínicas aparentes que sugieran algún síndrome. La TAC de oído interno y RM del cráneo sin alteraciones estructurales. Perfil tiroideo dentro de parámetros normales.

El estudio molecular por medio de SCE reveló dos variantes en el gen *GJB2* a manera de trimutación presentes únicamente en los pacientes y no en el resto de los familiares ni en los controles.

Se procedió a la secuenciación tipo Sanger del gen al resto de los integrantes de la familia para corroborar los resultados previos, encontrando una combinación de heterocigotos compuestos para dicha trimutación: p.F31I/p.W44*/p.V84M.

El papá (I:1) y II:1 son portadores del genotipo (p.F31I/p.V84M)/Wt; la mamá (I:2) y II:2 portadores de p.W44*/Wt, todos normo-oyentes; mientras que los sujetos afectados son heterocigotos compuestos de la siguiente manera: (p.F31I/p.V84M)/p.W44*.

Familia 4



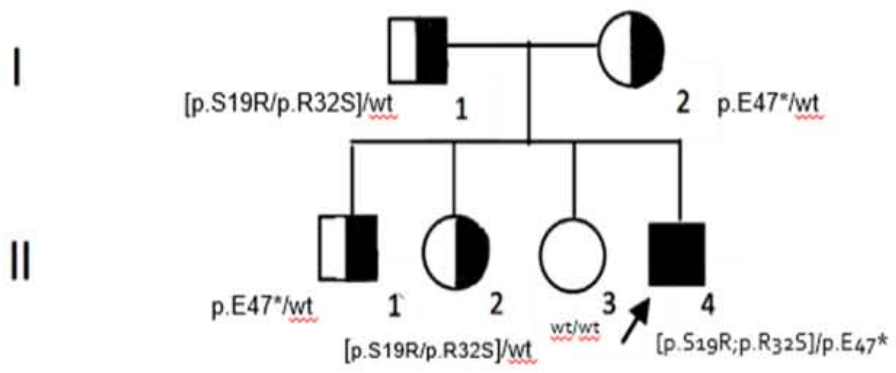
FAMILIA 5

Esta familia consta de 6 integrantes, sin antecedentes de endogamia ni consanguinidad, un solo afectado con HNNS, bilateral, prelingual no progresiva, profunda; a la exploración física no hubo hallazgos clínicos que se pudieran asociar a algún síndrome. La TAC y demás estudios paraclínicos realizados con resultados normales.

La SCE identificó mutaciones en el gen *GJB2* en forma de heterocigoto compuesto con una combinación tipo trimutación: p.S19R/p.R32S/p.E47*.

Como se observa en el árbol genealógico, los individuos I:1 y II:2 son heterocigotos p.S19R/p.R32S; mientras que I:2 y II:1 son portadores de la variante p.E47*; el sujeto II:3 tiene un genotipo normal y el propósito (II:4) tiene la combinación de las tres mutaciones p.S19R/p.R32S/p.E47*.

Familia 5



13. DISCUSION

En el presente estudio, el grupo de pacientes incluido, es el resultado del análisis molecular previo del gen *GJB2*, el cual se caracteriza por tener mutaciones heterocigotas en un 38.8% (21/54), mientras que en el resto (23/54) se desconoce su genotipo.

Si bien el número de pacientes estudiado es limitado, las pruebas realizadas con MLPA (*GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *WFS1*, *POU3F4*), los hallazgos confirman una baja frecuencia de mutaciones en los genes más frecuentemente asociados a la HNNSAR pues de los 39 casos analizados con esta técnica solamente se confirmó la heterocigocidad en 21 de ellos para el gen *GJB2*.

Esto nos habla de que, al menos en este grupo de pacientes, estarían implicados genes que tienen una baja frecuencia como causa de HNNS y que el origen étnico de la población analizada condiciona la diversidad genotípica.

Un análisis multicéntrico de familias con hipoacusia neurosensorial no sindrómica, prelingual, severa y profunda de Francia, Reino Unido y Nueva Zelanda reveló que el 50% de las familias estudiadas presentaban mutaciones en el gen que codifica Cx26. La mutación c.35delG representó el 70% de las mutaciones en el gen *GJB2*, con una tasa de portadores del 4% en estas poblaciones.³⁹

En Brasil, por ejemplo, han empleado la técnica de MLPA para identificar mutaciones digénicas en sujetos con HNNS de moderada a profunda. Se realizó un tamizaje a 600 pacientes para la mutación c.35delG en el gen *GJB2*, de estos, encontraron 46 con mutaciones en sólo un alelo, 13 heterocigotos compuestos y dos con mutaciones digénicas (*GJB2/GJB6*).⁴⁰

En Europa, un estudio llevado a cabo en Suiza cuyo objetivo fue investigar la prevalencia de mutaciones puntuales y digénicas en las conexinas 26,30 y 31 en una cohorte de 32 pacientes usando la técnica de MLPA, reportó en sus resultados un caso con mutación digénica Cx26 (c.35delG) y Cx30 c.del(*GJB6*-D13S1830), 31% fueron mutaciones homocigotas para *GJB2* y una mutación (c.94C>T) en la Cx3.⁴¹

En México se han hecho 3 estudios previos para conocer el perfil genético de las sorderas en distintas regiones del país; éstos se han centrado en el análisis molecular de los genes *GJB2* y *GJB6*, donde nos muestran que predominan mutaciones heterocigotas para el gen *GJB2* y sus hallazgos no explican la causa genética de la sordera en al menos el 60% en promedio, pues la mayoría de los casos fueron alelo silvestre para ambos genes.^{42, 43, 44}

Si bien es cierto que las mutaciones en el gen *GJB2* explican el 50% de las HNNAR en la población caucásica como lo reportan diversos autores^{45, 46} y de éstas, c.35delG es la más frecuente; en nuestra población aún no se puede hablar de alguna mutación o mutaciones predominantes.

