



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**HIPOACUSIAS INFANTILES CAUSADAS POR MUTACIONES EN
GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA
TECTORIA Y EL PAQUETE DE ESTEREOCILIOS**

TESIS DOCTORAL

LAURA RUIZ PALMERO

Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**HIPOACUSIAS INFANTILES CAUSADAS POR MUTACIONES EN
GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA
TECTORIA Y EL PAQUETE DE ESTEREOCILIOS**

Memoria que, para optar al título de doctor,
presenta **Laura Ruiz Palmero**,
Licenciada en Biología

Director de Tesis
Dr. Francisco Javier del Castillo Fernández del Pino
Unidad de Genética Molecular
Hospital Universitario Ramón y Cajal

Unidad de Genética Molecular
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Madrid, 2012

Don Francisco Javier del Castillo Fernández del Pino, Doctor en Ciencias Biológicas,
Investigador de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Universitario Ramón y Cajal
de Madrid

CERTIFICA,

Que Doña Laura Ruiz Palmero ha realizado bajo su dirección el Trabajo de Tesis
Doctoral que lleva por título **“HIPOACUSIAS INFANTILES CAUSADAS POR
MUTACIONES EN GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA
TECTORIA Y EL PAQUETE DE ESTEREOCILIOS”**.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo,
por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometida a discusión ante el
Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 11 de Septiembre de 2012



Fdo: Dr. Francisco Javier del Castillo Fernández del Pino

Director de Tesis

Unidad de Genética Molecular

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid



VºB: Dra. María Belén Peral Fuentes

Tutora de Tesis

Profesora Honoraria UAM

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar brevemente mi agradecimiento a todos los que han hecho posible esta tesis. Por supuesto, quiero dar las gracias al Dr. Francisco J. del Castillo Fernández del Pino, director de esta tesis, por la confianza que ha depositado en mí desde el primer día y por enseñarme con entusiasmo, paciencia y absoluta dedicación todo lo que ahora sé. Quiero agradecer también al Dr. Ignacio del Castillo por su experiencia, rigor y gran intuición sin los que me habría sido imposible avanzar en momentos críticos de la investigación. También quiero agradecer al Dr. Felipe Moreno por permitirme empezar a trabajar en la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal y por su esfuerzo para conseguir financiar mis últimos meses de investigación. A la red CIBERER, Instituto de Salud Carlos III y al Ministerio de Economía y Competitividad por concederme la financiación en forma de becas y contratos para la realización de esta tesis. A los pacientes y sus familiares por su participación desinteresada y sin la cual este trabajo no habría sido posible.

A la Dra. Villamar por su interacción diaria con familiares y facultativos, que nos permite la obtención de nuevas muestras y datos clínicos. A Dolores Tellería por su trabajo a cargo de los aparatos de secuenciación, genotipado y dHPLC. A los Dres. José Luis San Millán, Concepción Hernández y Miguel Ángel Moreno, porque aunque no he trabajado bajo su dirección, he aprendido mucho de los seminarios que han impartido ellos o su equipo.

A las chicas del Laboratorio 12: Marta, Elena, María, Gema y Luciana por su apoyo en los malos momentos y por todos los buenos ratos que hemos vivido tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias a todas ellas por hacerme reír tanto. Al resto de mis compañeros: María Ángeles, Rosa, Merche, Susana, Matías, Fernando, Lucía, Yoli, Eli, Nati, Ana, María José, Gloria y Cristina porque siempre podré recordar con ellos algún momento divertido. A los compañeros que ya no están pero que son imposibles de olvidar por muchos buenos ratos: Fran, Montse, Ángeles, Leti, Luis, Antonio...

A mi hermana Isabel, por tantas noches estudiando y riendo juntas y porque aunque cuando le advertí lo duro que puede ser esto, sólo se fijó en lo fascinante que puede ser y también está embarcada en la escritura de un libro similar a este.

A David, porque desde que apareció en mi vida soy infinitamente más feliz simplemente por haberle encontrado. Por su infinita paciencia y por cómo me demuestra cada día lo mucho que me quiere.

Para terminar, quiero agradecer especialmente esta tesis a las personas más importantes de mi vida y de las que más apoyo y comprensión he recibido desde que con seis años les dije que quería estudiar algo llamado Genética Molecular sin saber siquiera qué significaba ni dónde lo

había escuchado: mis padres. He llegado exactamente a dónde os dije que llegaría y sólo vosotros sabéis lo que me ha costado. Este trabajo es para vosotros porque resume los valores en los que me habéis educado desde que recuerdo: sólo se llega con éxito al final de cualquier camino si eres capaz de trazarlo día a día con perseverancia y dedicación. Este libro es el resultado de mucho esfuerzo, el vuestro y el mío. No encuentro palabras para expresar toda la gratitud que siento. Simplemente, gracias por confiar siempre en mí.

A todos muchas gracias.

RESUMEN

La hipoacusia es la enfermedad neurosensorial más frecuente en humanos. Entre las hipoacusias de causa genética, el subgrupo más frecuente lo constituyen las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas (HNSAR), muy heterogéneas, con 134 *loci* cartografiados y 69 genes identificados. Esta heterogeneidad dificulta el diagnóstico molecular, cuya mejora requiere incrementar nuestro conocimiento sobre la epidemiología genética de las HNSAR.

El elevado número de casos de HNSAR con pérdida auditiva moderada que aún quedaban por elucidar en nuestra colección centró este estudio en el análisis de genes ya conocidos cuyas mutaciones producen hipoacusia moderada (*TECTA*, *STRC*, *LOXHD1*), así como de genes candidatos (*TECTB*, *OTOG*) cuyas mutaciones también podrían producir hipoacusia de carácter moderado por la localización de sus productos de expresión.

Hemos investigado la hipoacusias moderadas causadas por mutaciones en los genes *TECTA*, *TECTB* y *OTOG*, que codifican los componentes no colagenosos de la membrana tectoria α -tectorina, β -tectorina y otogelina, respectivamente. Hemos identificado dos mutaciones no descritas en el gen *TECTA*, responsables de hipoacusia no sindrómica DFNB21 en una familia: c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) y c.2657A>G (p.Asn886Ser). También hemos confirmado que el gen *OTOG* es responsable de HNSAR con disfunción vestibular gracias a la identificación en una familia de dos mutaciones en heterocigosis compuesta c.6347C>T (p.Pro2116Leu) y c.6559C>T (p.Arg2187*). En este estudio no hemos podido validar el gen *TECTB* como responsable de sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva.

Hemos confirmado que una de las causas más frecuentes de HNSAR de grado moderado en la población española son las deleciones de ambos alelos del gen *STRC* (hipoacusia DFNB16). Debido a esta elevada incidencia, hemos elaborado un protocolo de diagnóstico para la hipoacusia DFNB16 con el que se puede analizar por primera vez el gen *STRC* sin interferencia del pseudogén Ψ *STRC*. Este protocolo se basa en cuatro tipos de pruebas complementarias y específicas del gen *STRC*: AFLP del exón 23, RFLP de los exones 23 y 29, dos PCRs solapantes de largo recorrido y PCR cuantitativa en tiempo real.

Por último, hemos investigado la hipoacusia DFNB77, causada por mutaciones en el gen *LOXHD1*, habiendo identificado en una familia dos nuevas mutaciones: c.3914_3920del (p.Val1306Thrfs*57) y c.512-1G>A.

Nuestros resultados indican que es preciso incorporar el cribado del gen *STRC* al diagnóstico molecular de rutina de las HNSAR, si bien no es prioritario analizar de manera rutinaria los genes *TECTA*, *OTOG* y *LOXHD1* por su menor contribución a los casos de HNSAR de la población española.

SUMMARY

Hearing impairment (HI) is the most common sensory disorder in humans. Among hearing disorders the most frequent is autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI), with 134 mapped *loci* and 69 identified genes. This high heterogeneity hinders molecular diagnosis, whose improvement requires an increase in our knowledge about the genetic epidemiology of ARNSHI.

The high number of unelucidated cases with moderate ARNSHI in our collection prompted us to investigate known genes whose mutations result in moderate hearing loss (*TECTA*, *STRC*, *LOXHD1*) and candidate genes (*TECTB*, *OTOG*) whose mutations could cause moderate hearing loss because of the localization of their expression products within the cochlea.

In our cohort, we investigated moderate ARNSHI caused by mutations in the *TECTA*, *TECTB* and *OTOG* genes, which code for, respectively, α -tectorin, β -tectorin and otogelin, the major non-collagenous components of the tectorial membrane. In a family, we identified two novel *TECTA* mutations causing DFNB21 HI (c.51dupT, p.Val18Cysfs*18; and c.2657A>G, p.Asn886Ser). We established that *OTOG* mutations cause moderate ARNSHI with vestibular dysfunction in a family whose affected subjects were compound heterozygous for the novel mutations c.6347C>T (p.Pro2116Leu) and c.6559C>T (p.Arg2187*). In this study we could not verify whether the *TECTB* gene is involved in ARNSHI.

We established that deletions of both alleles of the *STRC* gene (at the DFNB16 locus) are one of the most frequent causes of moderate ARNSHI in the Spanish population. Due to this high frequency, we developed novel genetic tools for the molecular screening of *STRC* without any interference from the highly similar *STRC* pseudogene. Our protocol is based on four complementary tests that are specific for the *STRC* gene: exon 23 AFLP, exons 23 and 29 RFLPs, two overlapping, long-range PCR assays and quantitative, real-time PCR (qPCR).

Our investigation of DFNB77 HI, caused by mutations in *LOXHD1* gene, led us to identify in a family two novel disease-causing mutations: c.3914-3920del (p.Val1306Thrfs*57) and c.512-1G>A.

Altogether, our results suggest *STRC* should be investigated in all cases of moderate ARNSHI that remain unelucidated after screening for DFNB1 mutations. In contrast, routine analysis of *TECTA*, *OTOG* and *LOXHD1* is not a priority, given the modest contribution of these three genes to ARNSHI cases in the Spanish population.

