

INFLUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES DE CONEXINA EN EL DESARROLLO DE HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA

Dres. L. P. Gravina¹, M. E. Prieto², M. E. Foncuberta¹, J. Garrido³, H. Martín², V. Aráoz¹, C. Barreiro³, L. Chertkoff¹

RESUMEN

La principal causa de hipoacusia no-sindrómica autosómica recesiva (HNSAR) son mutaciones en el locus DFNB1, que contiene los genes *GJB2* (conexina 26) y *GJB6* (conexina 30). Se han descrito más de 100 mutaciones diferentes en *GJB2*. Dos deleciones en *GJB6*, del (*GJB6-D13S1830*) y del(*GJB6-D13S1854*) mostraron ser prevalentes en España. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6*, en niños con HNSAR de Argentina. Este estudio incluyó 113 niños no relacionados con hipoacusia neurosensorial no-sindrómica moderada a profunda. Para el análisis molecular se utilizó una estrategia en etapas. La mutación 35delG (gen *GJB2*) se analizó mediante PCR-RFLP. La presencia de deleciones en *GJB6* se investigó por PCR múltiple. Las muestras no resueltas en las dos primeras etapas fueron analizadas por secuenciación directa del gen *GJB2*. En 58 pacientes se encontraron alteraciones en la secuencia de los genes *GJB2/GJB6*. La mutación 35delG se detectó en 52 de los 84 alelos con mutaciones patogénicas. Se identificaron 16 variantes de secuencia diferentes; entre ellas una mutación no descripta previamente, 262G>C (A88P). La deleción del (*GJB6-D13S1830*) fue identificada en 7 alelos. La frecuencia de mutaciones en *GJB2/GJB6* encontrada en este trabajo está en concordancia con la de otras poblaciones caucásicas. La mutación más prevalente fue 35delG y la segunda mutación más común la deleción del (*GJB6-D13S1830*), con frecuencias similares a las encontradas en España, desde donde Argentina recibió una de sus mayores olas inmigratorias. Estos resultados destacan la importancia del estudio de los genes *GJB2/GJB6* en el diagnóstico etiológico de sordera permitiendo un tratamiento precoz y un asesoramiento genético oportuno.

Palabras clave: Sordera, *GJB2*, *GJB6*, Conexina 26, Conexina 30.

Medicina Infantil 2012; XIX: 95 - 103.

ABSTRACT

The main cause of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss (ARNSHL) are mutations in genes *GJB2* (connexin 26) and *GJB6* (connexin 30) at the DFNB1 locus. More than 100 different mutations in *GJB2* have been described. Two deletions in *GJB6*, of (*GJB6-D13S1830*) and of (*GJB6-D13S1854*) have been found prevalent in Spain. The aim of this study was to determine the prevalence of *GJB2* and *GJB6* gene mutations in children with ARNSHL in Argentina. In the study, 113 non-related children with moderate to profound nonsyndromic sensorineural hearing loss were included. A staging strategy was used for molecular analysis. The 35delG mutation (gene *GJB2*) was analyzed using PCR-RFLP. The presence of deletions in *GJB6* was tested by multiplex PCR. Samples that were not resolved in the first two stages were subsequently assessed by direct sequencing of the *GJB2* gene. In 58 patients abnormal patterns were found in the *GJB2/GJB6* sequences. The 35delG mutation was detected in 52 of the 84 alleles with pathogenic mutations. Sixteen different sequence variants were identified of which one, 262G>C (A88P), was not previously described. Deletion of (*GJB6-D13S1830*) was identified in 7 alleles. The rate of mutations in *GJB2/GJB6* found in this study is similar to that reported in other Caucasian populations. The most prevalent mutation was 35delG followed by a deletion of (*GJB6-D13S1830*), with a rate similar to that found in Spain from which Argentina received one of the largest waves of immigrants. These results emphasize the need to study *GJB2/GJB6* genes in the etiological diagnosis of hearing loss allowing for early treatment and adequate genetic counseling.

Key words: Hearing loss, *GJB2*, *GJB6*, Connexin 26, Connexin 30.

Medicina Infantil 2012; XIX: 95 - 103.

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Genética,

² Servicio de Otorrinolaringología,

³ Servicio de Genética,

Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

Correspondencia: Luis Pablo Gravina - lpgravina@yahoo.com.ar
Combate de los Pozos 1881 - CABA

INTRODUCCION

La hipoacusia congénita o de aparición temprana es un trastorno sensorial muy frecuente en niños, con una incidencia aproximada de 1/1000 recién nacidos. Se considera que esta incidencia

continúa aumentando durante la infancia hasta alcanzar valores de 2,7 cada 1000 niños menores a 5 años y 3,5 cada 1000 durante la adolescencia¹. Las causas de deficiencia auditiva son diversas, pueden intervenir factores genéticos, ambientales o ambos. En los países industrializados se estima que las causas genéticas representan un 50 a 60% de los casos². Aproximadamente el 80% de esta sordera hereditaria es no sindrómica y tiene un patrón de herencia autosómico recesivo.

Hasta el presente se han reconocido más de 30 genes asociados con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva (HNSAR)³. A pesar de esta gran heterogeneidad genética, hasta un 50% de los casos se deben a mutaciones en una única región del cromosoma 13, el locus DFNB1⁴. Este locus contiene los genes *GJB2* y *GJB6*, que codifican para la conexina 26 (CX26) y la conexina 30 (CX30), dos proteínas que se expresan en forma predominante en la cóclea. Seis unidades de estas proteínas forman hemicanales (conexones) que, en la superficie de células adyacentes, se unen entre sí para formar canales intercelulares (uniones *GAP*). Se ha propuesto que, en la cóclea, las uniones *GAP* participan en el reciclado de iones K^+ desde las células ciliadas a la estría vascular, donde se bombean hacia la endolinfa coclear. El mantenimiento de la composición iónica de la endolinfa y el potencial endococlear resultante representan un mecanismo esencial para la transducción de las ondas sonoras en impulsos nerviosos y, en consecuencia, para una adecuada función auditiva^{5,6}.