Como lo muestran nuestros resultados, de las 5 familias incluidas, el 80% (4/5) tuvieron mutaciones en el gen *GJB2*. Lo interesante de éstas es la variabilidad y su peculiar distribución en las distintas familias.

En la primera de ellas tenemos la ya mencionada mutación c.35delG, donde observamos el típico patrón de herencia autosómica recesiva con padres normooyentes, portadores heterocigotos de la mutación, con 3 hijos afectados, homocigotos para la mutación, dos de ellos gemelos dicigotos y una hija no afectada la cual hereda ambos alelos silvestres. Un aspecto importante a destacar en esta familia es que a pesar de tener el mismo genotipo, los afectados presentan diversos perfiles audiológicos, ya que en dos de ellos la hipoacusia es moderada y en otro es profunda. Esto nos hace pensar en la posible participación de otros genes y sus variantes y que aún queda por investigar a profundidad cómo interactúan entre sí para modificar la audición.

En otra familia, los afectados son doble heterocigotos. Se encontró una mutación heterocigota en *GJB2* (c.95 G>T, p.R32L) la cual ya ha sido estudiada y reportada previamente como deletérea.⁴⁷ El otro gen implicado, *GIPC3* es un gen que recientemente se ha asociado a la HNNAR (DFNB15, OMIM #601869). Se cree que es importante para la adquisición y propagación de la señal acústica en las células

ciliadas de la cóclea de los mamíferos. Estudios en ratones sugieren que este gen es necesario para la maduración postnatal del haz piloso y la supervivencia a largo plazo de las células ciliadas y el ganglio espiral en el oído interno.⁴⁸ Solo hay 9 mutaciones reportadas hasta la fecha. La mutación (c.701 A>C, p.E234A) encontrada aún no ha sido reportada. Es una mutación en sentido equivocado (missense) en el exón 4, cuyo efecto en la función de la proteína por la sustitución del aminoácido fue predicha como deletérea de acuerdo a las distintas bases de datos empleadas (SIFT, Mutation Taster y Poliphen-2).

Esto nos permitiría considerarlo como el gen candidato causante de la hipoacusia en esta familia junto con el gen *GJB2* ya que ambos pacientes son heterocigotos compuestos para dichas mutaciones y se comprobó el estado portador de las mismas en cada uno de los padres.

Es importante resaltar que, siendo *GJB2* el gen con más mutaciones reportadas, ya sea en forma homocigota o heterocigota compuesta; hasta el momento no se ha asociado de manera digénica con el gen *GIPC3* como causante de HNNSAR.

En el caso de las siguientes dos familias resultaron ser heterocigotas compuestas donde el análisis molecular del gen *GJB2* identificó dos nuevas variantes a manera de trimutación que no han sido reportadas previamente: p.S19R/p.R32S/p.E47* y p.F31I/p.W44*/ p.V84M.

Con excepción de p.S19R (mutación nueva), el resto de las mutaciones se han descrito como patógenas aunque para p.S19R, en el mismo codón, se considera patógena. Sin embargo, el análisis con las bases de datos SIFT, PolyPhen-2 y Mutation Taster, predicen que dicho cambio tiene un efecto deletéreo en la proteína, Cx26. (Ver anexo 6). Análisis en diversas especies muestran que todas las mutaciones en sentido equivocado afectan a los aminoácidos altamente conservados. A nivel de la estructura proteínica, la mutación p.S19R se localiza en la región citoplasmática, las mutaciones p.R32S y p.F31I están en la primera región transmembranal mientras que p.V84M se localiza en la segunda región.

Estas mutaciones probablemente modifiquen los dominios transmembranales y del bucle extracelular de la estructura proteínica de la Cx26, jugando un papel muy importante en el origen de la sordera.

Las mutaciones p.E47* y p.W44* están presentes en el dominio extracelular pero son proteínas truncas con aberrante o poca función.

Finalmente, la quinta familia representa un caso de herencia digénica. Uno de los genes mutados es el gen *SLC26A4* considerado el segundo más frecuentemente implicado en las HNNSAR después del gen *GJB2*. La mutación p.G209V ya está ampliamente reportada como causante homocigota u como homocigoto compuesto de HNNSAR con alteraciones variables en el acueducto vestibular (DFNB4, OMIM*600791).⁴⁹ Se sabe que esta mutación se localiza en la membrana plasmática afectando de manera importante su función, de modo que altera la unión de los iones transportados.⁵⁰

El segundo gen implicado es *OTOA*, en el cual se identificó una mutación deletérea, según los valores predictores dados por los distintos programas bioinformáticos usados. Tiene un codón de paro (p.E787*) perdiendo 355 aminoácidos (44.8%), por lo que la estructura de la proteína sería aberrante o nula para la función. Esta mutación no ha sido reportada con anterioridad pues hasta el momento solo han sido descritas dos mutaciones causantes de HNNSAR atribuidas a este gen (DFNB22, OMIM #607039).^{51, 52}

Al igual que ocurre con otros genes, *SLC26A4* tiene su propio espectro de mutaciones dependiendo del grupo étnico estudiado y variabilidad en la expresión génica. El 25% de individuos caucásicos europeos o de Norte América con ensanchamiento del acueducto vestibular (EAV) tienen mutaciones bialélicas en el gen y 25% son heterocigotos.⁵³

En nuestros pacientes no hubo evidencia de alteraciones en el acueducto vestibular a pesar de tener una mutación heterocigota deletérea en este gen. Aun no queda claro el mecanismo que propicia la heterogeneidad genética, pues mutaciones en

SLC26A4 causan el síndrome de Pendred, o DFNB4 con o sin EVS lo que dificulta hacer una correlación genotipo-fenotipo.⁵⁴

Es bajo el porcentaje de mutaciones homocigotas causantes de DFNB4 como lo demuestra un estudio llevado a cabo en 100 individuos caucásicos en donde sólo el 24% presento mutaciones bialélicas, 16% monoalélicas y 60% ninguna mutación.⁵⁵