ABREVIATURAS	V
INTRODUCCIÓN	1
1. Hipoacusia: aspectos generales	2
1.1. Anatomía y fisiología del oído humano.....	2
1.2. Clasificación de las hipoacusias.....	4
1.3. Epidemiología genética de las hipoacusias.....	6
1.4. Identificación de genes responsables de hipoacusias no sindrómicas.....	6
1.5. Diagnóstico molecular.....	7
2. La membrana tectoria	8
2.1. Composición de la membrana tectoria.....	9
2.2. Estructura de la membrana tectoria.....	9
2.3. Propiedades de la membrana tectoria.....	10
2.3.1. Anisotropía y gradientes de rigidez.....	10
2.3.2. Mapa coclear secundario de frecuencias.....	11
2.4. Proteínas no colagenosas de la membrana tectoria.....	11
2.4.1. α -tectorina (gen <i>TECTA</i> , locus DFNB21).....	12
2.4.2. β -tectorina (gen <i>TECTB</i>).....	13
2.4.3. Otogelina (gen <i>OTOG</i>).....	13
3. La estereocilina y la cohesión del paquete de estereocilios	14
3.1. Estructura y función del paquete de estereocilios.....	14
3.2. Localización y función de la estereocilina.....	15
3.3. Estereocilina (gen <i>STRC</i> , locus DFNB16).....	18
3.4. Loxhd1 (gen <i>LOXHDI</i> , locus DFNB77).....	19
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Pacientes y métodos generales	24
1.1. Pacientes incluidos en los estudios sobre hipoacusias de tipo DFNB.....	24
1.2. Extracción de ADN.....	24
1.3. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
1.4. Secuenciación de ADN.....	24
1.5. Genotipado de marcadores.....	25

1.6. Búsqueda de mutaciones por análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC.....	26
2. Gen <i>TECTA</i>. Locus DFNB21.....	26
2.1. Pacientes.....	26
2.2. Análisis de haplotipos.....	26
2.3. Detección de mutaciones en el gen <i>TECTA</i>	27
2.4. Cribado mediante análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC.....	28
3. Gen <i>TECTB</i>.....	30
3.1. Pacientes.....	30
3.2. Análisis de haplotipos.....	30
3.3. Detección de mutaciones en el gen <i>TECTB</i>	30
4. Gen <i>OTOG</i>.....	31
4.1. Pacientes.....	31
4.2. Análisis de haplotipos.....	31
4.3. Detección de mutaciones en el gen <i>OTOG</i>	31
4.4. Detección de mutaciones en el gen <i>Otog</i> de ratón.....	33
5. Gen <i>STRC</i>. Locus DFNB16.....	35
5.1. Pacientes.....	35
5.2. Análisis de haplotipos.....	35
5.3. Detección de deleciones en la región que contiene el gen <i>STRC</i>	36
5.3.1. PCR múltiplex del marcador D15S784.....	36
5.3.2. Tipado fluorescente de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	37
5.3.3. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).....	38
5.3.4. PCRs de largo recorrido específicas del gen <i>STRC</i>	38
5.4. Detección de deleciones en heterocigosis en el gen <i>STRC</i> :	
PCR cuantitativa (qPCR).....	39
5.5. Detección de mutaciones puntuales en el gen <i>STRC</i> : secuenciación de exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen <i>STRC</i>	41
6. Gen <i>LOXHD1</i>: locus DFNB77.....	42
6.1. Pacientes.....	42
6.2. Análisis de haplotipos.....	42

6.3. Detección de mutaciones puntuales en el gen <i>LOXHD1</i>	42
RESULTADOS	45
1. Gen <i>TECTA</i>: locus DFNB21	46
1.1. Análisis de haplotipos.....	46
1.2. Detección de mutaciones en el gen <i>TECTA</i>	46
1.3. Cribado mediante análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC.....	49
2. Gen <i>TECTB</i>	49
3. Gen <i>OTOG</i>	49
3.1. Análisis de haplotipos.....	49
3.2. Detección de mutaciones en el gen <i>OTOG</i>	49
3.3. Detección de mutaciones en el gen <i>Otog</i> de ratón.....	51
4. Gen <i>STRC</i>: locus DFNB16	53
4.1. Análisis de haplotipos.....	53
4.2. Detección de deleciones en la región que contiene el gen <i>STRC</i>	53
4.3. Estrategias complementarias para la confirmación de deleciones de ambos alelos del gen <i>STRC</i>	55
4.3.1. Tipado fluorescente de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	56
4.3.2. Polimorfismos en la longitud de fragmentos de amplificación (AFLP).....	56
4.3.3. PCRs de largo recorrido específicas del gen <i>STRC</i>	58
4.4. Detección de deleciones en heterocigosis en el gen <i>STRC</i> : PCR cuantitativa (qPCR).....	59
4.5. Detección de mutaciones puntuales en el gen <i>STRC</i>	62
5. Gen <i>LOXHD1</i>: locus DFNB77	63
5.1. Análisis de haplotipos.....	63
5.2. Detección de mutaciones puntuales en el gen <i>LOXHD1</i>	63
DISCUSIÓN	67
1. Hipoacusia tipo DFNB21. Gen <i>TECTA</i>	68
2. Gen <i>TECTB</i>	69
3. Gen <i>OTOG</i>	70
4. Hipoacusia tipo DFNB16. Gen <i>STRC</i>	72
5. Hipoacusia tipo DFNB77. Gen <i>LOXHD1</i>	75

6. Epidemiología genética de las hipoacusias moderadas en población española	77
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	85
ARTÍCULOS	98

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de amplificación (<i>Amplification fragment length polymorphism</i>)
CCE	Célula ciliada externa
CCI	Célula ciliada interna
CDS	Región codificante (<i>Coding sequence</i>)
CEN	Centrómero
cM	Centimorgan
dB	Decibelios
dHPLC	Cromatografía líquida desnaturalizante de alta resolución (<i>denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>)
DFNA	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica autosómica dominante
DFNB	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva
DFNX	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X
DFNY	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma Y
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Etilén diamino tetraacético
HNSAR	Hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva
Hz	Herzio
kDa	kiloDalton
Mt	Alelo mutante
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
TEL	Telómero
Wt	Alelo silvestre
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)

Breve aclaración terminológica: Los términos ingleses *severe* y *severity*, referidos a enfermedades, deben traducirse en general como “grave” y “gravedad” respectivamente. Sin embargo, cuando *severe* se refiere a pérdidas auditivas comprendidas entre los 71 y 95 dB, debe traducirse como “severa”, según convención reconocida por los profesionales del campo de la audiolología.

INTRODUCCIÓN

1. Hipoacusia: Aspectos generales

Las hipoacusias o déficits auditivos son un grupo de trastornos de etiología y manifestaciones clínicas muy heterogéneas. Esta heterogeneidad es consecuencia de la alta complejidad estructural y funcional del oído humano.

1.1. Anatomía y fisiología del oído humano

El sistema auditivo está compuesto por tres compartimentos anatómicos: oído externo, constituido por el pabellón auditivo y el conducto auditivo externo; oído medio, constituido por la membrana timpánica y la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo); y oído interno, compuesto por el sistema vestibular, responsable del equilibrio y la orientación espacial, y la cóclea, que interviene en la percepción del sonido (procesamiento de la información auditiva) (Fig. 1A).

El sistema vestibular (Fig. 1C) está compuesto por los tres canales semicirculares (responsables de la percepción de la aceleración angular), el sáculo y el utrículo (responsables de la percepción de la aceleración lineal).

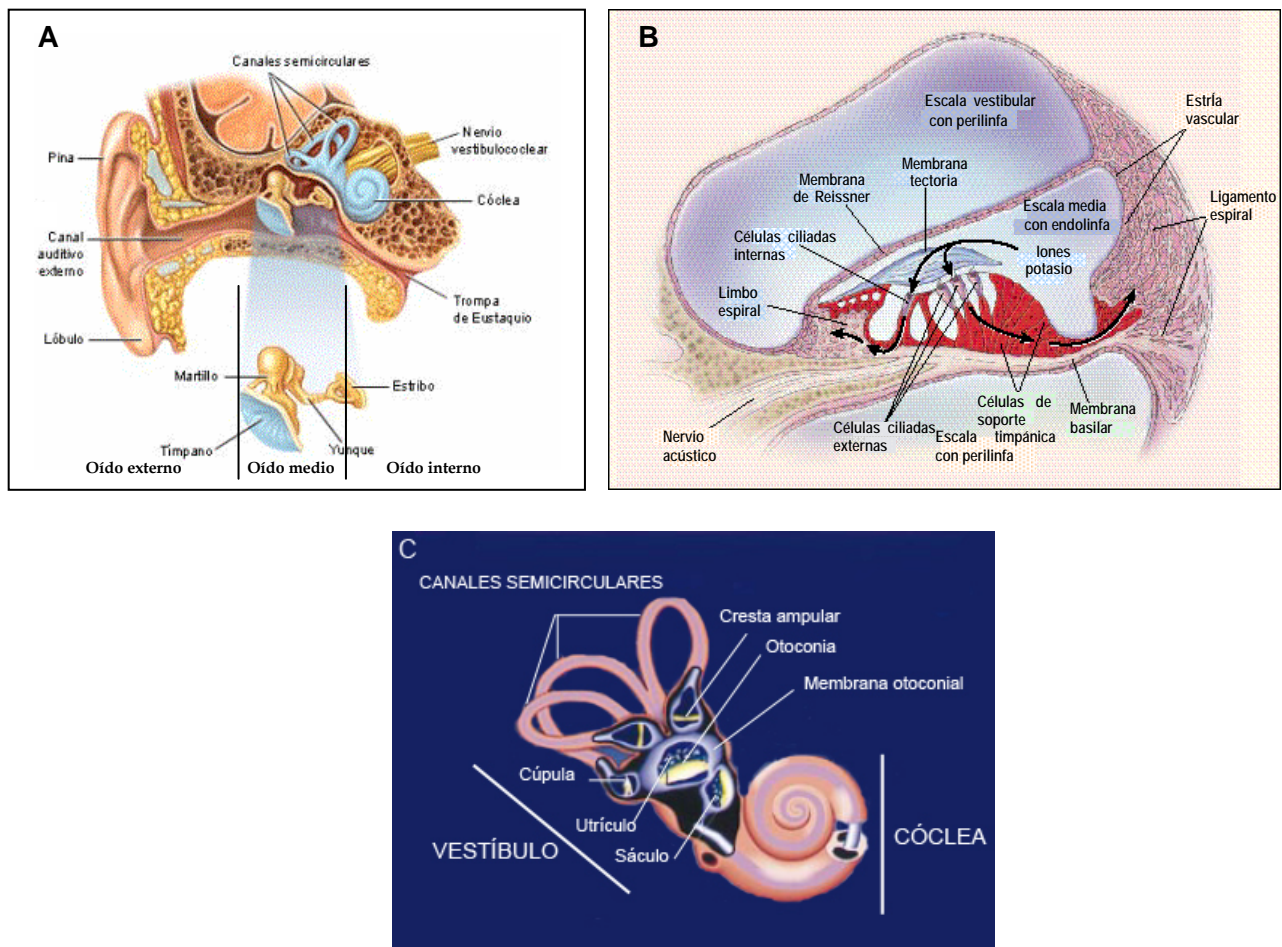


Figura 1. A. Esquema del oído. B. Corte transversal de la cóclea (adaptado de Willems, 2000). C. Detalle del sistema vestibular (modificado de Cohen-Salmon, 1997).

La cóclea (Fig. 1B) está dividida en tres compartimentos por dos membranas. Los compartimentos superior (escala vestibular), e inferior (escala timpánica) contienen perilinfa y se comunican en el ápice de la cóclea. En la base de la cóclea, la escala vestibular termina en la ventana oval, la cual está cerrada por la base del estribo. La escala timpánica termina en la ventana redonda, la cual está cerrada por la membrana timpánica secundaria. La composición de la perilinfa es muy parecida a la del plasma, con una alta concentración de sodio y baja concentración de potasio. El compartimento intermedio (escala media) está separado de la escala vestibular por la membrana de Reissner, y de la escala timpánica por la membrana basilar. Sobre la membrana basilar descansa el órgano de Corti (Fig. 2A). La escala media contiene endolinfa, que se caracteriza por presentar alta concentración de potasio y baja concentración de sodio. La endolinfa es secretada por la estría vascular, situada en la pared lateral de la escala media.