La hipoacusia debida a mutaciones en el locus DFNB1 se caracteriza por ser de inicio prelingual, por un grado de severidad que varía generalmente de moderado a profundo (aunque también hay casos leves en menor proporción) con variaciones inter e intrafamiliares, es decir, que aún con la misma mutación puede encontrarse una evolución diferente⁷. La hipoacusia es generalmente bilateral y estable, y las audiometrías son, en su mayoría, planas o descendentes, y afectan a todas las frecuencias⁸.

Se han reportado más de 100 mutaciones en el gen *GJB2*⁹, sin embargo, la mutación más frecuente, 35delG, representa hasta un 85% de los alelos mutados¹⁰. Esta mutación, causada por la delección de una de las seis guaninas (G) que se encuentran entre los nucleótidos 30 y 35, resulta en la aparición de un codón de *stop* prematuro en el nucleótido 38, produciendo, en consecuencia, una proteína más corta que la normal. Entre las mutaciones identificadas en *GJB2*, además de aquellas que dan lugar a proteínas truncas que producen pérdida de función (como 35delG), existen también aquellas que cambian un aminoácido por otro (ej: V37I), y que alteran la secuencia peptídica o la conformación de la proteína con diversas consecuencias (anclaje

incorrecto a la membrana, alteraciones en la apertura del canal, conductancia alterada, incorrecta interacción entre proteínas, etc). El espectro de mutaciones en *GJB2* varía sustancialmente entre poblaciones de diferente origen étnico, existiendo mutaciones que son características de una determinada población. Así, 35delG es muy frecuente en individuos caucásicos, con una frecuencia de portadores en población general que oscila entre 1/25 y 1/200¹¹⁻¹⁴. En un trabajo previo realizado en población general de nuestro país, encontramos que la frecuencia de portadores de 35delG fue de 1/65, resultando menor a la encontrada en España e Italia, países desde los que Argentina recibió sus mayores olas inmigratorias¹⁵. Otros ejemplos de mutaciones propias de una población son: 167delT en judíos ashkenazi (frecuencia de portadores 1/25)¹⁶, 235delC en japoneses (1/50 a 1/100)¹⁷ y V37I en población de Taiwan (1/9)¹⁸.

En el gen *GJB6*, la principal mutación descrita es una gran delección de 309 kb que involucra la región 5' del gen^{19,20}. Esta delección, denominada del (*GJB6-D13S1830*) es la segunda mutación más frecuente asociada a sordera prelingual en la población española, detrás de 35delG²⁰. Del Castillo y col. describieron, además, otra delección en el gen *GJB6*, llamada del (*GJB6-D13S1854*), que resulta en la pérdida de un segmento de ADN de 232kb. Esta última, aunque parece ser menos frecuente que del (*GJB6-D13S1830*), también es prevalente en España²¹.

Como la mayoría de los países latinoamericanos, la población argentina está compuesta por al menos dos grupos étnicos diferentes, el componente nativo autóctono y el componente europeo foráneo. En ese contexto la población argentina es considerada como una de las más caucásicas de América Latina, principalmente compuesta por descendientes de españoles e italianos. Teniendo en cuenta este background étnico resulta importante establecer el espectro de mutaciones en *GJB2* y *GJB6* que afectan nuestra población. Los primeros estudios realizados en Argentina parecerían mostrar, al igual que en población española, que 35delG y del (*GJB6-D13S1830*) son las mutaciones más frecuentes en pacientes con hipoacusia no sindrómica²²⁻²⁴.

El conocimiento profundo y detallado de las causas genéticas de la hipoacusia provee las herramientas para el diagnóstico molecular, optimiza el asesoramiento genético y facilita el diagnóstico precoz, aún prenatal, de los pacientes. Al mismo tiempo, la detección precoz tiene un impacto inmediato en la implementación de terapias que permiten una estimulación auditiva temprana. Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo principal de este trabajo fue determinar la prevalencia de las mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6*, en niños

con Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica de nuestro país. Un segundo objetivo fue comparar la frecuencia de la deleción del (*GJB6*-D13S1830) encontrada en nuestra población con la descripta en diferentes países.

PACIENTES Y METODOS

En este estudio se incluyeron 113 niños no relacionados con hipoacusia neurosensorial no sindrómica moderada a profunda, diagnosticados y seguidos por los Servicios de Genética y Otorrinolaringología del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, durante el período 2003-2011.

La evaluación clínica de cada paciente incluyó una historia clínica completa, examinación otoscópica/física, y audiometría. En todos los casos se realizaron evaluaciones oftalmológicas (incluyendo fondo de ojo) y tomografía computada (con cortes axiales y coronales). A partir de estas evaluaciones, se excluyeron del estudio los pacientes con: características de hipoacusia sindrómica, potenciales causas ambientales, anatomía coclear anormal y modo de herencia autosómico dominante.

Los pacientes provinieron de diferentes regiones del país: 20 de la Ciudad de Buenos Aires (18%), 61 de la Provincia de Bs. As (54%), y los restantes 32 (28%) de las provincias de Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán.