Por último, se han estudiado los genes *KCNJ10* y *FOXI1* con *SLC26A4* con la finalidad de atribuir a la herencia digénica la patogénesis de HNNSAR; sin embargo, ha sido muy baja la frecuencia de mutaciones digénicas *FOXI1* (1.4%) y *KCNJ10* (3.6%)⁵⁶ y concluyen que estos últimos juegan un papel limitado en la patogénesis y sugieren estudiar otros factores genéticos que pudieran estar contribuyendo al fenotipo. Incluso hay otro par de autores que no encontraron ninguna asociación significativa entre las mutaciones de *KCNJ10* y *FOXI1* con *SLC26A4*.^{57, 58}

En el presente estudio, se sugiere una herencia digénica para los genes *SLC26A4* y *OTOA* puesto que se identificaron mutaciones deletéreas heterocigotas, que pudieran explicar la sordera en esos pacientes. Sin embargo, queda aún mucho que investigar acerca de cómo la interacción entre ambos (si es que la hay) contribuye a la patogénesis de la HNNS.

14. CONCLUSIONES

Con el presente estudio, se corroboró la amplia heterogenidad de la HNNSAR. Sin embargo, las mutaciones en el gen *GJB2* siguen siendo predominantes ya sea que estén presentes en una manera homocigota, heterocigota compuesta, digénica o heterocigota.

Se amplió el conocimiento acerca de la diversidad de mutaciones que puede haber en el gen *GJB2* con el primer reporte y publicación de una trimutación en heterocigotos compuestos (p.S19R/ p.R32S/p.E47* y p.F31I/p.W44*/p.V84M) en dos familias mexicanas con HNNS. Resaltando con esto la complejidad en el patrón de mutaciones en dicho gen y las sorderas.

Si bien el objetivo de este estudio no fue comprobar la efectividad de la técnica de MLPA como método diagnóstico para las HNNS, es importante mencionar que los pacientes que portaban una mutación monoalélica en el gen *GJB2* fueron identificados al 100% con esta técnica lo que hace resaltar su utilidad como herramienta rápida, eficaz y de bajo costo para el tamizaje de mutaciones en este gen ya que sigue siendo el más frecuentemente implicado en este tipo de sorderas.

Por otra parte, la secuenciación completa del exoma nos permitió conocer qué genes asociados a la HNNS, además de *GJB2*, están mutados en las familias con más de dos afectados en la muestra analizada.

Esto nos reafirma la idea del gran potencial de la SCE para identificar, en los pacientes que aún se desconoce la etiología genética de la sordera, nuevas mutaciones y muy probablemente nuevos genes que antes no hayan sido implicados. El reto aquí es comprender de qué manera las mutaciones nuevas contribuyen a la pérdida auditiva.

Siendo el padecimiento sensorial más frecuente a nivel mundial; es necesario, por lo tanto, continuar con la búsqueda del origen genético de la HNNS.

La identificación de/los gen/es causantes de la HNNS continua siendo fundamental para decidir las modalidades de tratamiento y el asesoramiento genético a los pacientes.

15. REFERENCIAS

1. Cabanillas Farpón R, Cadiñanos Bañales J. Hipoacusias hereditarias: asesoramiento genético. *Acta Otorrinolaringol España*. 2011.
2. Simon angeli, xi lin, and xue zhong liu. Genetics of Hearing and Deafness. *The anatomical record* 295:1812–1829 (2012).
3. Dra. Viviana dalamón , Dra. Ana Belén Elgoyhen. Genetic Sensorineural Hearing Loss: up to date rev. *Med. Clin. Condes* 2009; 20(4) 408 – 417.
4. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future B. Vona et al. / *Molecular and Cellular Probes* 29 (2015) 260-270.
5. Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med* 2007; 9 (7): 393 -408.
6. A.M.M. Oonk et al. Features of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment: a review to serve as a reference. *Clin. Otolaryngol.* 2016, 41, 487–497
7. Clark, J.G.,Martin, F.N., 2002. *Introduction to Audiology*, 8th edition. Allyn & Bacon.
8. Amiel A. Dror and Karen B. Avraham Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology *Annu. Rev. Genet.* 2009. 43:411–37.
9. Dror, A.A., Avraham, K.B., Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron* 68, 2010.
10. Oghalai JS. The cochlear amplifier: augmentation of the traveling wave within the inner ear. *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery.* 12(5):431-8, 2004.
11. Richard R. Fay, Arthur N. Popper, and Sid P. Bacon (2004). *Compression: From Cochlea to Cochlear Implants*. Springer. ISBN 0-387-00496-3.
12. .Guy P. Richardson, Jacques Boutet de Monvel, and Christine Petit, How the Genetics of Deafness Illuminates Auditory Physiology *Annu. Rev. Physiol.* 2011. 73:311–34
13. Cindy Stanfield. *Principios de fisiología humana*, 4ª ed. Addison-Wesley 2011.
14. Agustín D. Martínez, Rodrigo Acuña, Vania Figueroa, Jaime Maripillan y Bruce Nicholson. Gap junction channels dysfunction in Deafness and Hearing loss. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(2):309-322.
15. Hersh, Marion A.; Jhonson, Michael A. *Assistive Technology for the Hearing-impaired, Deaf and Deafblind*. Springer Science & Business Media, 2006. 1-39
16. Van Camp G, Smith RJH. The hereditary hearing loss homepage <http://hereditaryhearingloss.org/>
17. Hoefsloot L. H., Feenstra I., Kunst H. P. M., Kremer H. Genotype phenotype correlations for hearing impairment: Approaches to management. *Clin Genet* 2014; 85: 514–523.
18. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future B. Vona et al. / *Molecular and Cellular Probes* 29 (2015) 260-270.

19. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? Nele Hilgert a, Richard J.H. Smith b, Guy Van Campa *Mutation Research* 681 (2009) 189–196.
20. Oguz Kadir Egilmez and M. Tayyar Kalcioğlu. Genetics of Nonsyndromic Congenital Hearing Loss. *Scientifica*. Volume 2016, Article ID 7576064, 9 pages.
21. Georg Zoidl & Rolf Dermietzel. Gap junctions in inherited human disease. Signaling and cell physiology. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2010) 460:451–466.
22. A. Kenneson, K. Van Naarden Braun, C. Boyle, GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review, *Genet. Med.* 4 (2002) 258–274.
23. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002;346:243–9.
24. Simon Angeli, Xi Lin, And Xue Zhong Liu. *The Anatomical Record Genetics of Hearing and Deafness* 295:1812–1829 (2012).
25. Ito, Choi/King/Zalewski/Muskett/Chattaraj/Shawker/Reynolds/Butman/Brewer/Wangemann/Alper/Griffith. SLC26A4 Genotypes and Phenotypes Associated with Enlargement of the Vestibular Aqueduct. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:545-552.
26. G. Paludetti, G. Conti, W. Di Nardo, E. De Corso, R. Rolesi, P.M. Picciotti, A.R. Fetoni. Infant hearing loss: from diagnosis to therapy. *ACTA otorhinolaryngologica italica* 2012;32:347-370
27. American College of Medical Genetics. Genetics Evaluation Guidelines for the Etiologic Diagnosis of Congenital Hearing Loss. Genetic Evaluation of Congenital Hearing Loss Expert Panel. ACMG statement. *Genet Med.* 2002; 4:162-71. 2002.
28. American College of Medical Genetics. Statement on universal newborn hearing screening. 2000.
29. Flores BL, Berruecos VP. Los problemas de la audición en la edad preescolar: identificación, diagnóstico y tratamiento del niño sordo. Tercera edición, México: Trillas, 2006.
30. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola JG II, Scherer SE, Scheetz TE, Smith RJH. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:21104–9
31. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Teagle HF, Tomblin BJ, Spencer LJ, et al. Performance of cochlear implant recipients with GJB2-related deafness. *Am J Med Genet.* 2002;109:167---70.
32. Bauer PW, Geers AE, Brenner C, Moog JS, Smith RJ. The effect of GJB2 allele variants on performance after cochlear implantation. *Laryngoscope.* 2003;113:2135---40.
33. Gantz BJ, Turner C, Gfeller KE, Lowder MW. Preservation of hearing in cochlear implant surgery: advantages of combined electrical and acoustical speech processing. *Laryngoscope.* 2005;115:796---802.
34. Piotr Kozłowski et al. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 2008, 29, 4627–4636.

35. MRC-Holland. [WWW document]. Interpretation of MLPA results. <http://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=wl2zCj\l\CGANQgZPuTixrMkcAVITxSUI1uxaJsuta9GGaLIE8p67Q>.
36. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;7.20:7.20.1–7.20.41.
37. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. Mutation taster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575–6.
38. Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812–4.
39. Marlin S., Garabedian E., Roger G., Moatti L. Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children: Pitfalls for genetic counselling. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 927–36.
40. da Silva-Costa SM¹, Martins FT, Pereira T, Pomilio MC, Marques-de-Faria AP, Sartorato EL Searching for digenic inheritance in deaf Brazilian individuals using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 Dec;15(12):849-53.
41. Nicolas Gürtler , Carole Egenter, Nemya Bösch & Martina Plasilova. Mutation analysis of the Cx26, Cx30, and Cx31 genes in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Acta Oto-Laryngologica Volume 128 2008 - Issue 10. Pages 1056-1062*
42. M. de la Luz Arenas-Sordo et 1680 al. Unique spectrum of GJB2 mutations in Mexico. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 76 (2012) 1678–1680
43. Aidee Alejandra Hernández-Juárez et. al. GJB2 and GJB6 mutations are an infrequent cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss in residents of Mexico. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 78 (2014) 2107–2112
44. Francisco Loeza-Becerra et. al. Particular distribution of the GJB2/GJB6 gene mutations in Mexican population with hearing impairment. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 78 (2014) 1057–1060.
45. Chan & Chang. GJB2-Associated Hearing Loss: Systematic Review of Worldwide Prevalence, Genotype, and Auditory Phenotype. *Laryngoscope*, 124:E34–E53, 2014.
46. Arti Pandya et. al. Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genetics IN Medicine*. July/August 2003, Vol. 5, No. 4 pág. 295–303.
47. Bai-Lin Wu et. al. Effectiveness of sequencing connexin 26 (GJB2) in cases of familial or sporadic childhood deafness referred for molecular diagnostic testing. *Genetics IN Medicine* 2002;4(4):279–288.
48. Charizopoulou, N., Lelli, A., Schraders, M., Ray, K., Hildebrand, M. S., Ramesh, A., Srisailapathy, C. R., Oostrik, J., Admiraal, R. J. C., Neely, H. R., Latoche, J. R., Smith, R. J. H., Northup, J. K., Kremer, H., Holt, J. R., Noben-Trauth, K. Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nature Commun*. 2: 201, 2011.