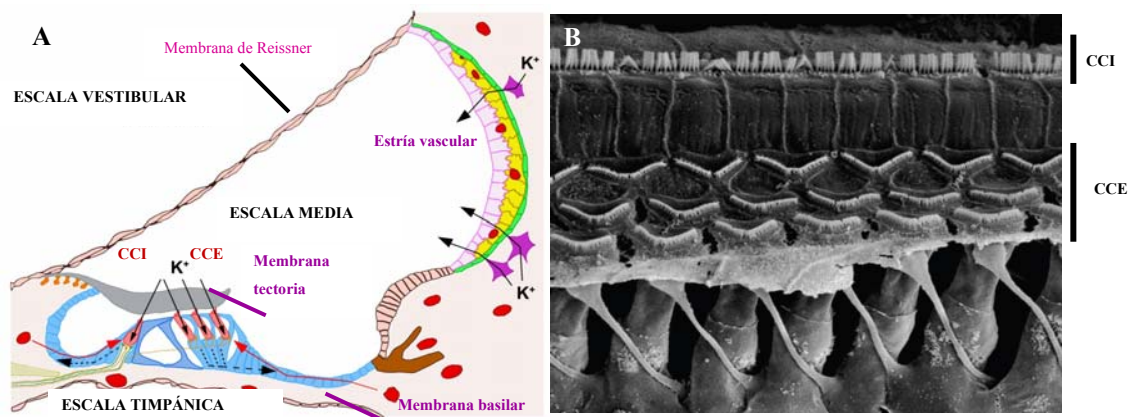


Figura 2. A. Órgano de Corti. En la figura se representa la membrana de Reissner separando la escala vestibular de la escala media. La membrana basilar separa la escala timpánica de la escala media. Las flechas de color negro indican el flujo de iones potasio en el órgano de Corti. B. Micrografía electrónica de barrido de una vista apical de las células ciliadas internas (CCI) y las células ciliadas externas (CCE). Las células ciliadas internas se organizan en una única fila mientras que las células ciliadas externas se disponen en tres filas. Adaptado de Richardson *et al.*, 2011.

El órgano de Corti presenta dos tipos de células: células ciliadas (Fig. 2B) y células de soporte. Las células ciliadas son los receptores auditivos, responsables de transformar las ondas sonoras de la perilinfa en impulsos eléctricos. Las células ciliadas se disponen en una fila de células ciliadas internas y tres filas de células ciliadas externas. Las células ciliadas internas son los auténticos receptores auditivos (células sensoriales primarias) que transmiten las señales a través del nervio acústico hasta el córtex cerebral. Por su parte, las células ciliadas externas contribuyen a la amplificación de la señal y al aumento de la selectividad de frecuencia gracias a sus propiedades de electromotilidad. Cada célula ciliada presenta en su sección apical un paquete de estereocilios cilíndricos dispuestos en hileras de altura decreciente y bañados en endolinfa. Cada estereocilio es en realidad una microvellosidad y por tanto es una proyección rígida de la célula ciliada formada por un haz de filamentos de actina y miosinas no convencionales, que descansan sobre una red de filamentos de actina que forman la placa

cuticular. El extremo apical de cada uno de los estereocilios está unido al lateral del estereocilio adyacente de la siguiente fila más alta por uniones apicales (*tip links*). Las uniones apicales actúan como un resorte que abre uno o más canales de mecanotransducción, permitiendo al potasio de la endolinfa entrar en la célula y despolarizarla. Los extremos de los estereocilios de las células ciliadas externas están en contacto con una lámina acelular viscosa y elástica llamada membrana tectoria.

En el proceso de la audición, las ondas sonoras son captadas por el oído externo y viajan a través del conducto auditivo externo hasta la membrana timpánica. Las vibraciones de la membrana timpánica son transmitidas por la cadena de huesecillos del oído medio. Esto ocasiona la vibración de la perilinfa y de la membrana basilar. Esta vibración provoca un desplazamiento de los estereocilios de las células ciliadas en interacción con la membrana tectoria, produciendo el estiramiento de las uniones apicales y permitiendo la apertura de canales de mecanotransducción, lo que provoca la despolarización de las células ciliadas por la entrada de potasio al interior de las mismas. A su vez, la despolarización permite la entrada de calcio a través de canales controlados por voltaje en la región basolateral de las células ciliadas, lo que causa la liberación de neurotransmisores que activan el nervio auditivo. De este modo los impulsos eléctricos son llevados a través del nervio auditivo (octavo par craneal) a múltiples núcleos en el sistema auditivo central y finalmente al córtex auditivo en el cerebro.

Las células ciliadas se repolarizan cuando los iones potasio salen de las mismas a través de los canales de potasio del dominio basolateral de la membrana y son captados por las células epiteliales de soporte. Los iones potasio luego difunden a través de uniones comunicantes formadas por conexinas hasta la estría vascular, donde son secretados de regreso a la endolinfa a través de una compleja red de canales, cotransportadores y ATPasas (Dallos *et al.*, 1996).

Es preciso resaltar la organización tonotópica de la cóclea por la cual en distintos puntos de la misma se perciben frecuencias distintas. Así las frecuencias agudas se perciben en la base de la cóclea mientras que las frecuencias graves se detectan en el ápex. Estas propiedades tonotópicas se deben a variaciones estructurales de los componentes de la cóclea (Dallos *et al.*, 1996).

1.2. Clasificación de las hipoacusias

Las hipoacusias se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios:

- **La localización del defecto que provoca la hipoacusia:**

- **Conductivas:** afectación del oído externo y/o los osículos del oído medio.
- **Neurosensoriales:** ocasionadas por defectos en el oído interno, el nervio auditivo o en centros auditivos del cerebro.
- **Mixtas:** combinación de hipoacusia conductiva y neurosensorial.

- **La edad de inicio de la hipoacusia:**

- **Prelocutivas:** Se presentan antes de la adquisición del habla. Toda hipoacusia congénita (presente en el nacimiento) es prelocutiva, pero no todas las sorderas prelocutivas son congénitas.
- **Postlocutivas:** Se presentan después de la adquisición del habla.

- **La causa de la hipoacusia:**

- **Adquiridas:** debidas a factores ambientales, entre los que cabe destacar el trauma acústico, las infecciones bacterianas o víricas, y la ototoxicidad de fármacos.
- **Genéticas:** debidas a mutaciones en una gran variedad de genes. La mayoría de las hipoacusias neurosensoriales son trastornos monogénicos.

Según el **fenotipo** pueden ser:

- **Sindrómicas:** en las que el déficit auditivo está asociado a otros signos clínicos, en otros órganos. Pueden ser conductivas, neurosensoriales o mixtas.
- **No sindrómicas:** en las que la sordera es el único signo clínico.

Según el **tipo de herencia** se clasifican en:

- **Autosómicas dominantes** (10-20%).
- **Autosómicas recesivas** (70-80%).
- **Ligadas al cromosoma X** (1-5%).
- **Ligadas al cromosoma Y** (menos del 1%)
- **Herencia materna** (0- 20% en diferentes poblaciones)

Hay que señalar que los factores ambientales pueden actuar sobre una predisposición de base genética. Por ejemplo, las mutaciones en el gen del rRNA 12S del genoma mitocondrial confieren una mayor sensibilidad a la acción ototóxica de los antibióticos aminoglucósidos.

- **La gravedad de la pérdida auditiva:**

- **Leve** (Pérdidas de 21-40 dB)
- **Moderada** (Pérdidas de 41-70 dB)
- **Severa** (Pérdidas de 71-95 dB)
- **Profunda** (Pérdidas mayores de 95 dB)

- **Las frecuencias del audiograma afectadas por la pérdida auditiva:**

- **Hipoacusia de frecuencias bajas o graves** (frecuencias < 500 Hz)
- **Hipoacusia de frecuencias medias** (frecuencias entre 500-2000 Hz)
- **Hipoacusia de frecuencias altas o agudas** (frecuencias > 2000 Hz)

1.3. Epidemiología de las hipoacusias

La hipoacusia es la enfermedad neurosensorial más frecuente en humanos. Se estima que más de 70 millones de personas en el mundo tienen un déficit auditivo que afecta a su normal comunicación (Marazita *et al.*, 1993). Aproximadamente 1 de cada 1000 recién nacidos está afectado por sordera severa o profunda. En etapas posteriores de la infancia, aproximadamente 1 de cada 1000 niños desarrolla una hipoacusia, que cursa de forma progresiva y menos severa. En países desarrollados, menos del 40% de los casos son atribuibles a causas ambientales, y más del 60% a causas genéticas (Morton 1991, Marazita *et al.*, 1993, Gorlin *et al.*, 1995, Petit *et al.*, 2001). Dentro de éstas, la sordera sindrómica contribuye al 30% de los casos, mientras que la no sindrómica representa aproximadamente el 70% (Petit *et al.*, 2001, Toriello *et al.*, 2004). Además, un 0,3% de la población manifiesta pérdida auditiva de más de 65 dB entre los 30 y los 50 años, y un 2,3% entre los 60 y 70 años (Nadol, 1993).

La hipoacusia puede manifestarse en sus distintos grados a cualquier edad. Una pérdida auditiva profunda que se presente en la primera infancia tiene efectos dramáticos en la adquisición del habla, el desarrollo intelectual y la integración social del niño sordo (Yoshinaga-Itano *et al.*, 1998). La detección precoz de estos casos permite una intervención temprana, mediante tratamientos paliativos y educación especial, que ayudan a minimizar esos efectos. Por esta razón, numerosos países, entre ellos España, han desarrollado protocolos de cribado universal del déficit auditivo en los recién nacidos (Kenna, 2003). Las hipoacusias postlocutivas progresivas de iniciación tardía comprometen la calidad de vida del individuo afectado, y pueden llevar al aislamiento social. Por tanto, la detección precoz es también fundamental en estos casos.

1.4. Identificación de genes responsables de hipoacusias no sindrómicas

La identificación de genes responsables de hipoacusias no sindrómicas es una tarea compleja debido a varios factores. Uno de ellos es la elevada heterogeneidad genética (a pesar de ser una enfermedad mayoritariamente monogénica), que es debida a la enorme complejidad anatómica y fisiológica del oído interno. Un segundo factor determinante es que la gran mayoría de las familias con hipoacusia recesiva no sindrómica suelen tener un número pequeño de afectados (muchas veces son casos esporádicos sin antecedentes familiares, o con antecedentes lejanos o ya fallecidos). En estas familias no es posible aplicar el análisis de ligamiento, que nos conduciría al gen concreto afectado en cada caso; además, la heterogeneidad genética impide que se agrupen las familias para un estudio de ligamiento en conjunto. Un tercer factor muy influyente es la endogamia. Las dificultades de comunicación con el entorno normoyente hacen muy frecuentes los matrimonios entre sordos, dificultando o imposibilitando los análisis de

ligamiento genético, dada la alta probabilidad de que segreguen en la misma familia dos genes de hipoacusia diferentes.

Sin embargo, el análisis de ligamiento realizado sobre familias grandes, consanguíneas, de poblaciones aisladas geográficamente, permitió el cartografiado e identificación de genes responsables de sordera. Actualmente, existen 134 *loci* involucrados en hipoacusias no sindrómicas (<http://hereditaryhearingloss.org>). Estos se nombran con las siglas DFN (del inglés DeaFNess) seguidas de un número que indica el orden en que han sido cartografiados. De ellos, 54 corresponden a herencia dominante (DFNA), 71 a herencia recesiva (DFNB), 5 a herencia ligada al cromosoma X (DFNX) y 1 ligada al cromosoma Y (DFNY). Además, se han descrito dos *loci* (DFNM) de genes modificadores de la expresión de otras formas genéticas de sordera y un *locus* (AUNA1) de neuropatía auditiva autosómica dominante. Por extensión, se nombra el tipo de hipoacusia con el mismo nombre del locus correspondiente.

Hasta el momento (<http://hereditaryhearingloss.org>), han sido identificados 69 genes responsables de hipoacusias no sindrómicas, algunos de los cuales son responsables, además, de hipoacusias sindrómicas. Este número es aún pequeño si tenemos en cuenta el número de *loci* descritos hasta el momento y si consideramos que se estima que probablemente el 1% de los aproximadamente 30.000 genes humanos podrían estar ligados a la sordera (Schulze, 2009). En general, los genes descubiertos hasta ahora codifican proteínas implicadas en las principales funciones del sistema auditivo: canales iónicos, transportadores, enzimas, proteínas de las uniones intercelulares estrechas y comunicantes (*tight* y *gap junctions*, respectivamente), proteínas de adhesión celular, del citoesqueleto y de la matriz extracelular, factores de transcripción implicados en el desarrollo del oído, e incluso algunas proteínas de función aún desconocida.