Los padres de cada participante firmaron un consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética del Hospital.

Evaluación audiológica

Se realizó audiometría con tonos puros evaluando tanto la vía área como la ósea en todos los casos donde la maduración del niño lo permitió. Los métodos utilizados para obtener los umbrales tonales fueron los acordes a la edad madurativa; ya sea por métodos convencionales, por juego o por observación de la conducta. En los casos donde las respuestas obtenidas a través del método subjetivo no fueron confiables, o los resultados incompletos, se completó la evaluación con métodos objetivos como otoemisiones acústicas (OEA), potenciales evocados auditivos de tronco cerebral con umbrales (BERA) y obtención de la curva SN10. La severidad de la sordera fue clasificada de acuerdo a la siguiente escala: pérdida leve (15-30 dB), moderada (30-60 dB), severa (60-90 dB) y profunda (>90 dB).

Una vez completado el diagnóstico y realizada la intervención terapéutica adecuada (audífonos/implante) el criterio audiológico para controlar la hipoacusia fue el siguiente: los niños equipados con audífonos menores de 1 año se controlaron mensualmente y los menores de 3 años cada dos meses. En todos los casos donde había signos de

descenso auditivo se realizaron controles con mayor frecuencia. Cuando se completó el lenguaje o las pérdidas auditivas fueron menores, los controles se extendieron a intervalos de 6 meses. Los niños implantados tuvieron un esquema de controles diferente: al mes del implante, a los dos meses, cada tres meses durante los dos primeros años y luego cada 6 meses; cuando alcanzaron un formato abierto del habla y estabilidad en todos los parámetros en la programación de su implante, el control se extendió a 1 año.

Análisis Molecular

Se extrajo ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica mediante procedimientos convencionales basados en precipitación salina.

Para el análisis molecular se utilizó una estrategia que incluía diferentes etapas. En primer lugar, se analizó la mutación 35delG en todas las muestras de ADN mediante la técnica de PCR-RFLP, utilizando la enzima de restricción *Bs*/I¹², y posterior electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3% (Agarosa 1000 – Invitrogen) (Figura 1).

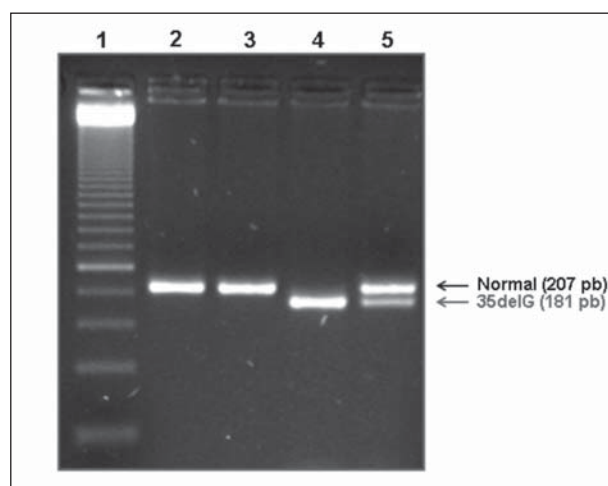


Figura 1: Test para la detección de la mutación 35delG. La técnica utilizada consiste en una amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de un segmento de ADN de 207 pares de bases (pb), utilizando *primers* que flanquean la región que contiene el sitio de la mutación. El producto amplificado se somete a digestión con la enzima de restricción *Bs*II. Cuando la mutación 35delG está presente, la enzima de restricción corta el segmento de 207 pb en fragmentos de 181 y 26 pb. En ausencia de la mutación, la enzima no encuentra un sitio de corte y el producto de PCR de 207 pb se mantiene intacto. En la figura se observa una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3% para separar los fragmentos digeridos. Calle 1: marcador de peso molecular de 50 pb. Calle 2 y 3: normal. Calle 4: 35delG homocigota. Calle 5: 35delG heterocigota. En cada gel, se utilizaron como controles positivos muestras de pacientes homocigotas y heterocigotas para 35delG, confirmadas por secuenciación.

En la segunda etapa, se analizó la presencia de deleciones en *GJB6* en las muestras que no habían

sido resueltas en la primera etapa, es decir, aquellas que habían resultado heterocigotas o negativas para 35delG. Las deleciones del (*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854) fueron analizadas mediante una PCR múltiple utilizando el método y los primers descriptos por del Castillo²¹ (Figura 2).

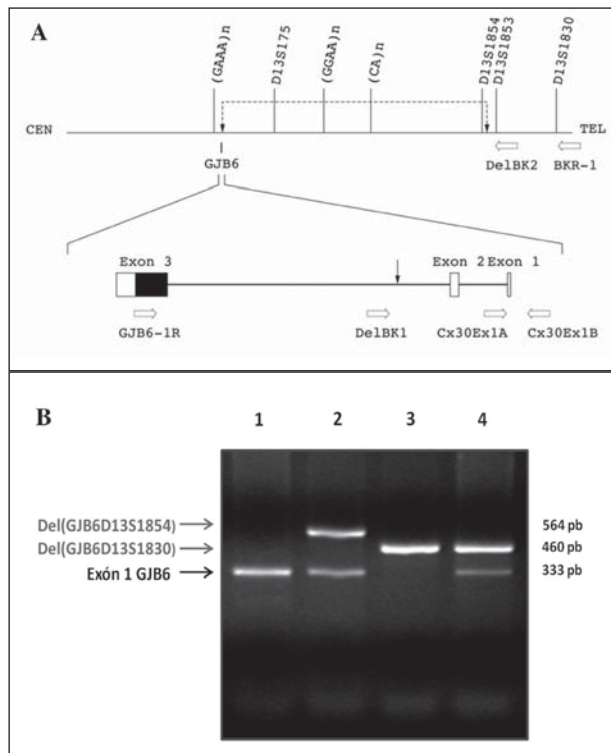


Figura 2: Test para la detección de las deleciones del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854). El fundamento del método consiste en amplificar segmentos de ADN que contienen el punto de ruptura de cada deleción, así como un segmento que contiene el exón 1 del gen *GJB6*, que se utiliza como un control para comprobar la eficacia de la PCR y para distinguir heterocigosidad u homocigosidad para cualquiera de las dos deleciones (el exón 1 de *GJB6* se elimina en ambas deleciones).