49. Usami S, Abe S, Weston MD, Shinkawa H, Van Camp G, Kimberling WJ. Hum. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Genet.* 1999 Feb;104 (2):188-92.
50. Silvia Dossena, Charity Nofziger, Grazia Tamma, Emanuele Bernardinelli, Simone Vanoni, Christoph Nowak, Elisabeth Grabmayer, Sonja Kössler, Susanne Stephan, Wolfgang Patsch and Markus Paulmichl Molecular and Functional Characterization of Human Pendrin and its Allelic Variants. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:451-466.
51. Lee, K., Chiu, I., Santos-Cortez, R. L. P., Basit, S., Khan, S., Azeem, Z., Andrade, P. B., Kim, S. S., Ahmad, W., Leal, S. M. Novel OTOA mutations cause autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in Pakistani families. (Letter) *Clin. Genet.* 84: 294-296, 2013.
52. Shahin, H., Walsh, T., Rayyan, A. A., Lee, M. K., Higgins, J., Dickel, D., Lewis, K., Thompson, J., Baker, C., Nord, A. S., Stray, S., Gurwitz, D., Avraham, K. B., King, M.-C., Kanaan, M. Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families. *Europ. J. Hum. Genet.* 18: 407-413, 2010.
53. López-Bigas N, Melchionda S, de Cid R, Grifa A, Zelante L, Govea N, Arbonés ML, Gasparini P, Estivill X. Erratum: Identification of five new mutations of PDS/SLC26A4 in Mediterranean families with hearing impairment. *Hum Mutat.* 2002 Jul;20(1):77-8.
54. Campbell C, Cucci RA, Prasad S, Green GE, Edeal JB, Galer CE, Karniski LP, Sheffield VC, Smith RJ. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2001 May;17 (5):403-11.
55. Albert S, Blons H, Jonard L, Feldmann D, Chauvin P, Loundon N, Sergent-Allaoui A, Houang M, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journel H, Catros H, Dollfus H, Eliot MM, David A, Calais C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Tran Ba Huy P, Lacombe D, Duriez F, Francannet C, Bitoun P, Petit C, Garabédian EN, Couderc R, Marlin S, Denoyelle F. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *European Journal of Human Genetics.* 2006;14:773–779.
56. Yang T, Gurrola JG 2nd, Wu H, Chiu SM, Wangemann P, Snyder PM, Smith RJ. Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *American Journal of Human Genetic.* 2009 May; 84 (5):651-7. 2009.
57. Landa P, Differ AM, Rajput K, Jenkins L, Bitner-Glindzicz M. Lack of significant association between mutations of KCNJ10 or FOXI1 and SLC26A4 mutations in Pendred syndrome/enlarged vestibular aqueducts. *BMC Med Genet.* 2013 Aug 21;14:85.
58. Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Yeh PL, Su YN, Hwu WL, Hsu CJ. Phenotypic analyses and mutation screening of the SLC26A4 and FOXI1 genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome. *Audiol Neurootol.* 2010;15(1):57-66.

ANEXOS

ANEXO 1. Manifestaciones clínicas y genética molecular de los genes causantes de la hipoacusia neurosensorial no sindrómica autosómica recesiva. ([Van Camp & Smith \[2010\]](#), GENREVIEWS).

LOCUS	GEN	INICIO	TIPO
DFNB1	<i>GJB2</i> <i>GJB6</i>	Prelingual	Usualmente estable
DFNB2	<i>MYO7A</i>	Prelingual, postlingual	Inespecífica
DFNB3	<i>MYO15A</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB4	<i>SLC26A4</i>	Prelingual, poslingual	Estable, progresiva
DFNB6	<i>TMIE</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB7/11	<i>TMC1</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	Poslingual , Prelingual	Estable, progresiva
DFNB9	<i>OTOF</i>	Prelingual	Usualmente severa a profunda; estable
DFNB12	<i>CDH23</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB16	<i>STRC</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB18	<i>USH1C</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB21	<i>TECTA</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB22	<i>OTOA</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB23	<i>PCDH15</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB24	<i>RDX</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB25	<i>GRXCR1</i>	Prelingual	Moderada a profunda; progresiva
DFNB28	<i>TRIOBP</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB29	<i>CLDN14</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB30	<i>MYO3A</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB31	<i>WHRN</i>	Prelingual	—
DFNB32/82	<i>GPSM2</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB35	<i>ESRRB</i>	Se desconoce	Severa a profunda
DFNB36	<i>ESPN</i>	Prelingual	—
DFNB37	<i>MYO6</i>	Prelingual	—
DFNB39	<i>HGF</i>	Prelingual	Severa a profunda
DFNB49	<i>MARVELD2</i>	Prelingual	Moderada a profunda; estable
DFNB53	<i>COL11A2</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB59	<i>DFNB59</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB61	<i>SLC26A5</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB63	<i>LRTOMT</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB67	<i>LHFPL5</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB73	<i>BSND</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB76	<i>SYNE4</i>	Prelingual	Altas frecuencias; progresiva
DFNB77	<i>LOXHD1</i>	Poslingual	Moderada a profunda; progresiva
DFNB79	<i>TPRN</i>	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB84	<i>PTPRQ</i>	Prelingual	Moderada a profunda; progresiva

ANEXO 2. Manifestaciones clínicas y genética molecular de los genes causantes de la hipoacusia neurosensorial no sindrómica autosómica dominante. (Van Camp & Smith [2010), GENREVIEWS).

LOCUS	GEN	INICIO/DÉCADA	PERFIL AUDIOLÓGICO
DFNA1	<i>DIAPH1</i>	Poslingual/1ra	Baja frecuencia progresiva
DFNA2	<i>KCNQ4</i>	Poslingual/2da	Alta frecuencia progresiva
DFNA2B	<i>GJB3</i>	Poslingual/4 ^{ta}	Alta frecuencia progresiva
DFNA3	<i>GJB2</i>	Prelingual	Alta frecuencia progresiva
	<i>GJB6</i>		
DFNA4	<i>MYH14</i>	Poslingual	Plana/ligeramente descendente
DFNA5	<i>DFNA5</i>	Poslingual/1ra	Alta frecuencia progresiva
DFNA6/14/38	<i>WFS1</i>	Prelingual	Baja frecuencia progresiva
DFNA8/12	<i>TECTA</i>		Pérdida de frecuencias medias
DFNA9	<i>COCH</i>	Poslingual/2da	Alta frecuencia progresiva
DFNA10	<i>EYA4</i>	Poslingual/3ra, 4ta	Plana/ligeramente descendente
DFNA11	<i>MYO7A</i>	Poslingual/1ra	
DFNA13	<i>COL11A2</i>	Poslingual/2da	Pérdida de frecuencias medias
DFNA15	<i>POU4F3</i>	Poslingual	Alta frecuencia progresiva
DFNA17	<i>MYH9</i>	Poslingual	Alta frecuencia progresiva
DFNA20/26	<i>ACTG1</i>	Poslingual	Alta frecuencia progresiva
DFNA22	<i>MYO6</i>	Poslingual	Alta frecuencia progresiva
DFNA23	<i>SIX1</i>	Prelingual	Descendente
DFNA25	<i>SLC17A8</i>	Poslingual/2 ^{da} - 6 ^{ta} décadas	Alta frecuencia progresiva
DFNA28	<i>GRHL2</i>	Poslingual	Plana/ligeramente descendente
DFNA36	<i>TMC1</i>	Poslingual	Plana/ligeramente descendente
DFNA39	<i>DSPP</i>	Poslingual	Alta frecuencia progresiva
DFNA41	<i>P2RX2</i>	Poslingual	Plana progresiva
DFNA44	<i>CCDC50</i>	Poslingual	Frecuencias bajas a medias progresivas
DFNA48	<i>MYO1A</i>	Poslingual	Progresiva
DFNA50	<i>MIR96</i>	Poslingual/2 ^{da}	Plana progresiva
DFNA51	<i>TJP2 & FAM189A2</i>	Poslingual/4 ^{ta}	Alta frecuencia progresiva