Un factor determinante en las investigaciones sobre la biología molecular del sistema auditivo lo constituye la imposibilidad del análisis directo de la cóclea humana en individuos vivos. Los datos aportados por las diferentes pruebas clínicas, aunque son útiles para la clasificación de las sorderas y la identificación de la zona del sistema auditivo afectada, contribuyen poco al conocimiento de las anomalías estructurales (que se manifiestan muchas veces solamente a nivel microscópico) y de las alteraciones provocadas específicamente por las mutaciones en cada gen. Por esta razón, los modelos murinos han sido de enorme utilidad para comprender el funcionamiento del sistema auditivo humano y para la identificación y caracterización de mutaciones en nuevos genes (Leibovici *et al.*, 2008).

1.5 Diagnóstico molecular

El diagnóstico genético-molecular de las hipoacusias contribuye a su detección precoz, permite el consejo genético al individuo afectado y a sus familiares, y aporta información que

puede ser de utilidad en la elección del tipo de tratamiento que el paciente puede seguir actualmente (por ejemplo, implante coclear) o de aquéllos que puedan desarrollarse en el futuro y que serán específicos para cada tipo de sordera (terapias farmacológica, celular, génica...). Actualmente, el diagnóstico genético-molecular de hipoacusias no sindrómicas que se ofrece de rutina en la mayoría de los laboratorios del mundo se reduce a un pequeño número de los 69 genes ya conocidos. Normalmente sólo incluye las mutaciones más frecuentes en el *locus* DFNB1 (genes *GJB2* y *GJB6*), en sorderas prelocutivas. Esto se debe, en primer lugar, a las dificultades, ya mencionadas, del estudio genético de las sorderas (heterogeneidad genética, familias con pocos afectados, endogamia). Además, existe aún poco conocimiento acerca de las correlaciones genotipo-fenotipo y de la epidemiología genética (espectro de mutaciones en cada gen, zonas del gen que contienen la mayoría de las mutaciones (*hot-spots*), frecuencia en las diferentes poblaciones), lo que impide la orientación del diagnóstico a unos pocos genes o mutaciones específicas y el desarrollo de ensayos rápidos para su detección de manera rutinaria. Hasta el momento, sólo se ha logrado profundizar en estas correlaciones en cohortes de un número elevado de pacientes en el caso de los genes *WFS1* (Cryns *et al.*, 2003), *GJB2* (Hilgert *et al.*, 2009), *SLC26A4* (Azaiez *et al.*, 2007), *OTOF* (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008) y *TECTA* (Hildebrand *et al.*, 2011).

En la medida que se vayan solucionando estas dificultades se podrá incrementar la robustez del diagnóstico genético-molecular de hipoacusias. Con tal fin, en este trabajo decidimos investigar la epidemiología genética y correlaciones genotipo-fenotipo en las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas de tipos **DFNB16**, **DFNB21** y **DFNB77**. La selección de estas hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva se basó en la localización en el oído interno de los productos de expresión de los genes de estos *loci*. Así, estereocilina (DFNB16) y *Loxhd1* (DFNB77) son proteínas que forman parte del paquete de estereocilios, mientras que la α -tectorina (DFNB21) es una proteína estructural de la membrana tectoria. Es de interés indicar que estos tres tipos de hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva tienen en común el perfil audiométrico de los afectados: todas ellas son sorderas de tipo moderado (pérdidas de 41-70dB). Por otro lado decidimos estudiar dos genes candidatos a ser genes causantes de sordera en humanos: *OTOG* y *TECTB*, cuyos productos de expresión (otogelina y β -tectorina respectivamente) forman también parte de la membrana tectoria.

2. La membrana tectoria

La membrana tectoria es una matriz extracelular que se enrolla a lo largo de toda la longitud de la cóclea. Se ancla en la porción media de la superficie del limbo espiral, se extiende a lo largo del surco espiral y descansa sobre la superficie del órgano de Corti donde se fija a los

extremos de los estereocilios de las células ciliadas externas (Fig. 1B y Fig. 2). De este modo, el paquete de estereocilios de las células ciliadas externas es estimulado directamente por la membrana tectoria debido a su íntima asociación con ésta, mientras que el paquete de estereocilios de las células ciliadas internas es estimulado por el movimiento del fluido en el espacio subtectorial (espacio que queda entre la membrana tectoria y la superficie del epitelio sensorial).

Se han propuesto varias funciones para la membrana tectoria en el proceso de la audición. En primer lugar, la membrana tectoria podría actuar como una superficie rígida que se desplaza una y otra vez acompañando a la vibración de la membrana basilar. Por otro lado se le atribuye la participación en el proceso de amplificación coclear (Gold, 1948; Kennedy *et al.*, 2006), que es responsable de producir una reducción de la velocidad de propagación de la onda sonora (*damping*), incrementando tanto la sensibilidad como la selectividad de la frecuencia (Ghaffari *et al.*, 2010). El mecanismo de amplificación coclear incrementa el número de células ciliadas externas estimuladas de manera coordinada.

La función de la membrana tectoria es crítica en la determinación de la precisión de las respuestas neuronales de la cóclea a través de su interacción con las células ciliadas internas (Legan *et al.*, 2005).

2.1. Composición de la membrana tectoria

La membrana tectoria está compuesta por distintos tipos de colágeno (colágenos tipo II, V, IX y X) y tres glicoproteínas no colagenosas: α -tectorina, β -tectorina y otogelina (Richardson *et al.*, 1987; Cohen-Salmon *et al.*, 1997; Verhoeven *et al.*, 1998). α -tectorina, β -tectorina y otogelina son proteínas que sólo se expresan en el oído interno y constituyen el 50% de la proteína presente en la membrana tectoria (Richardson *et al.*, 2008). La otogelina y la α -tectorina son glicoproteínas modulares de 313 y 239 kDa respectivamente, mientras que la β -tectorina, de 36 kDa, es una proteína mucho más pequeña.

2.2. Estructura de la membrana tectoria

La estructura de la membrana tectoria se muestra en la Figura 3. El núcleo central (*core*) de la membrana tectoria está compuesto por paquetes de fibras de colágeno de 20 nm de diámetro que están embebidos en una peculiar matriz o lámina estriada. La **lámina estriada** está formada por dos tipos de filamentos (7-9 nm de diámetro) diferenciables entre sí por presentar distintas cualidades de tinción, que se disponen en paralelo y que interaccionan entre sí a lo largo de su longitud a través de puentes proteicos. Las evidencias obtenidas hasta la fecha parecen indicar que esta matriz estriada está compuesta por tectorinas (Richardson *et al.*, 2008). Otras diferenciaciones de la membrana tectoria incluyen el **covernet o cobertura** que consiste en una

red anastomosada de fibrillas de gran calibre que se localizan fundamentalmente en la superficie exterior de la membrana tectoria; la **banda marginal**, que es una estructura densa y engrosada que se localiza en el extremo libre de la membrana tectoria; la **membrana de Kimura**, que consiste en un engrosamiento de la superficie inferior de la membrana tectoria en la que quedan embebidos los estereocilios de las células ciliadas externas; y la **línea de Hensen**, que se distribuye longitudinalmente a lo largo de la superficie inferior de la membrana tectoria y que queda inmediatamente adyacente al paquete de estereocilios de las células ciliadas internas (Richardson *et al.*, 2008).

Las dimensiones de la membrana tectoria varían a lo largo de la longitud de la cóclea: su anchura y su sección transversa se incrementan desde el extremo basal al apical de la cóclea.

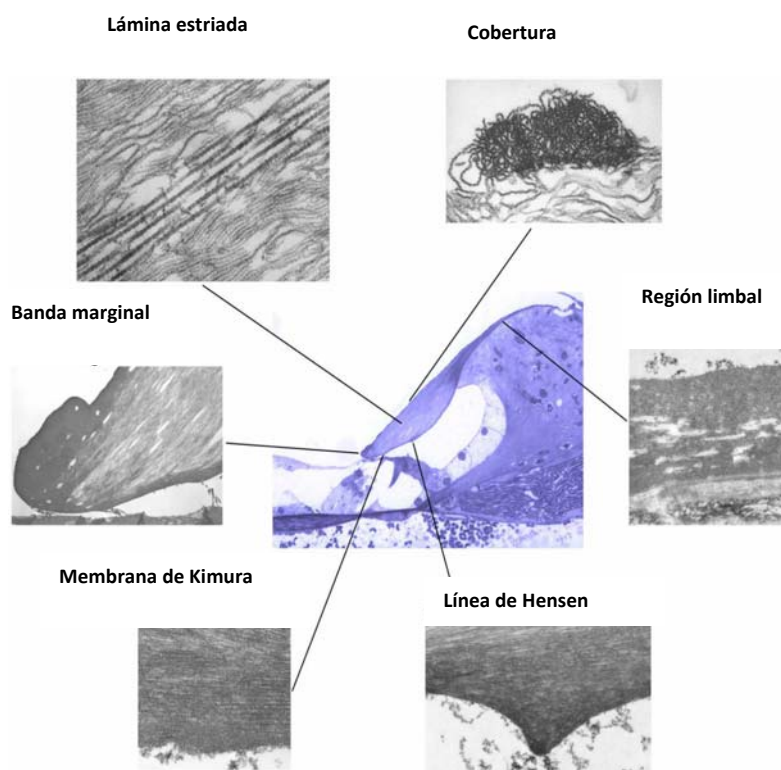


Figura 3. Membrana tectoria y sus estructuras diferenciadas. El *core* central de la membrana tectoria está compuesto por la matriz o lámina estriada y por fibras de colágeno organizadas en forma de paquetes. Otras estructuras diferenciadas de la membrana tectoria incluyen el *covernet* o cobertura, la banda marginal, la membrana de Kimura y la línea de Hensen. Modificado de Richardson *et al.* 2008.

2.3. Propiedades de la membrana tectoria

2.3.1. Anisotropía y gradientes de rigidez

La anisotropía es la propiedad general de la materia según la cual determinadas propiedades físicas varían según la dirección en que son examinadas. Existen evidencias de anisotropía en la membrana tectoria, ya que la rigidez radial es mayor que la longitudinal debido a la diferente distribución de las fibras de colágeno. Por otro lado, un estudio reciente indica que la rigidez de la superficie inferior de la membrana tectoria en contacto con las células ciliadas es menor que

la del resto de la membrana tectoria, lo que facilitaría la deflexión de los estereocilios de las células ciliadas externas cuando la membrana tectoria se desliza sobre el órgano de Corti (Richardson *et al.*, 2008).

2.3.2. Mapa coclear secundario de frecuencias

Se piensa que a lo largo la cóclea, la membrana tectoria también está organizada tonotópicamente, resonando a frecuencias inferiores a la de la frecuencia óptima de resonancia de la membrana basilar. Y de hecho, se sabe que en la zona de altas frecuencias de la cóclea de ratón la membrana tectoria resuena 0,5 octavas por debajo de la frecuencia de resonancia de la membrana basilar. Esto es lo que se conoce como mapa coclear secundario de frecuencias. Un incremento en el área de corte transversal de la membrana tectoria desde la base hacia el ápex y un descenso en la rigidez desde la base hasta el ápex son la base teórica de este mapa secundario de frecuencias (Richardson *et al.*, 2008) (Fig. 4).