(A) Esquema que muestra la ubicación de los primers utilizados en el ensayo de PCR múltiple. *GJB6*-1R y BKR-1 (para la amplificación del punto de ruptura de la deleción del(*GJB6*-D13S1830)); DelBK1 y DelBK2 (para la amplificación del punto de ruptura de la deleción del(*GJB6*-D13S1854)); Cx30Ex1A y Cx30Ex1B (para amplificar el exón 1 de *GJB6*).

(B) Separación de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. La posición de los productos de PCR correspondientes a las deleciones y el exón 1 de *GJB6* se indican con flechas a la izquierda, y sus tamaños en pares de bases (pb) se muestran a la derecha. Calle 1: normal. Calle 2: del(*GJB6*-D13S1854) heterocigota. Calle 3: del(*GJB6*-D13S1830) homocigota. Calle 4: del(*GJB6*-D13S1830) heterocigota.

Después de estudiar la mutación 35delG y las deleciones en *GJB6*, las muestras en que no fue posible establecer el genotipo completo fueron analizadas por secuenciación directa de la región codificante del gen *GJB2*. Para ello se realizó se-

cuenciación bi-direccional del exón 2²⁵ (ABI PRISM Big Dye Terminator sequencing kit). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias publicadas en *GenBank* (NCBI accession number M86849 para *GJB2*).

Finalmente, se analizó la mutación de *splicing* IVS1+1G→A por PCR/RFLP. Para ello, se amplificó el exón 1 y la región donante de *splicing* utilizando primers descriptos previamente²⁶ y el producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción *HphI*²⁷.

Análisis Estadístico

Para comparar la frecuencia de la mutación del(*GJB6*-D13S1830) observada en este estudio con la de otras poblaciones descriptas en la literatura se utilizó Test exacto de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

En los 113 niños incluidos en este estudio el trastorno auditivo fue bilateral y prelingual. La media de edad fue de 5 años y medio, con un rango de 3 meses a 17 años. La distribución por sexo mostró predominio femenino, 66 mujeres y 47 varones.

En 58 de los 113 pacientes no relacionados analizados se encontraron alteraciones en la secuencia de los genes *GJB2* y *GJB6*. Excluyendo las variantes no patogénicas descriptas en la literatura, el número de pacientes que presentó al menos un alelo con mutaciones patogénicas fue de 44 (39%); en el 90% de ellos se pudo establecer el genotipo completo. Los genotipos identificados y el grado de sordera asociado a cada genotipo se muestran en la Tabla 1. En las familias de pacientes con mutaciones identificadas, se estudiaron padres y hermanos para proveer un adecuado asesoramiento genético.

La mutación más prevalente, 35delG, se encontró en 52 de los 84 alelos con mutaciones patogénicas. La segunda mutación prevalente en el gen *GJB2* fue R143W con cuatro alelos detectados y la tercera, 167delT con 3 alelos. Otras seis mutaciones en *GJB2* se presentaron en más de un alelo: V37I, E47X, E147K, R184P, N206S y la mutación de *splicing* IVS1+1G→A. En total, por secuenciación directa del gen *GJB2*, se identificaron 16 variantes de secuencia diferentes. Entre ellas se encontró una mutación que no había sido descrita previamente (Figura 3). Esta nueva mutación, causada por un cambio de guanina por citosina en el nucleótido 262 del gen *GJB2*, genera una modificación de la secuencia de aminoácidos, reemplazando una Arginina por Prolina (A88P). La mutación A88P fue detectada en estado heterocigota en un paciente con sordera profunda que en el otro alelo presentó la variante no patogénica V27I.

TABLA 1: GENOTIPOS Y SEVERIDAD DE LA HIPOACUSIA EN LOS 58 PACIENTES CON MUTACIONES EN *GJB2* Y *GJB6*.

Nº de pacientes	Genotipo	Grado de sordera
19	35delG/35delG	12 profunda, 5 severa, 2 Sev/Prof
2	35delG/del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	Profunda
2	35delG/IVS1+1G→A	Severa
2	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)/del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	Profunda
1	35delG/del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	Moderada
1	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)/R184P	Profunda
2	35delG/167delT	Severa/Profunda
1	35delG/R143W	Profunda
1	35delG/E47X	Severa/Profunda
1	35delG/269insT	Profunda
1	35delG/W77R	Profunda
1	35delG/N206S	Moderada
1	35delG/V84L	Severa/Profunda
1	167delT/V37I	Severa/Profunda
1	R143W/E47X	Profunda
1	R143W/R184P	Severa
1	R143W/V37I/V27I*	Moderada
1	E147K/E147K	Severa
1	A88P/V27I*	Profunda
1	35delG/desconocido	Profunda
1	N206S/desconocido	Profunda
1	K168R/desconocido	Severa
1	C/T at 682*/desconocido	Severa/Profunda
13	V27I*/desconocido	7 Profunda, 4 Severa, 2 Moderada