ANEXO 3. Manifestaciones clínicas y Genética Molecular de la hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X. (Van Camp & Smith [2010), GENREVIEWS).

LOCUS	GEN	INICIO	TIPO Y GRADO	FRECUENCIAS
DFNX1 (DFN2)	<i>PRPS1</i>	Poslingual	Progresiva, neurosensorial; severa a profunda	Todas
DFNX2 (DFN3)	<i>POU3F4</i>	Prelingual	Progresiva, mixta; variable, pero progresa hasta profunda	Todas
DFNX4 (DFN6)	<i>SMPX</i>	Poslingual	Progresiva, neurosensorial; de leve a profund	Todas

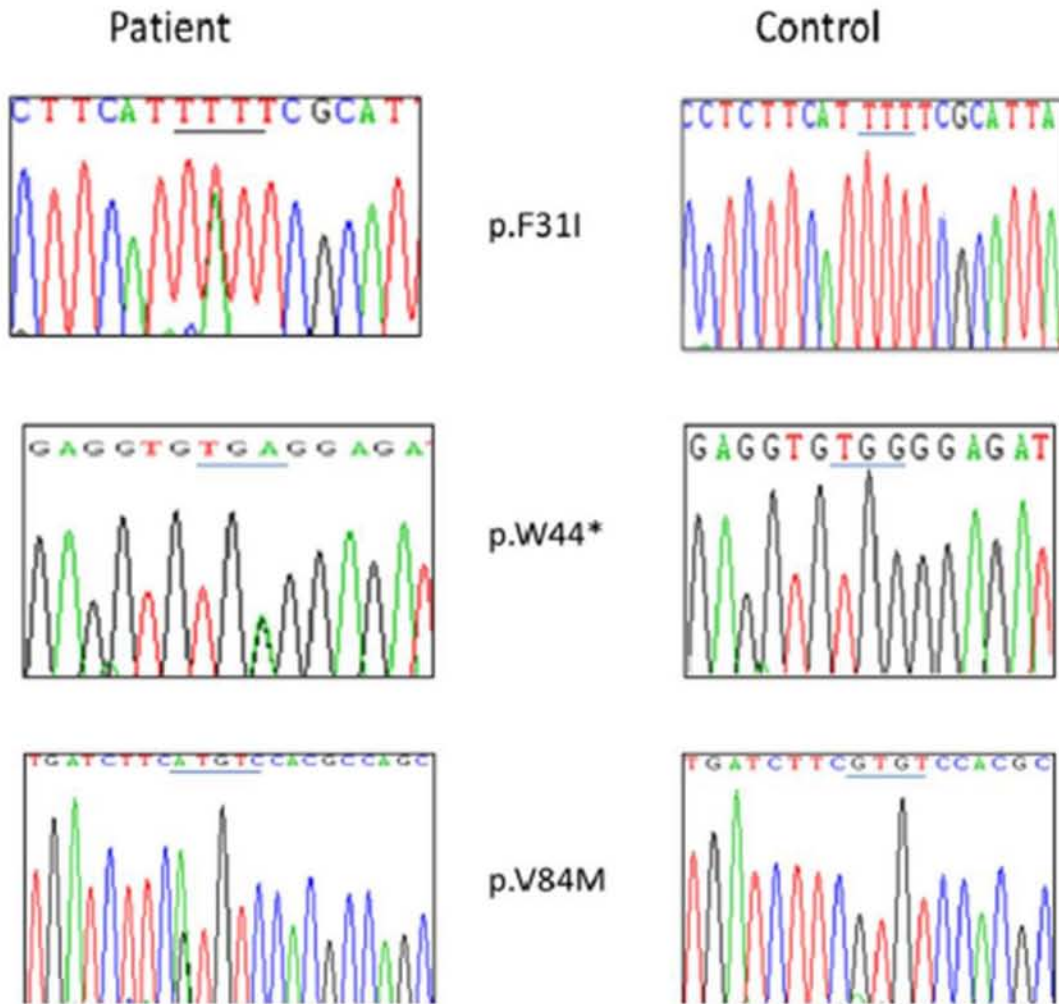
ANEXO 4. Hipoacusia no sindrómica mitocondrial. (Van Camp & Smith [2010), GENREVIEWS).

GEN	VARIANTE	SEVERIDAD	PENETRANCIA
MT-RNR1	961 variantes diferentes	Variable	Muy variable, inducida por aminoglucósidos
	1494C>T		
	1555A>G		
MT-TS1	7445A>G		Altamente variable
	7472insC		
	7510T>C		
	7511T		
MT-CO1	7444G>A	Severa a profunda	Complete, asociada a aminoglucósidos; asociada con MT-RNR11555A>G

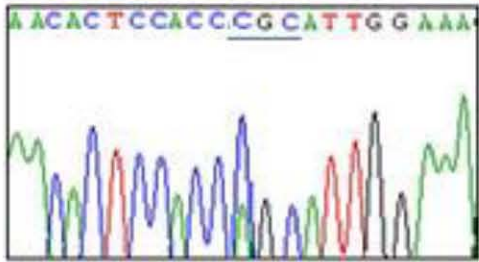
TABLA 3. Secuencias de los cebadores usados para validar las mutaciones por medio de secuenciación tipo Sanger.