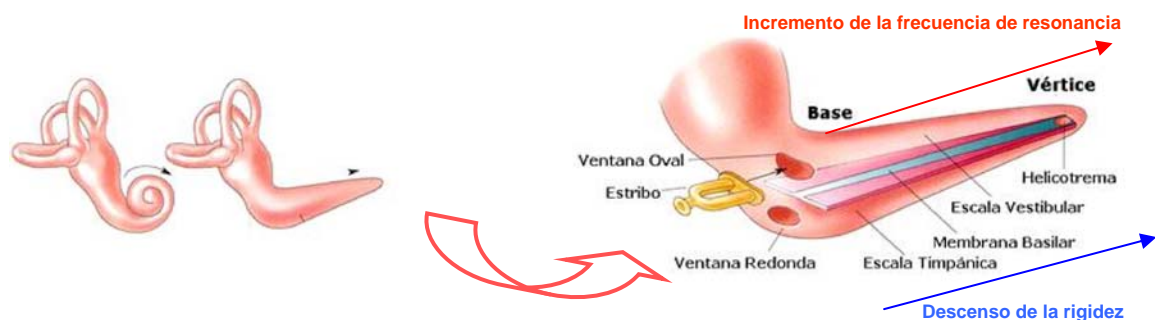


Figura 4. La membrana basilar presenta un mapa tonotópico, es decir varía en grosor y rigidez a lo largo de la cóclea y, por tanto, la frecuencia en la que la deformación que sufre por la onda sonora es máxima varía a lo largo de toda la membrana basilar. La zona más cercana a la ventana redonda presenta selectividad por las frecuencias altas (2000-20000 Hz), mientras que la zona más cercana al helicotrema presenta selectividad por las frecuencias bajas (20-200 Hz). Con flechas se indica la variación de las propiedades de la membrana basilar (idénticas a las de la membrana tectoria) desde la base hasta el ápex. Modificado de Guyton y Hall (2007).

2.4. Proteínas no colagenosas componentes de la membrana tectoria

Todos los componentes no colagenosos de la membrana tectoria (α -tectorina, β -tectorina y otogelina) se caracterizan por presentar una estructura en dominios modulares (Richardson *et al.*, 1987; Cohen-Salmon *et al.*, 1997; Verhoeven *et al.*, 1998) (Fig. 5).

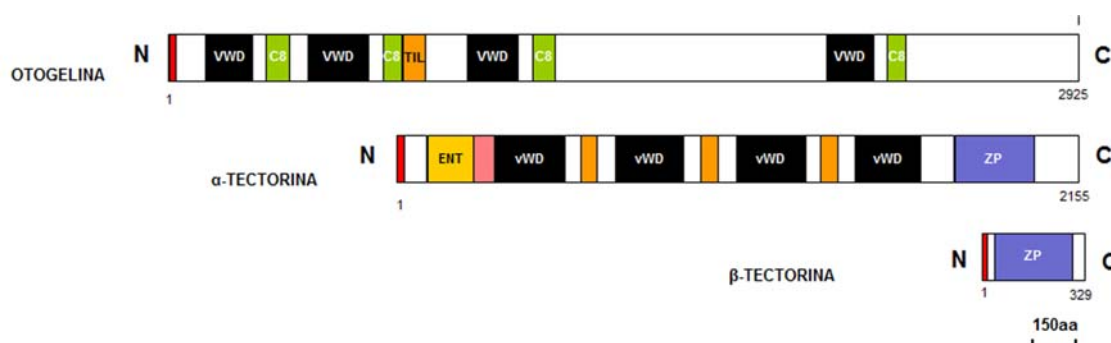


Fig. 5. Esquema de la estructura en dominios de las proteínas no colagenosas de la membrana tectoria. Las cajas rojas representan el péptido señal. Las cajas negras representan los dominios von Willebrand tipo D (vWD). En rosa se representa el único dominio von Willebrand tipo C de la proteína α -tectorina. En verde, los dominios C8 ricos en cisteínas. En naranja, los dominios TIL formados por diez residuos de cisteínas. En azul, el dominio Zona Pelúcida (ZP).

2.4.1. α -tectorina (gen *TECTA*, locus DFNB21)

El gen *TECTA* se localiza en la banda cromosómica 11q22-24 y tiene 23 exones que codifican la proteína de 2155 aminoácidos α -tectorina, el componente no colagenoso más abundante de la membrana tectoria. En humanos, mutaciones en el gen *TECTA* producen sordera no sindrómica de herencia dominante (DFNA8/A12) y recesiva (DFNB21). Hasta 2011, se pensaba que todas las mutaciones *missense* encontradas en el gen *TECTA* producían sordera no sindrómica autosómica dominante, mientras que las mutaciones claramente truncantes (*nonsense*, *frameshift*...) se asociaban con un patrón de herencia autosómica recesiva. Del mismo modo, se habían establecido otras correlaciones genotipo-fenotipo: las mutaciones *missense* en el dominio ZP producían sordera neurosensorial en las frecuencias medias, mientras que las mutaciones *missense* en el dominio ZA producían sordera neurosensorial en las frecuencias altas. Además, si los residuos afectados por la mutación eran cisteínas implicadas en puentes disulfuro, entonces la pérdida auditiva se producía de manera progresiva, mientras que si eran otros los residuos afectados la sordera se mantenía estable. Sin embargo, estas correlaciones han debido ser revisadas tras la publicación de los trabajos de Hildebrand *et al.*, (2011). Estos autores describieron la existencia de dos mutaciones claramente inactivantes (c.1124delT, p.Val375Alafs*; c.5383+5delGTGA) que eran responsables de sordera no sindrómica de herencia autosómica dominante. También indicaron que las mutaciones en *TECTA* no se concentran en el dominio ZP sino que se distribuyen a lo largo de toda la estructura de la α -tectorina, lo que les permitió establecer nuevas correlaciones genotipo-fenotipo. Así, las mutaciones en el módulo ZA no producen exclusivamente sordera neurosensorial en las frecuencias altas sino que generan distintos perfiles audiométricos probablemente porque el papel de los distintos dominios vWFD es diferente. Por otro lado, las mutaciones en el extremo N-terminal (dominio entactina, vWFD1 y vWFD2) producen sordera neurosensorial en las frecuencias medias (Hildebrand *et al.*, 2011).

2.4.2. β -tectorina (gen *TECTB*)

El gen *TECTB* se localiza en el cromosoma 10, tiene 10 exones y codifica la β -tectorina, de 329 aminoácidos. Los ratones *Tectb*^{-/-} presentan alteraciones en el núcleo estructural de la membrana tectoria, así como cambios en las propiedades de propagación de las ondas (alteración de las propiedades de sintonía de la cóclea) (Russell *et al.*, 2007). Presentan además una disminución de la sensibilidad auditiva fundamentalmente en las frecuencias bajas, aunque también en las frecuencias medias y altas, por una reducción de células ciliadas activadas simultáneamente, siendo un número muy pequeño el que trabaja en sincronía (Ghaffari *et al.*, 2010).

2.4.3. Otogelina (gen *OTOG*)

El gen *OTOG* se localiza en el cromosoma 11q14-15, dentro del intervalo crítico para el locus DFNB18, que fue definido gracias al estudio de una familia consanguínea de la India con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva (Jain *et al.*, 1998). Por ello se sospechó inicialmente que *OTOG* podría ser el responsable de la sordera no sindrómica DFNB18, aunque el gen responsable de este tipo de hipoacusia es el gen *USH1C* (Cohen-Salmon *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2002).

El gen *OTOG* tiene 55 exones y codifica la otogelina, de 2925 aminoácidos. La otogelina se expresa exclusivamente en el oído interno, específicamente en la cóclea y en el vestíbulo (Cohen-Salmon *et al.*, 1997). Estudios de inmunofluorescencia muestran que esta proteína es componente de todas las membranas acelulares del oído interno (membrana tectoria, membrana otoconial de sáculo y utrículo, y las cúpulas de las crestas ampulares de los canales semicirculares) (Cohen-Salmon *et al.*, 1997) (Fig. 1C).

En el año 2000 se describió la construcción y el análisis de un ratón homocigoto defectivo en otogelina, *Otog*^{tm1Prs}, con sordera progresiva y graves problemas de equilibrio (Simmler *et al.*, 2000a). Este ratón presentaba grandes similitudes fenotípicas con el ratón *twister* (alelo *twt*). *twt* es una mutación espontánea recesiva de la cepa C57BL/6xC3Heb/Fe (Lane, 1981) que se empezó a estudiar inicialmente por su comportamiento anormal, típico de la disfunción vestibular, pero no fue hasta 1988 cuando se determinó que el ratón además presentaba sordera (Steel, 1995). De hecho, se demostró mediante tests de complementación que las mutaciones *twt* y *Otog*^{tm1Prs} son alélicas (Simmler *et al.*, 2000b). El fenotipo de ambos ratones es muy similar, ambos tienen serios problemas de equilibrio y esto parece deberse a un defecto en el anclaje de las membranas otoconiales al epitelio sensorial subyacente que se manifiesta desde el nacimiento o a los pocos días del mismo. Además, ambos ratones tienen sordera progresiva moderada-profunda. En el ratón *Otog*^{tm1Prs} la morfología de la membrana tectoria es normal en cualquier etapa, incluso cuando progresa la sordera. Probablemente la causa de la sordera se

deba a defectos ultraestructurales en la organización de la red de fibras que afecta a las propiedades físicas de la membrana tectoria y, por tanto, a su respuesta frente al estímulo sonoro (Simmler *et al.*, 2000a). En los últimos diez años se han aislado otros cuatro nuevos alelos mutantes *Otog* (designados *twt-2J*, *twt-3J*, *twt-4J* y *twt-5J*), aparecidos espontáneamente (Peck *et al.*, 2010). Hasta la fecha, no se han identificado ni la mutación presente en el alelo *twt* original, ni las de los cuatro nuevos alelos *twt*.

3. La estereocilina y la cohesión del paquete de estereocilios

3.1. Estructura y función del paquete de estereocilios

El paquete de estereocilios se localiza en el polo apical de las células ciliadas y es la unidad funcional de mecanotransducción, ya que permite que los canales de mecanotransducción se abran de manera coordinada (Kozlov *et al.*, 2007). El paquete de estereocilios está formado por microvellosidades y un único cilio verdadero denominado *kinocilio*, interconectados entre sí a través de distintas estructuras de unión como son (Fig. 6):

- Uniones apicales o *tip links*, orientadas exclusivamente a lo largo del eje de “mecanosensibilidad” y a los que se atribuye el papel de apertura del canal de mecanotransducción.
- Uniones laterales, orientadas en múltiples ejes. Parecen ser los responsables del mantenimiento de la integridad del paquete de estereocilios (Goodyear *et al.*, 2005). Hay cuatro tipos (Furness y Hackney, 1985; Osborne *et al.*, 1988, Tsuprun y Santi, 2002): uniones basales (*ankle links*), uniones intermedias (*shaft connectors*), uniones superiores horizontales (*horizontal top connectors*), y uniones kinociliares (*kinocilial links*).

La distribución y tipo de uniones laterales presentes en el paquete de estereocilios varía de manera dinámica durante su desarrollo, especialmente en las células ciliadas externas (Richardson *et al.*, 2010).

El paquete de estereocilios de las células ciliadas internas no se encuentra anclado en la membrana tectoria y se cree que su deflexión se produce por el desplazamiento de la endolinfa. Por el contrario, los estereocilios de las células ciliadas externas sí están anclados a la membrana tectoria. Cuando el paquete de estereocilios se deflexa hacia la fila de los estereocilios más altos, una corriente de carga positiva entra en la célula ciliada a través de los canales de mecanotransducción, generando una despolarización que estimula la liberación de neurotransmisor en la región basal de la célula ciliada. Cuando el paquete de estereocilios se deflexa en la dirección opuesta, entonces los canales de mecanotransducción se cierran y la célula se hiperpolariza (Richardson *et al.*, 2010).