* variantes no patogénicas

En el gen *GJB6*, la delección denominada del(*GJB6*-D13S1830) fue identificada en 7 alelos mientras que la delección del(*GJB6*-D13S1854) se encontró en sólo uno, representando, en conjunto, el 10% de los alelos patogénicos. Es importante destacar que se detectaron 2 pacientes homocigotas para del(*GJB6*-D13S1830), ambos con padres no consanguíneos. Cuando comparamos la frecuencia de del(*GJB6*-D13S1830) encontrada en este estudio con las descritas en un estudio multicéntrico de diferentes países, observamos que Argentina tiene una frecuencia de del(*GJB6*-D13S1830) tan alta como la encontrada en España. Esta frecuencia resultó significativamente superior a la de Italia, Bélgica, EEUU y Australia (Tabla 2).

En relación al genotipo y la severidad de la pérdida auditiva, se observó que todos los pacientes homocigotas 35delG mostraron un grado de sordera severo a profundo mientras que los pacientes con sordera moderada presentaron al menos un alelo no 35delG. Por otro lado, aunque la bibliografía describe que la hipoacusia debida a mutaciones en los genes de conexina es generalmente estable, los pacientes homocigotas 35delG de este estudio sufrieron un deterioro auditivo en el primer año de vida, progresando hacia una hipoacusia severa o profunda bilateral. En cambio, los pacientes con delección homocigota en el gen *GJB6* presentaron una hipoacusia neurosensorial profunda bilateral desde el inicio. Independientemente de estas diferencias, tanto los homocigotas 35delG como los homocigotas del(*GJB6*-D13S1830) fueron candidatos a implante coclear. Otra diferencia observada entre ambos grupos fue la evolución con respecto al implante coclear. Si bien en ambos casos fue buena, observamos, en un comienzo, un mejor y más rápido desempeño de las habilidades auditivas en los pacientes homocigotas 35delG. Finalmente ambos grupos alcanzan la máxima categoría de percepción del habla de Moogs y Geers (reconocimiento de palabras en un formato abierto)³⁰.



Figura 3: Análisis de la secuencia de ADN del gen *GJB2* con primers en sentido directo (A) y reverso (B) que muestra la mutación A88P (262 G>C).

TABLA 2: FRECUENCIA DE LA DELECIÓN DEL(GJB6-D13S1830) ENTRE LOS ALELOS CON MUTACIONES EN EL LOCUS DFNB1 EN DIFERENTES POBLACIONES (MODIFICACION DE LA TABLA ORIGINAL DE DEL CASTILLO Y COL²⁸).

País/Ciudad	Alelos del(GJB6-D13S1830) / Total alelos DFNB1 ^a	P	Referencia
Argentina	7/80 (8.8%)	---	Este estudio
Brasil	7/124 (5.6%)	0.4081	(29)
España/Madrid	31/408 (7.6%)	0.6541	(28)
España/Barcelona	7/72 (9.7%)	1.0000	(28)
Italia/Ferrara	2/124 (1.6%)	0.0300	(28)
Italia/Nápoles	0/494 (0%)	<0.0001	(28)
Francia	23/280 (8.2%)	0.8219	(28)
Bélgica	2/138 (1.4%)	0.0132	(28)
Reino Unido	6/102 (5.9%)	0.5653	(28)
Israel/Tel Aviv	9/126 (7.1%)	0.7906	(28)
Israel/Jerusalem	5/84 (6.0%)	0.5585	(28)
EE.UU./Virginia	16/356 (4.5%)	0.1609	(28)
EE.UU./Iowa	7/434 (1.6%)	0.0024	(28)
Australia	2/150 (1.3%)	0.0095	(28)

^a contribuyen al total sólo los casos donde fueron identificados ambos alelos DFNB1.

DISCUSION

En los últimos años ha habido un gran avance en la comprensión de las causas genéticas de la hipoacusia, especialmente en el caso de la sordera no sindrómica autosómica recesiva. En muchos países a lo largo de todo el mundo se han llevado a cabo estudios para determinar la epidemiología molecular de la hipoacusia debida a mutaciones en el locus DFNB1. Estos estudios han revelado principalmente que la mutación 35delG, en el gen *GJB2*, es la principal alteración molecular que se encuentra en poblaciones caucásicas de Europa y Norteamérica^{10,31}. Por otro lado, también se ha mostrado que una delección en el gen *GJB6*, del(GJB6-D13S1830), tiene alta frecuencia en distintas poblaciones, especialmente en España, en donde ocupa el segundo lugar entre las mutaciones causantes de sordera prelingual²⁰.

En los primeros estudios realizados en Argentina, tanto por nuestro grupo que estudia pacientes pediátricos como por otro que lo hace en adultos, 35delG y del(GJB6-D13S1830) aparecen como las mutaciones más frecuentes en individuos con sordera no sindrómica²²⁻²⁴. Asimismo, en estudios realizados en población general de nuestro país hemos encontrado que la frecuencia de portadores de 35delG es de 1/65¹⁵, valor similar al estimado para la mutación ΔF508, la alteración genética más frecuente en Fibrosis Quística^{32,33}. En este trabajo, estudiamos una población pediátrica que incluye un mayor número de pacientes e investigamos otras mutaciones que no se habían analizado en estu-

dios previos, con el objetivo de determinar la real influencia de las mutaciones en los genes *GJB2/GJB6* en el desarrollo de sordera no sindrómica en Argentina.