GENES	Secuencias	Longitud del cebador (nucleotidos)
GIPC3-Ex3F	CAAGAGGGCCTTCGATATGA	20
GIPC3-Ex4R	CCCAAGACGGAGTCTAAACA	20
OTOG-Ex30F	ACTCAAAGTGCCTGACAGACA	21
OTOG-Ex32R	CAAGCTGGATAGCTGATAGGG	21
MYO1A-Ex15F	GAAGCTGCAGCAGGTGTTTATA	22
MYO1A-Ex17R	GCTTTGCTAGGAAAGTGGAGTC	22
MYO6-Ex35F	GCTGAGATCTTGCCAAGACAG	21
MYO6-Ex35R	AGCTGTAAGGCTGGTGTGCAA	21
SLC26A4-Ex5F	GATAGACACTGCAGCTAGAG	20
SLC26A4-Ex7R	ATGGTGAGCAATCCAGCAGT	20

ANEXO 5. Electroferogramas que indican las mutaciones del gen *GJB2*

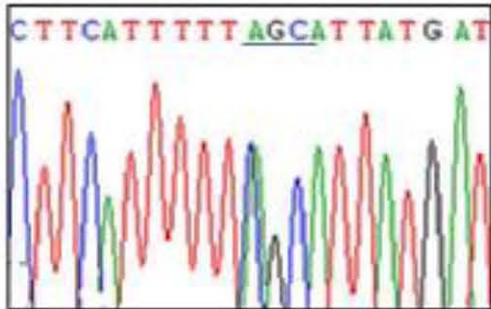
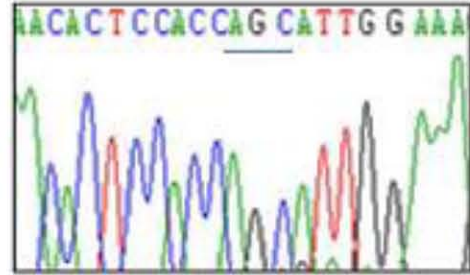


Patient

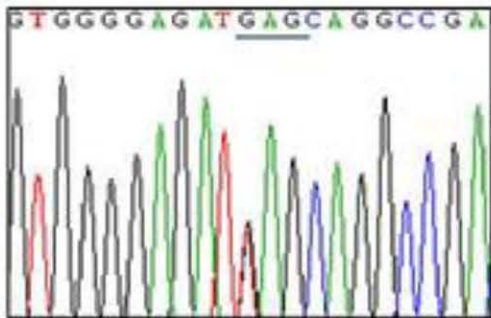
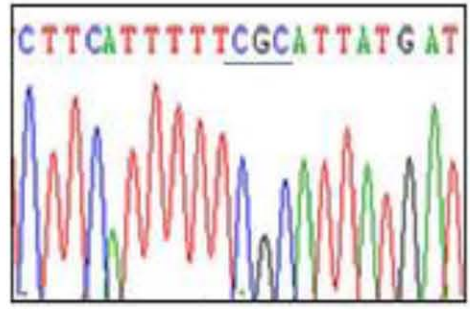