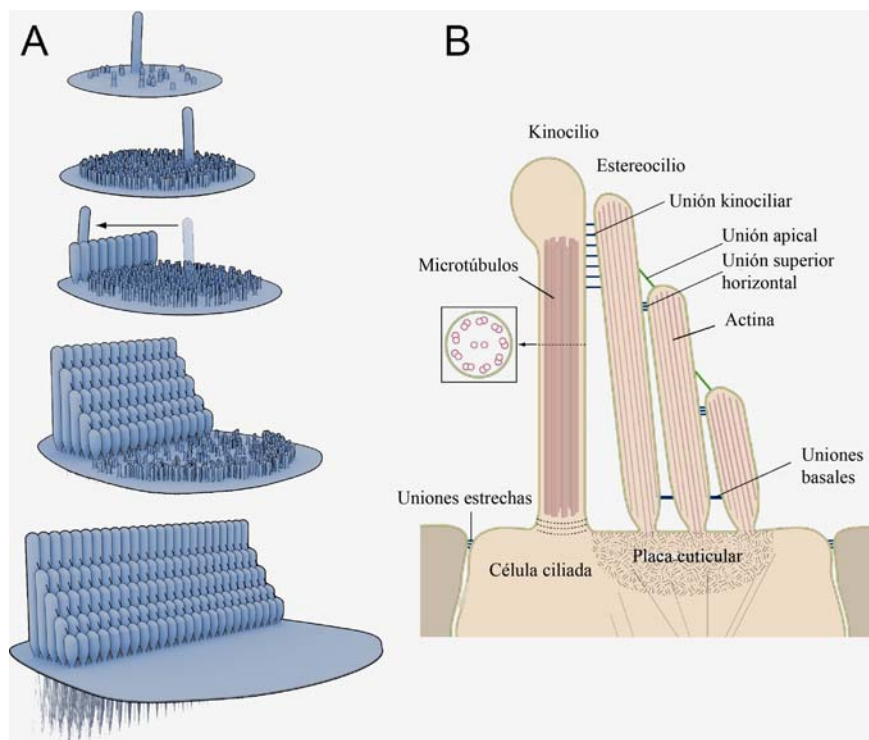


Figura 6. Desarrollo y estructura del paquete de estereocilios. A. Diagrama de las diferentes etapas del desarrollo del paquete de estereocilios (de arriba hacia abajo). En el comienzo, el extremo apical de las células ciliadas presenta microvellosidades y un kinocilio. Las microvellosidades crecen en longitud. El kinocilio se desplaza hacia el lateral de la célula ciliada. Las microvellosidades empiezan a crecer y forman estereocilios de diferente altura. Eventualmente, el kinocilio desaparece en las células ciliadas de la cóclea. B. Sección de un paquete de estereocilios y la parte apical de una célula ciliada. Modificado de Schwander *et al.*, 2010.

Se han identificado unas cincuenta proteínas que forman parte del paquete de estereocilios. Además de las proteínas del citoesqueleto actinas (β -actina y γ -actina) y miosinas no convencionales (miosinas IA, IIIA, VI, VIIa, XV y 1c), se han descrito proteínas de unión a la actina (espina, radixina, Triobp, taperina,...), proteínas del armazón (*scaffold*) del complejo de mecanotransducción y adaptación (armonina, whirlina,...), proteínas integrales de membrana con funciones muy variadas (cadherina-23, protocadherina-15, usherina, Ptpqr, Tmc1,...) y proteínas que intervienen en la cohesión del paquete de estereocilios, tales como la estereocilina y Loxhd1 (Richardson *et al.*, 2011).

3.2. Localización y función de la estereocilina

La estereocilina es una proteína de 1809 aminoácidos, que se detecta en las seis áreas sensoriales del oído interno: el órgano de Corti en la cóclea, las máculas de sáculo y utrículo, y las tres crestas ampulares del vestíbulo (Verpy *et al.*, 2001). La estereocilina, que presenta un péptido señal, es secretada al espacio extracelular, quedando anclada a la membrana plasmática de las células ciliadas a través de un dominio GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (Jovine *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2010). La estereocilina es necesaria para que tenga lugar el anclaje de la membrana tectoria al estereocilio más alto del paquete de estereocilios de las células ciliadas

externas, aunque las evidencias encontradas en los ratones *Strc*^{-/-} indican que no es la única responsable de esta unión (Verpy *et al.*, 2011).

En el vestíbulo de ratón, la estereocilina se detecta a lo largo del kinocilio de todas las células ciliadas desde el día embrionario 15,5 (E15.5) en adelante y parece ser la estructura responsable de conectar el kinocilio a los distintos geles acelulares (Verpy *et al.*, 2011). En la cóclea, la estereocilina se detecta alrededor de los extremos de los estereocilios de la fila más alta y en asociación con las uniones superiores horizontales que conectan los estereocilios adyacentes entre sí, ya sea con los de su misma fila o con los de otras filas (Verpy *et al.*, 2011) (Fig. 7). También se detecta alrededor de las marcas que deja el estereocilio más alto en la cara inferior de la membrana tectoria (Fig. 7), lo que indica que la estereocilina es componente de una estructura localizada en la interfase entre los extremos de los estereocilios más altos y la membrana tectoria. En el ratón *Tecta*^{ΔENT/ΔENT}, cuya membrana tectoria no tiene ni α -tectorina ni el resto de proteínas no colagenosas, la membrana tectoria está completamente despegada de la superficie del órgano de Corti (Legan *et al.*, 2000). En estos ratones no se detecta la estereocilina alrededor del extremo de los estereocilios más altos, mientras que sí se detecta en los de las filas medianas y más cortas. Estos resultados indican que la estereocilina está asociada a las uniones superiores horizontales y a las coronas de anclaje a la membrana tectoria (Fig. 8).

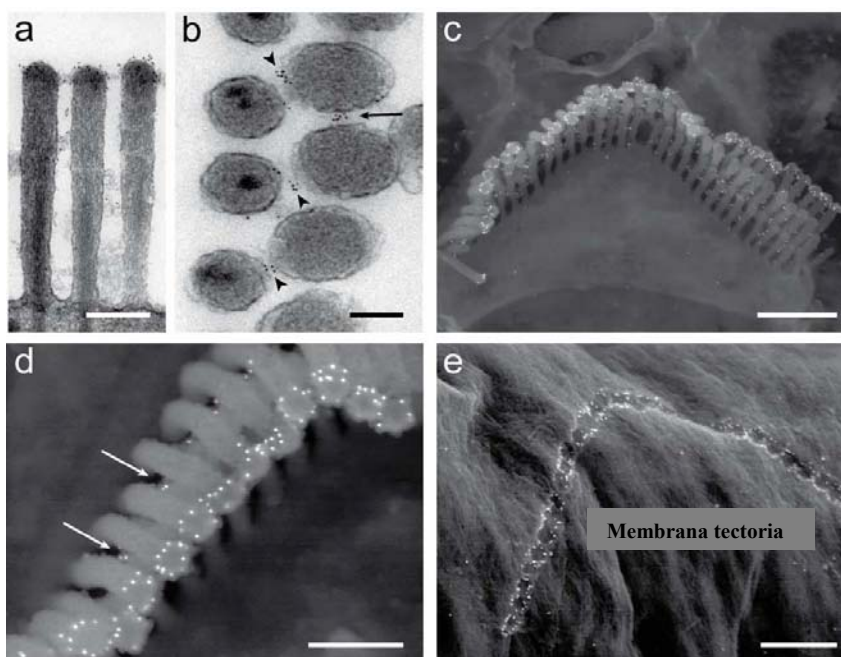


Figura 7. Inmunotinción con oro coloidal de la estereocilina en el paquete de estereocilios de células ciliadas externas maduras. (a) y (b). Micrografías electrónicas de transmisión del paquete de estereocilios de células ciliadas externas de un ratón en el día postnatal 22 (P22) tras la inmunotinción con estereocilina. En secciones horizontales (b), la tinción tiene lugar en los filamentos laterales (*lateral links*) que conectan los estereocilios adyacentes de una misma fila (flechas) o de filas diferentes (puntas de flecha) (c, e): micrografías electrónicas de barrido de paquetes de estereocilios de células ciliadas externas (c, d), y de la superficie inferior de la membrana tectoria (e) después de la tinción con anticuerpos anti-estereocilina. Modificado de Verpy *et al.*, 2011.

En ausencia de estereocilina, el estereocilio más alto de las células ciliadas externas no está anclado firmemente a la membrana tectoria, aunque se mantiene la asociación mecánica entre la membrana tectoria y las células ciliadas externas (Verpy *et al.*, 2008). Esto sugiere que la membrana tectoria actúa como una masa sobre la que el paquete de estereocilios de las células ciliadas externas puede reaccionar, incrementando el desplazamiento de la membrana basilar. El anclaje físico directo del paquete de estereocilios de las células ciliadas externas a la membrana tectoria no sería crítico para la correcta estimulación de las propias células, lo que no quiere decir que no intervenga en el mantenimiento de la asociación de células ciliadas externas y membrana tectoria a largo plazo, así como en la limitación de la magnitud del movimiento del paquete de estereocilios en caso de sobreestimulación (Verpy *et al.*, 2011).

La distribución de la estereocilina en el oído interno de ratón y las consecuencias de su ausencia han sido estudiadas con el ratón defectivo en estereocilina *Strc*^{-/-} (Fig. 9). En estos ratones, la estructura de las células ciliadas internas permanece intacta, sin embargo no ocurre lo mismo en las células ciliadas externas a partir del noveno día después del nacimiento (estadio P9). A partir de este momento, cada estereocilio se desconecta de los adyacentes en su fila, desapareciendo las uniones superiores horizontales y manteniéndose aún las uniones apicales. A medida que avanza el desarrollo del ratón, la estructura del paquete de estereocilios se deteriora hasta que todos pierden las conexiones que los mantienen unidos. Cuando se produce la pérdida de las uniones apicales, comienza una aparición progresiva de estereocilios acortados, en menor número en la base que en el ápice de la cóclea. Esto parece indicar que la pérdida de las conexiones entre los estereocilios se produce debido a las fuerzas mecánicas que soportan las células ciliadas externas durante la exposición al sonido (Verpy *et al.*, 2011).

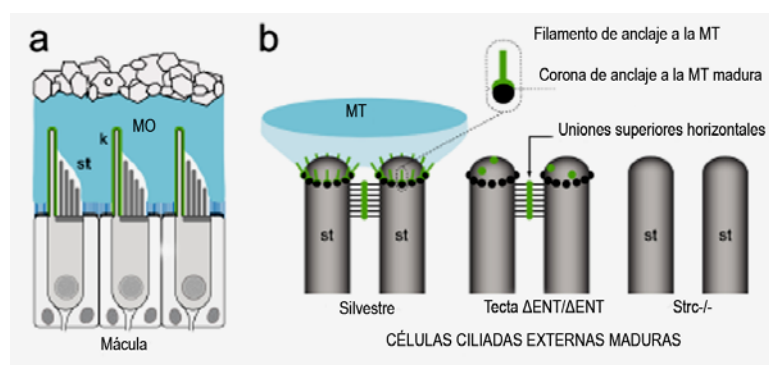


Fig. 8. Papel sugerido para la estereocilina en el paquete de estereocilios. La estereocilina está representada en color verde y los geles acelulares de vestíbulo y cóclea en azul. **A.** Localización de la estereocilina en el kinocilio (k), estereocilio (st), membrana otoconial (MO). **B.** Estereocilina en los extremos de los estereocilios más altos de las células ciliadas externas. Las uniones de anclaje (representadas como una estructura en forma de paraguas) unen la membrana tectoria a una plataforma compuesta por estructuras densas a los electrones (círculos negros) que forman la corona de anclaje a la membrana tectoria. En las uniones superiores horizontales, la presencia de estereocilina es todavía hipotética. En el ratón *Tecta*^{ΔENT/ΔENT} (sin membrana tectoria), la corona de anclaje a la misma permanece intacta así como las uniones superiores horizontales, mientras que las uniones de anclaje a la membrana tectoria se pierden. En el ratón *Strc*^{-/-} se pierden tanto los uniones de anclaje como las uniones superiores horizontales, y tampoco se detecta la corona de anclaje a la membrana tectoria.