Como la mayoría de los países latinoamericanos, el background étnico de la población argentina es consecuencia de la combinación de genes nativos con genes provenientes predominantemente de países europeos mediterráneos. Argentina fue originalmente una colonia española que hacia fines del siglo XIX recibió importantes olas inmigratorias de Italia y España, y en menor proporción del este y centro de Europa, y de medio oriente³⁴. En ese contexto, Argentina es considerada una de las poblaciones más caucásicas de América Latina³⁵.

La frecuencia global de mutaciones en *GJB2/GJB6* encontrada en este trabajo está en concordancia con la hallada en otras poblaciones caucásicas^{9,36-38}. Como se esperaba, la mutación más prevalente fue 35delG, representando el 62% de todos los alelos patogénicos (*GJB2/GJB6*) y el 68% de los alelos con mutaciones en *GJB2*. Esta frecuencia se encuentra en un valor intermedio entre la reportada en España (55%) e Italia (76%)^{10,39}.

La delección del(GJB6-D13S1830) fue la segunda mutación más común; su frecuencia resulta similar a la encontrada en España y significativamente superior a la reportada en Italia^{28,39}. La inclusión en el estudio de la otra delección descrita en *GJB6*, del(GJB6-D13S1854), permitió establecer el genotipo completo en uno de los cinco pacientes que permanecían con una única mutación detectada. De manera similar, en España, Del Castillo y col.

describieron esta mutación en el 25% de los pacientes heterocigotas para *GJB2* que continuaban sin ser resueltos después del análisis de del(*GJB2*-D13S1830)²¹.

La tercera mutación más frecuente fue R143W, que estuvo presente en el 5% de los alelos patogénicos. Esta frecuencia es comparable con la observada en la población hispánica que reside en Norteamérica⁴⁰. R143W, que originalmente se describió con una alta frecuencia en una villa africana⁴¹, se ha reportado más recientemente con una frecuencia cercana a 1% en estudios multicéntricos de Europa y Norteamérica^{40,42}.

La mutación 167delT, altamente frecuente en Judíos Ashkenazi¹⁶, se encontró en el 4% de los alelos patogénicos detectados en nuestro estudio. La presencia de 167delT no es sorprendente, ya que Argentina es considerada el segundo país del continente americano en haber recibido la diáspora judía⁴³. Esta mutación no había sido encontrada en un estudio previo realizado por otro grupo de nuestro país probablemente debido al número de alelos analizados²³.

La mayoría de las mutaciones en el gen *GJB2* descritas a la fecha están localizadas en la región codificante (exón 2) y sólo unas pocas se han reportado en regiones no codificantes; entre ellas se encuentra la mutación de splicing IVS1+1G→A, que flanquea el exón¹⁸. Esta mutación aparentemente ha sido subdiagnosticada en muchas poblaciones ya que habitualmente no es analizada⁴². Sin embargo, IVS1+1G→A parece ser relativamente frecuente en algunas poblaciones caucásicas, particularmente en la República Checa y Holanda^{27,44} y también en Turquía⁴⁵. Esta mutación, que no había sido estudiada previamente en nuestra población, fue encontrada en el 3% de los alelos patogénicos. Su frecuencia es similar a la descrita recientemente en población brasileña⁴⁶. En consecuencia, se puede concluir que el análisis de la mutación IVS1+1G→A debe ser parte del algoritmo diagnóstico de sordera no sindrómica en población argentina.

Con respecto a las mutaciones menos prevalentes, es interesante destacar el caso de un paciente que resultó homocigota para la mutación E147K. Este niño proviene de la región andina y pertenece a la comunidad Mapuche. Es probable que la homocigosidad encontrada para esta rara mutación se deba a consanguinidad ya que es conocida la alta endogamia de esta comunidad indígena⁴⁷.

La secuenciación del gen *GJB2* permitió, además, detectar una nueva mutación que no había sido descrita previamente en la literatura. Esta mutación, A88P, es causada por un cambio de Guanina por Citosina en el nucleótido 262 del gen, afectando el segundo dominio transmembrana (TM2) de la proteína Conexina 26. El aminoácido Alanina en la posición 88, es un residuo altamente

conservado en diferentes especies (ratones, ratas y ovejas)⁴⁸. La sustitución de Alanina por Prolina, un aminoácido que tiene el átomo de nitrógeno del grupo amino incorporado en un anillo, altera la organización habitual del polipéptido provocando un brusco cambio en la dirección de la cadena. Por lo tanto, es muy probable que este cambio produzca un efecto deletéreo sobre la función de la proteína. Dado que esta nueva mutación fue encontrada en un solo paciente que también llevó la variante no patogénica V27I, el potencial patogénico de este alelo queda por ser determinado. Frei y col ya habían descrito en el mismo nucleótido una mutación patogénica, que resulta de la sustitución de Alanina por Serina⁴⁸.

Como resultado de la estrategia utilizada en el presente estudio, se pudo establecer el genotipo completo en el 90% de los pacientes con mutaciones en los genes *GJB2/GJB6*. Para los pocos casos restantes con una sola mutación identificada, sería interesante analizar la región del promotor o de otras regiones no codificantes de *GJB2*. En ese sentido, recientemente se ha descrito una mutación en el promotor de *GJB2* en una familia con hipoacusia neurosensorial no sindrómica⁴⁹.