p.S19R

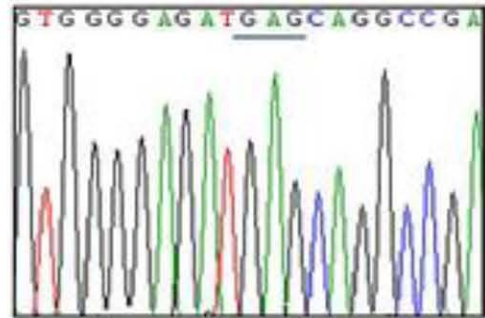
Control



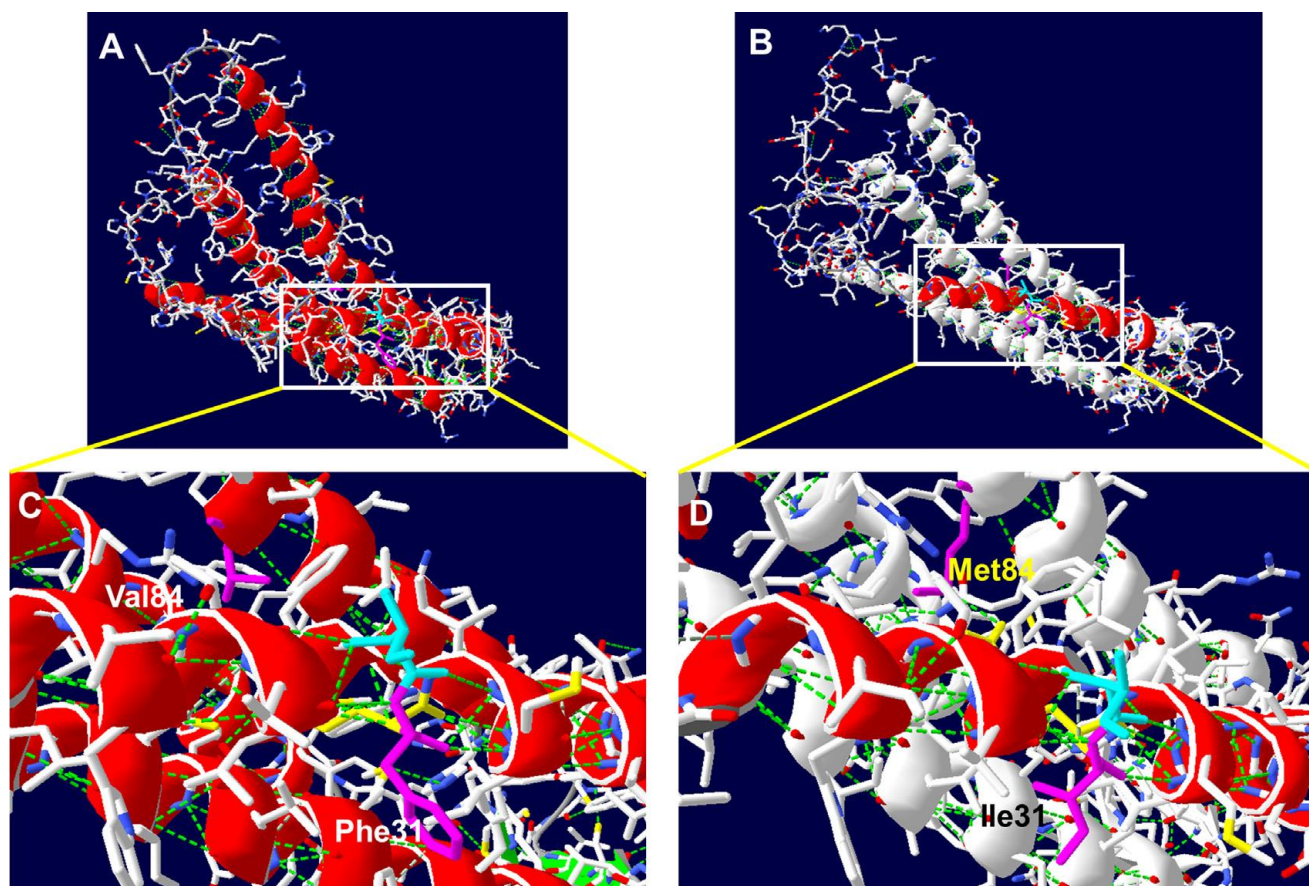
p.R32S



p.E47*

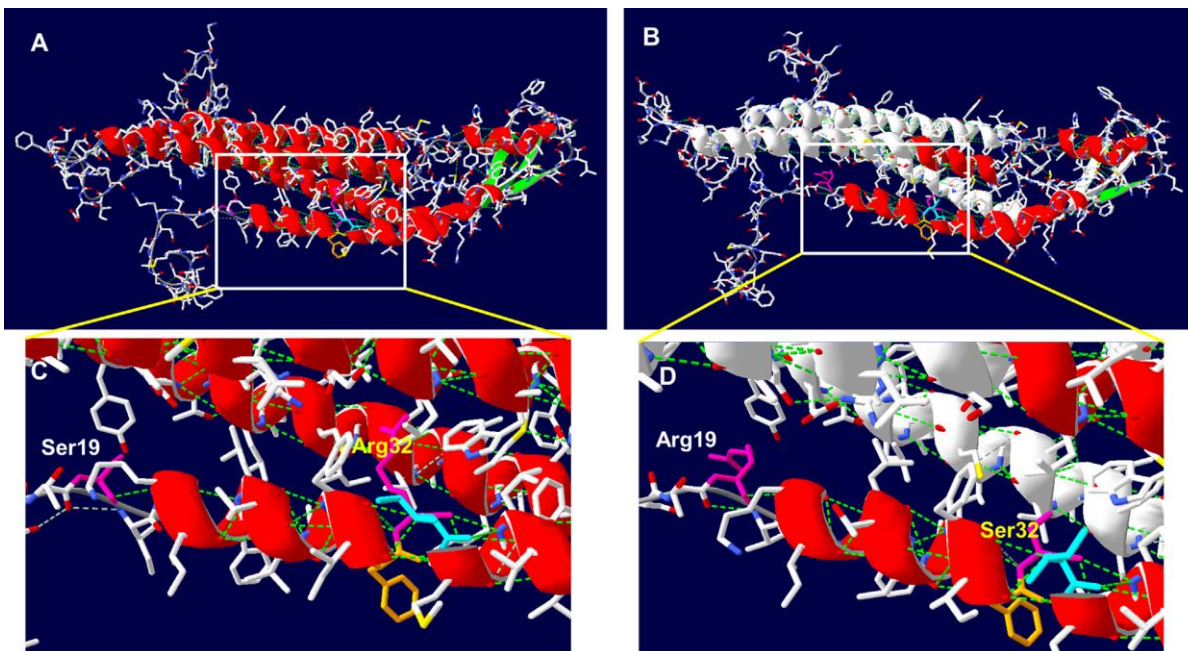


ANEXO 6. Modelado de la proteína GJB2 de la familia 4



A y B muestran la proteína de tipo salvaje y la proteína mutante, respectivamente; alfa hélices en rojo, hojas beta en verde, bobinas y bucles en gris. (B) Proteína truncada (p.W44 * con una pérdida de 183 aminoácidos) con ausencia de hélices alfa y hojas beta en blanco. C y D muestran una ampliación del cuadrado blanco de las imágenes A y B, respectivamente; Los cambios en las posiciones p.F31I y p.V84M (rosa), no muestran ganancia o pérdida de enlaces de hidrógeno. En colores amarillo y azul claro están los aminoácidos vecinos de p.V84M (isoleucina 30 y arginina 32, respectivamente).

ANEXO 7. Modelado de GJB2 de la familia 5



El modelo explica los cambios en ambos alelos. A y B muestran el tipo salvaje y las proteínas mutantes, respectivamente; alfa hélices en rojo, hojas beta en verde, bucles y bobinas en gris. (B) proteína truncada (p.E47 * con una pérdida de 180 aminoácidos) con ausencia de hélices alfa y hojas beta en blanco.

C y D muestran una ampliación del cuadrado blanco de las imágenes A y B, respectivamente; El cambio en la posición p.S19R (rosa), no muestra ganancia o pérdida de enlaces de hidrógeno, mientras que el cambio en la posición p.R32S (rosa) muestra la pérdida de un fuerte enlace de hidrógeno (punteado líneas verdes). En naranja y azul claro son los aminoácidos vecinos de p.R32S (Fenilalanina 31 e isoleucina 33, respectivamente).