3.3. Estereocilina (gen *STRC*, locus DFNB16)

El locus de sordera DFNB16 está localizado en el cromosoma 15q13-q21 (Villamar *et al.*, 1999). Trabajos previos en los que participó nuestro laboratorio establecieron que la sordera ligada al locus DFNB16 se produce por mutaciones en el gen *STRC* (Verpy *et al.*, 2001). La hipoacusia de tipo DFNB16 aparece en la infancia temprana y es estable (Villamar *et al.*, 1999). Se caracteriza por ser moderada en las frecuencias medias y severa en las frecuencias altas (Villamar *et al.* 1999).

El gen *STRC*, que codifica la estereocilina, tiene 29 exones que se distribuyen a lo largo de aproximadamente unas 19 kb. Este gen forma parte de una región que está duplicada en tándem en el cromosoma 15q15 y que contiene 4 genes (Fig. 9). En lo que respecta al gen *STRC*, se logró reconstituir la secuencia específica de cada copia utilizando la técnica del paseo génico (“*gene walking*”) (Verpy *et al.*, 2001). La duplicación proximal contiene el gen *STRC* en sentido estricto. La duplicación distal contiene una copia de *STRC* que presenta exones e intrones y que porta un codón de terminación prematuro en el exón 20, por lo que se considera un pseudogén no procesado, que se habría originado por duplicación (Verpy *et al.*, 2001). Las secuencias de gen y pseudogén son idénticas en la mitad 5’ (desde el exón 1 al 15, incluyendo las regiones intrónicas), pero difieren a partir del intrón 15, donde se detectan variaciones que permiten distinguir el gen del pseudogén (Verpy *et al.* 2001). Se cree que el pseudogén *STRC* (ψ *STRC*) no genera una proteína por la presencia del codón de terminación prematuro en el exón 20, si bien esta hipótesis no ha recibido aún confirmación experimental.

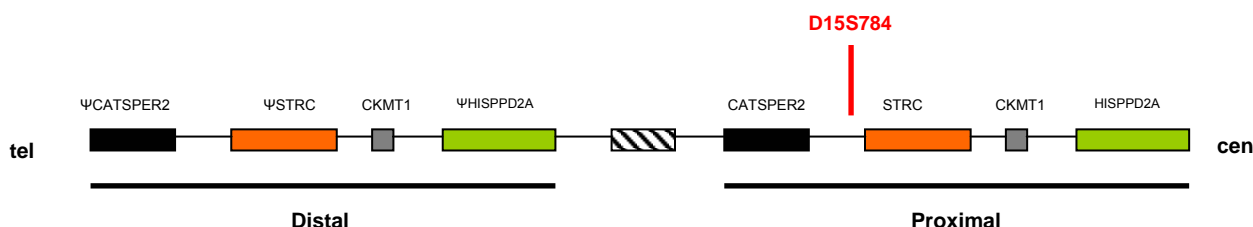


Figura 9. Visión extendida de la región duplicada del cromosoma 15q15 (telómero-izquierda, centrómero-derecha) que contiene 4 genes: *HISPPD2A* o *KIAA0377*, inositol fosfato kinasa; *CKMT1*, creatina kinasa mitocondrial 1; *STRC*, estereocilina; y *CATSPER2*, canal de cationes exclusivo de espermatozoides tipo 2. El marcador D15S784, que es único, está representado en rojo. La secuencia Line1 que separa las dos duplicaciones en tándem está representada por una caja a rayas. Los pseudogenes están representados por el símbolo ψ y están todos localizados en la duplicación distal. Obsérvese que las dos copias, distal y proximal, del gen *CKMT1* son funcionales.

La estructura de esta región, con duplicaciones en tándem, facilita la aparición de anomalías estructurales, entre las que diferentes deleciones son responsables de hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB16 (Verpy *et al.*, 2001). Además, deleciones más extensas de la región están asociadas a una de las raras sorderas sindrómicas producidas por deleciones de genes contiguos, el síndrome de sordera e infertilidad (Avidan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Knijnenburg *et al.*, 2009; Hildebrand *et al.*, 2009), que sigue un patrón de herencia autosómico recesivo. Los individuos varones afectados por este síndrome presentan sordera e infertilidad

producida por dismotilidad espermática, debida a astenoteratozoospermia. El síndrome se produce por deleciones que afecten al menos a los genes *STRC* y *CATSPER2* (Avidan *et al.*, 2003), aunque se han observado distintas deleciones que eliminaban la mayor parte de la duplicación proximal, incluyendo los genes *HISPPD2A*, *CKMT1*, *STRC* y *CATSPER2* (Zhang *et al.* 2007; Knijnenburg *et al.* 2009) (Fig. 9).

Existe un marcador no polimórfico de tipo STS, denominado D15S784, que está presente exclusivamente en la duplicación proximal y que está situado entre los genes *STRC* y *CATSPER2*. Gracias a este marcador se puede detectar la existencia de deleciones que afectan a ambos alelos de la duplicación proximal (Zhang *et al.*, 2007), lo que ha servido de punto de partida para el estudio de individuos con el síndrome de sordera e infertilidad.

Las duplicaciones presentes en la región y el alto porcentaje de similitud entre el gen *STRC* y su pseudogén han obstaculizado el análisis molecular de *STRC* en individuos con sordera no sindrómica. Las aproximaciones basadas en PCR que han sido utilizadas hasta la fecha resultan insatisfactorias porque en la mayoría de los casos no permiten averiguar con certeza si las mutaciones puntuales detectadas se hallan en exones del gen o del pseudogén (Francey *et al.*, 2012).

3.4. Loxhd1 (gen *LOXHDI*, locus DFNB77)

El locus DFNB77 se localiza en 18q12-q21 y fue identificado al investigar una familia iraní con cinco generaciones que presentaba sordera de herencia no sindrómica autosómica recesiva efectuando un genotipado de SNPs a genoma completo (Grillet *et al.*, 2009).

El gen responsable de la sordera DFNB77 es *LOXHDI*, de 40 exones, que codifica la proteína Loxhd1, de 2211 aminoácidos. La proteína Loxhd1, muy conservada en la evolución, está compuesta por 15 dominios PLAT (policistina/lipoxigenasa/ α -toxina de *C. perfringens*) que presentan gran similitud estructural con los dominios C2 de unión a Ca^{2+} y fosfolípidos (Naylor *et al.*, 1998). Aunque los dominios PLAT ya se habían encontrado en otras proteínas, Loxhd1 es la primera proteína identificada que está compuesta exclusivamente por dominios PLAT. Los dominios PLAT parecen estar implicados en el transporte de proteínas hacia la membrana plasmática (Bateman y Sandford 1999; Aleem *et al.*, 2008) y en mediar interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Grillet *et al.*, 2009). Se han encontrado ortólogos de *LOXHDI* muy conservados en la evolución en los cordados, los cuales presentan células mecanosensoriales con protrusiones ricas en F-actina (esto es, estereocilios) y microtúbulos (kinocilios). Sin embargo, no se han encontrado ortólogos de *LOXHDI* en los ecdisozoos, cuyas células mecanosensoriales presentan exclusivamente protrusiones con microtúbulos (Grillet *et al.*, 2009).

La proteína *Loxhd1* se expresa en células ciliadas maduras a lo largo de la membrana plasmática del estereocilio (Fig. 10). Su estructura y localización sugieren que podría intervenir en la asociación de la membrana plasmática al citoesqueleto de F-actina subyacente (Grillet *et al.*, 2009).

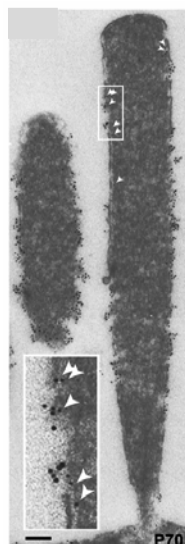


Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión mostrando la localización por inmunotinción con oro coloidal de la proteína *Loxhd1* en los estereocilios de células ciliadas externas de ratón (estadio P70). La proteína se localiza a lo largo del estereocilio pero está ausente en los extremos.

En ratón, las mutaciones en *Loxhd1* se asocian con alteraciones de la estructura de los estereocilios que preceden a la eventual degeneración de la célula ciliada. Estas alteraciones se detectan en la región basal de la cóclea (sensible a las altas frecuencias) del ratón *samba*, generado por mutagénesis ENU, que es homocigoto para una mutación *missense* en *Loxhd1* (Grillet *et al.* 2009). Por su parte, los pacientes con sordera de tipo DFNB77, descritos hasta la fecha, todos los cuales portan en homocigosis mutaciones de tipo *nonsense* en *LOXHD1*, presentan hipoacusia que afecta tanto a las frecuencias medias como a las altas (Grillet *et al.*, 2009; Edvarson *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

- 1. Genes que codifican las proteínas de la membrana tectoria α -tectorina, β -tectorina y otogelina.**
 - 1.1. Determinar la prevalencia de la hipoacusia de tipo DFNB21 y caracterizar su espectro mutacional en la población española.
 - 1.2. Averiguar si existen mutaciones en los genes candidatos *TECTB* y *OTOG* que sean responsables de casos de hipoacusia hereditaria en la población española.

- 2. Hipoacusia de tipo DFNB16**
 - 2.1. Desarrollar herramientas moleculares de diagnóstico para poder detectar e identificar mutaciones causantes de hipoacusia en el gen *STRC*, soslayando las dificultades causadas por la existencia de un pseudogén no procesado (Ψ *STRC*).
 - 2.2. Utilizar las herramientas de diagnóstico desarrolladas para determinar la prevalencia de la hipoacusia DFNB16 y caracterizar su espectro mutacional en la población española.

- 3. Determinar la prevalencia de la hipoacusia de tipo DFNB77 y caracterizar su espectro mutacional en la población española.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y métodos generales

1.1 Pacientes incluidos en los estudios sobre hipoacusias de tipo DFNB

Este estudio ha sido realizado en familias de la colección de nuestro laboratorio con hipoacusia no sindrómica cuyo modo de herencia es compatible con un patrón autosómico recesivo. Previamente a la extracción de muestra de sangre periférica de cada uno de ellos se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos participantes.

Se recogieron todos los datos disponibles sobre la historia clínica del paciente y sobre las características audiológicas de su hipoacusia en cada caso. Ninguno de los pacientes incluidos en este trabajo tenía rasgos sindrómicos, según lo reflejaban su historia y los resultados obtenidos en sus exámenes clínicos. Se excluyeron, además, los individuos cuya hipoacusia podía deberse a causas ambientales.

1.2 Extracción de ADN

La sangre fue extraída por punción venosa y recolectada en tubos con EDTA 5mM como anticoagulante. El ADN se extrajo con el sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagic MSMI, Perkin-Elmer, Inc). La concentración del ADN se determinó por medida de absorbancia a 260nm (A_{260}) y su pureza se estableció a partir de la relación A_{260}/A_{280} , en un espectrofotómetro UV-VIS NanoDrop 1000 (Thermo Scientific Inc.).