Si tenemos en cuenta la frecuencia de portadores de 35delG que hallamos en un estudio previo en población general (1/65), y considerando que el modo de herencia es autosómico recesivo, entonces 1 cada 16900 sujetos de la población general podrían ser 35delG homocigotas. Considerando que la tasa de nacimientos de Argentina es aproximadamente 700.000 nacimientos/año⁵⁰, se podría esperar que al año nazcan 41 niños homocigotas 35delG. De acuerdo a los resultados del presente trabajo, los homocigotas 35delG representan aproximadamente el 40% de los niños con Hipoacusia Neurosensorial no Sindrómica con al menos una mutación en los genes *GJB2/GJB6*. Por lo tanto, en Argentina, se podrían diagnosticar tempranamente mediante el análisis de los genes de conexina unos 100 niños por año.

Se encuentra bien establecido que la identificación y el tratamiento precoz de la pérdida de audición congénita resulta de suma importancia, más aún teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad (50 veces más frecuente que la fenilcetonuria), y los beneficios asociados con los programas de intervención temprana (entre ellos, los mejores resultados del implante coclear cuando se realiza antes de los 24 meses de edad)⁵¹. Sobre la base de estas premisas, en países desarrollados se han implementado programas universales de pesquisa auditiva del recién nacido. Como resultado, el promedio de edad de detección se redujo de 12-18 meses a 6 meses o menos⁵². El *screening* del recién nacido se realiza a través de emisiones otoacústicas (OAE) y potenciales evocados auditivos de

tronco cerebral (BERA). En el caso que se detecte una hipoacusia, se complementa con estudios audiológicos subjetivos y se ingresa al niño en un seguimiento más estricto para así lograr una intervención temprana. Para los bebés que no pasan la prueba de *screening* auditivo, el diagnóstico debe ser completado tan pronto como sea posible y no más tarde de la edad de 3 meses. En todos estos casos, el estudio de los genes *GJB2/GJB6* resulta una herramienta muy útil como complemento del *screening* audiológico.

La implementación de un Programa Nacional de Detección Temprana de Hipoacusias en la Argentina parece ser particularmente compleja, ya que es un país muy extenso con una distribución de recursos muy desigual. De hecho, muchas regiones del país no tienen acceso a un nivel básico de tecnología o a servicios médicos especializados. En contraste, los Programas de Pesquisa Neonatal ya están establecidos y la mayoría de la población tiene acceso gratuito mediante el envío de una gota de sangre seca. En la actualidad, el Programa de Pesquisa Neonatal de la Ciudad de Buenos Aires utiliza manchas secas de sangre para confirmar Fibrosis Quística mediante la búsqueda de mutaciones en el gen *CFTR*. Debido a las características sociales antes mencionadas, en Argentina hay un retraso en el diagnóstico que incrementa los costos de por vida esperados para la sordera. Por lo tanto, sería interesante evaluar la conveniencia de incluir el análisis de los genes *GJB2/GJB6* en el actual panel de *screening* de enfermedades congénitas.

Sin lugar a dudas, el estudio de los genes *GJB2* y *GJB6* ha contribuido en gran medida al esclarecimiento de la etiología de la sordera, y como consecuencia, ha mejorado el diagnóstico y el asesoramiento genético. Sin embargo, el número de pacientes en los que no se han encontrado mutaciones en alguno de estos genes todavía es alto, por lo tanto, en el caso de estos pacientes el desafío a futuro será determinar qué otros genes podrían estar implicados en el desarrollo de hipoacusia neurosensorial no sindrómica.

REFERENCIAS

1. Morton, C.C. and W.E. Nance, Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 2006; 354: p. 2151-64.
2. Hilgert, N., R.J. Smith, and G. Van Camp, Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res* 2008. Mar-Jun; 681(2-3):189-96.
3. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. <http://hereditaryhearingloss.org/>
4. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med*. 2002 Jul-Aug;4(4):258-74.
5. Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nevill G. Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. *J Comp Neurol*. 2003 Dec 8;467(2):207-31.
6. Zhao HB, Kikuchi T, Ngezhayay A and White TW. Gap junctions and cochlear homeostasis. *J. Membr. Biol.* 2006 Feb-Mar;209(2-3):177-86.

7. Hilgert N, Huentelman MJ, Thorburn AQ, Franssen E, Dieltjens N, Mueller-Malesinska M et al. Phenotypic variability of patients homozygous for the GJB2 mutation 35delG cannot be explained by the influence of one major modifier gene. *Eur J Hum Genet*. 2009 Apr;17(4):517-24.
8. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet*. 1999 Apr 17;353(9161):1298-303.
9. The Connexin-deafness homepage. <http://davinci.crg.es/deafness>
10. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet*. 1998 Feb 7;351(9100):394-8.
11. Gasparini P, Rabionet R, Barbuji G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jan;8(1):19-23.
12. Storm K, Willocx S, Flothmann K, Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mutat*. 1999;14(3):263-6.
13. Lucotte G, Bathelier C, Champenois T. PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France. *Mol Cell Probes*. 2001 Feb;15(1):57-9.
14. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 1999;281(23):2211-6.
15. Gravina LP, Foncuberta ME, Estrada RC, Barreiro C, Chertkoff L. Carrier frequency of the 35delG and A1555G deafness mutations in the Argentinean population. Impact on the newborn hearing screening. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 Apr;71(4):639-43.
16. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med*. 1998 Nov 19;339(21):1500-5.
17. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet*. 2000 Jan;37(1):41-3.
18. Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, Huang CH, Chiang YL, Oong JL, et al. Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness. *Genet Med*. 2003 May-Jun;5(3):161-5.
19. Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat*. 2001 Nov;18(5):460.
20. 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 Jan 24;346(4):243-9.
21. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *J Med Genet*. 2005 Jul;42(7):588-94.
22. Gravina LP, Prieto ME, Garrido J, Foncuberta, ME, Martin H, Barreiro C, et al. Mutaciones en las conexinas 26 y 30 en niños con sordera no sindrómica. *Medicina* 2004;64: 313.
23. Dalamón V, Béheran A, Diamante F, Pallares N, Diamante V, Elgoyhen AB. Prevalence of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hear Res*. 2005;207(1-2):43-9.
24. Gravina LP, Foncuberta ME, Prieto ME, Garrido J, Barreiro C, Chertkoff L. Prevalence of DFNB1 mutations in Argentinean children with non-syndromic deafness. Report of a novel mutation in GJB2. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010 Mar;74(3):250-4.
25. Wu BL, Kenna M, Lip V, Irons M, Platt O. Use of a multiplex PCR/sequencing strategy to detect both connexin 30 (GJB6) 342 kb deletion and connexin 26 (GJB2) mutations in cases of childhood deafness. *Am J Med Genet A*. 2003 Aug 30;121(2):102-8.
26. Pandya A, Arnos K, Xia X, Welch K, Blanton S, Friedman T, et al. Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genet Med*. 2003 Jul-Aug;5(4):295-303.
27. Seeman P and Sakmaryová I. High prevalence of the IVS1+1G to A/GJB2 mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of GJB2. *Clin Genet* 2006; 69: 410-413.

28. del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, et al. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1452-8. Epub 2003 Oct 21.
29. de Oliveira CA, Alexandrino F, Christiani TV, Steiner CE, Cunha JL, Guerra AT, et al. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am J Med Genet A.* 2007 Jul 15;143A(14):1574-9.
30. Geers A.E. 1994. Techniques for assessing auditory speech perception and lipreading enhancement in young deaf children. In: A.E. Geers & J.S. Moog (eds.). *Effectiveness of Cochlear Implants and Tactile Aids for Deaf Children: The Sensory Aids Study at Central Institute for the Deaf.* Volta Review, 95, 85-96.
31. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature.* 1997 May 1;387(6628):80-3.
32. Visich A, Zielenski J, Castanos C, Diez G, Grenoville M, Segal E, Barreiro C, Tsui LC, Chertkoff L. Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet.* 2002 Mar;61(3):207-13.
33. Fibrosis Quística. Consenso de los Hospitales de la Ciudad de Buenos Aires. *Boletín Oficial de la Ciudad de Buenos Aires* 28/10/2005, N° 2306, p 29.
34. Macció GA, Elizalde D. La población no nativa de la Argentina. Buenos Aires: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 1996.
35. Palatnik M. Seroantropología argentina. *Sangre* 1966;11: 395-412.
36. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet.* 2000 Jan;106(1):40-4
37. Erbe CB, Harris KC, Runge-Samuels CL, Flanary VA, Wackym PA. Connexin 26 and connexin 30 mutations in children with non-syndromic hearing loss. *Laryngoscope.* 2004 Apr;114(4):607-11.
38. Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugere V, Templin C, Leprevost D, et al. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Med Genet.* 2004 Mar 6;5(1):5.
39. Gualandi E, Ravani A, Berto A, Burdo S, Trevisi P, Ferlini A, et al. Occurrence of del(GJB6-D13S1830) mutation in Italian non-syndromic hearing loss patients carrying a single GJB2 mutated allele. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2004 May;(552):29-34.
40. Putcha GV, Bejjani BA, Bleoo S, Booker JK, Carey JC, Carson N, et al. A multicenter study of the frequency and distribution of GJB2 and GJB6 mutations in a large North American cohort. *Genet Med.* 2007 Jul;9(7):413-26.
41. Brobby GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med.* 1998 Feb 19;338(8):548-50.
42. Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet.* 2005 Dec;77(6):945-57.
43. *Demographic Yearbook. Special topic: ethnic and economic characteristics.* New York, NY: Statistical office of the United Nations, 1956: 272-274.
44. Santos RL, Aulchenko YS, Huygen PL, van der Donk KP, de Wijs IJ, Kemperman MH, et al. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (GJB2) and connexin 30 (GJB6) mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005 Feb;69(2):165-74.
45. Sirmaci A, Akcayoz-Duman D, Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *J Genet.* 2006 Dec;85(3):213-6.
46. da Silva-Costa SM, Coeli FB, Lincoln-de-Carvalho CR, Marques-de-Faria AP, Kurc M, Pereira T, et al. Screening for the GJB2 c.-3170 G>A (IVS 1+1 G>A) Mutation in Brazilian Deaf Individuals Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009 Oct;13(5):701-4.
47. Ginther C, Corach D, Penacino G, Rey J, Carnese, Hutz M, et al. Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian Region of Argentina: Mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. *Experientia* 1993; 67: 211-9.
48. Frei K, Szuhai K, Lucas T, Weipoltshammer K, Schöfer C, Ramsebner R, et al. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *Eur J Hum Genet.* 2002 Jul;10(7):427-32.
49. Matos TD, Caria H, Simões-Teixeira H, Aasen T, Nickel R, Jagger DJ, et al. A novel hearing-loss-related mutation occurring in the GJB2 basal promoter. *J Med Genet.* 2007 Nov;44(11):721-5.
50. Ministerio de Salud (2004) "Boletín del Programa Nacional de Estadísticas de Salud. Estadísticas Vitales. Información básica. Año 2003". Serie 5 Número 47 Ministerio de Salud y Ambiente, Argentina.
51. White K. Early hearing detection and intervention programs: Opportunities for genetic services. *Am J Med Genet A* 2004;130(1):29-36.
52. Smith RJH, Bale JF, White KR. Sensorineural hearing loss in children. *The Lancet* 2005;365: 879-890.