1.3 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR se desarrollaron en termocicladores Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700. En general, las amplificaciones de los diferentes fragmentos de ADN genómico se realizaron con 0,75 U de polimerasa FastStart Taq DNA (Roche), a volumen final de 15 μ L, utilizando el tampón (1x) correspondiente, $MgCl_2$ (1,0, 1,5, 2,0 ó 2,5 mM, según se indique), 2,5 nmoles de cada dNTP (mezcla a 1,25 mM de los cuatro dNTPs), 10 pmoles de oligonucleótidos cebadores y 20-50 ng de ADN genómico molde. Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5%.

1.4 Secuenciación del ADN

Para secuenciar mediante el método de los didesoxinucleótidos, se utilizó el kit *BigDye terminator cycle sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) en un secuenciador automático ABI PRISM 3130 de cuatro capilares (Applied Biosystems), con el programa informático Sequencing Analysis v.5.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de secuenciación se realizaron a volumen final de 20 μ L, utilizando 1,75 μ L de mix *BigDye*, 4 μ L de tampón *BigDye* (1x), 10-15 pmoles de oligonucleótido cebador y 2-5 μ L de molde PCR (previamente purificado con ExoSAP-IT (USB) según instrucciones del fabricante). El

programa utilizado fue: 1) desnaturalización a 94° C (3 min); 2) 25 ciclos de desnaturalización a 96° C (10 s), hibridación (*annealing*) a 50° C (5 s), extensión a 60° C (4 min); 3) conservación a 12° C. El análisis posterior de las secuencias se realizó con el paquete informático DNASTAR (v5.03; DNASTar Inc.) y el analizador ChromasPro (v1.33, Technelysium Pty Ltd). La nomenclatura de todas las secuencias nuevas descritas en este trabajo fue verificada con el programa informático Mutalyzer (Wildeman *et al.*, 2008), accesible en internet (<https://mutalyzer.nl/>). El grado de conservación de los residuos afectados por mutaciones de sustitución de aminoácidos (*missense*) se determinó con el programa ConSeq (Berezin *et al.*, 2004), accesible en internet (<http://conseq.tau.ac.il/>). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos previo al análisis de conservación llevado a cabo por el programa ConSeq se determinó con el programa ClustalW, accesible en internet (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). La predicción de los posibles efectos funcionales de los residuos afectados por mutaciones *missense* se efectuó con los programas Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei *et al.*, 2010) y SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) (Ng and Henikoff, 2001), accesibles en internet. Ambos programas son los más utilizados en el análisis y predicción de los posibles efectos funcionales de los residuos afectados por mutaciones *missense* y son los más eficaces por cómo su algoritmo representa la distinta información evolutiva de las proteínas que analiza. SIFT ordena las probabilidades normalizadas del sitio mutado usando un alineamiento múltiple de proteínas homólogas y Polyphen2 predice el impacto de las variantes usando una matriz de alineamiento y considerando las características estructurales de la proteína (Capriotti *et al.*, 2011).

1.5 Genotipado de marcadores

Para los estudios de segregación se emplearon marcadores genéticos polimórficos (microsatélites) descritos en la literatura (Dib *et al.*, 1996) o diseñados durante el desarrollo de esta tesis, que se encontrasen muy próximos a cada uno de los genes estudiados. Los oligonucleótidos cebadores directos fueron marcados con fluoróforos (6FAM o HEX, Sigma Aldrich) en el extremo 5' para diferenciar los productos según su emisión fluorescente y determinar su talla en un genotipador-secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. En estas reacciones PCR se empleó el programa siguiente: 1) desnaturalización a 95° C (5 min); 2) 30 ciclos de desnaturalización a 94° C (40 s), hibridación a 58° C (40 s); 3) extensión a 72° C (5 min); 4) conservación a 12° C.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL, a una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂ (si no se especifica lo contrario), utilizando FastStart Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

1.6 Búsqueda de mutaciones por análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC

La cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución o dHPLC (*denaturing High-Performance Liquid Chromatography*) permite la separación de fragmentos de ácidos nucleicos (ADN, ARN y oligonucleótidos) y es una de las técnicas más utilizadas para la detección de mutaciones. El calentamiento del ADN a temperaturas mayores de 50° C provoca que sus dos hebras se separen (desnaturización). Durante el proceso de renaturalización (al disminuir lentamente la temperatura), la doble hélice recobra su conformación nativa en forma de estructuras homodúplex (formadas por la reconstitución de las dobles hélices originales) o, si existen variaciones en heterocigosis, heterodúplex (resultantes del intercambio de hebras entre las dobles hélices originales, de forma que el nucleótido del SNP se encuentra desapareado). El principio del dHPLC consiste en añadir a la elevada resolución separativa de la cromatografía de fase inversa, un gradiente automatizado de temperatura en la columna, que mantiene parcialmente desnaturizadas *in situ* las moléculas de ácidos nucleicos y permite distinguir los heterodúplex de los homodúplex, por el menor tiempo de retención de los primeros.

Durante este trabajo se utilizó un dHPLC Transgenomic WAVE®. Tras su amplificación y comprobación en geles de agarosa al 1,5%, los amplicones fueron desnaturizados y renaturalizados en termocicladores Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700, con el programa: 1) desnaturización a 95° C (5 min); 2) renaturalización lenta hasta 40° C (rampa al 1%, que empíricamente corresponde a un descenso aproximado de 0,5° C por minuto); 3) conservación a 12° C. Para la predicción de la temperatura óptima (T_{opt}), el *time shift* (corrección del tiempo de retención) de los amplicones y el análisis de los resultados, se utilizó el programa informático Transgenomic's Navigator™ (versión 1.5.3).

2. Gen *TECTA*: locus DFNB21

2.1. Pacientes

Para este estudio investigamos 224 casos de la colección con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva. 77 casos eran familiares (S) y 149 esporádicos (E).

2.2. Análisis de haplotipos

Para el análisis de haplotipos fueron utilizados cuatro marcadores microsatélites ligados al locus DFNB21 en el orden: cen-D11S925-(*TECTA*-D11S4089)-D11S4107-D11S4167-tel. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 1.

MICROSATÉLITE	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
D11S925	5'-HEX- AGAACCAAGGTCGTAAGTCCTG	TTAGACCATTATGGGGGCAA
D11S4089	5'-FAM- ATTCCTAGTTCCTCATAAACACTG	TAATCAAAGGCTGTAGTGAATTGG
D11S4107	5'-HEX- TCATTCTACAAGACTAGCATTACC	GCTTGATCATGGTGTATTATCTT
D11S4167	5'-FAM- TCCCCACCTGCCTGAG	TGTTGACAAAATGTTGTTATGC

Tabla 1. Secuencias de cebadores para la amplificación de los marcadores microsatélites del locus DFNB21.

2.3. Detección de mutaciones en el gen *TECTA*

Se efectuó la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 2, en un individuo afecto de cada una de estas familias compatibles con ligamiento utilizando el siguiente programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 5 min; 2) 5 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s, e hibridación de cebadores (*annealing*) durante 40 s a 68° C en el primer ciclo y reduciendo 1°C cada ciclo (*touchdown*); 3) 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 63° C durante 40 s; 4) Paso final de extensión a 72° C durante 7 min. 5) Conservación de las muestras 12° C.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL, a una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
1	ACGGTTTTGATGGTCTTGGGATT	GACACACATGCACCTGCCCTTAC
2	CAGCTTGCAAGCCCTACTGAAAG	CGTTTTGGCTGCCAATAAATCC
3	ACGAACCTCTTAGTCTGAGCAATGG	CTGCAAAGTGGGTAGCAAAACTCAT
4	ACGGAGGCGAGAACAAATTCAG	TAAAAGCTGGTGGCAGGATTCC
5	AAATAAGGTAGTTGGGCCAGTTAACC	TGTCAAAAAGAGTAAGGCATCAGGAA
6	CTAACAGGGTTCTTACGTGGAT	GTGCATCTCTTTGGCACTGTA
7	GTTGAGTTGCTTTGCCTTCCTTTC	TTTCAACCTCCCCCTCATTCCTTG
8	ACTAAATGATCCAGGAGGAGCGTTA	GGCAGAAAGGCAAACCTGAAGA
9	ATAGGGCAGACCGTGTCTTTATCC	GGACCTTCCCTTCAGGACTCATT
10	CGCACATGCACTCACAAACACA	GATTCCGGACCTGCCTGATTC
11	CATCGTTAGGAGAAGAGCTGGGAAA	GGCCTTCCCAGAGCAATCAAGA
12	TAGGTGAGCAATGGCCATGAGAA	CCACGAACACGACGCTCTTCA
13	GACGAGGGGGACTGGGCTTT	TGTGTGGAACACCATGAAGCAACA
14	CAAAATATTTCCCTGGCCCTTT	CCACCCATGGACGTGAGAGAA

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
15	ATGCACTAGCTTCAGGGGTAGCA	CCAATCCTGGAAGCAGATCTATGA
16	CAGCTGCCATCTGACCATTTC	AAGTGGGATGCATCAAGGTCGTT
17	AAGGAGAATGGAAATGGGATGCT	AGCAGATCACCTGAAGTTGGTTT
18	AGGAAGCCATTTCTCCACTTTCAG	GCATCAAAGACAAACGCTAGCAA
19	CATTCTCAGCCTGAAAAATGGTAGGT	AATAAATGCAAAATTCTGGCCTTGTA
20	ATGCAGTCCAGGGGTCACTTTC	CAGTCCGGTCACCTGGCATT
21	GCCTAGAGTCCCAGTGGATTCAATG	TTGTCCACTGGACCCACATCAGA
22	GCCCAGCCTGTCTCCTCTCT	ACCGAGTGGCCTCAAATCTGA
23	TGGGTTCTTGGCAATGAAGTTC	TCATTTTGAGATGCTGGACACTTTC

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *TECTA*.

2.4. Cribado mediante análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC

Se utilizaron como moldes los mismos amplicones generados tras la amplificación con los cebadores de la Tabla 2 (apartado 2.3). Para los exones de mayor tamaño, se rediseñaron nuevos cebadores de manera que cada exón es analizado por dHPLC en un único fragmento de amplificación de menor tamaño que el amplicón de secuencia original (exones 3, 6, 13 y 15), o bien dividido en dos fragmentos de amplificación (exones 7, 8, 9 y 10) (Tabla 3). En la Tabla 4 se resumen las condiciones para cada uno de los fragmentos.

EXÓN	FRAGMENTOS dHPLC	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
3	3	TTCAGATCCACTGTGCAAAACCTCT	GATGTCAGGTTATGAAGTGGAAAGCA
6	6	AGGGGAAATGCTCAGTAAATGTTG	TCCATTTCCCCGTGAAGGATA
7	7-F1	ACCTGCTCACCTGCCTTTCCTA	GACAGTGCCACACTCCCACAGA
	7-F2	TGCCACTGAAGCCCTCTACTTTG	TTTCAACCTCCCCCTCATTCTTG
8	8-F1	TTGTTATCGGCTCTCTCTCTTCC	CGCAGGTCTTGTGAAGCAGTAGA
	8-F2	TTCTGGGCCACGGCCAACCT	AGGAACCCCTCCAAAGGAGCAA
9	9-F1	ATAGGGCAGACCGTGTCTTATCC	GAGTCATTGTTGCAGGCCTTCAG
	9-F2	AGTGTTCTCTGGAAAGCTGGACAA	CCTGGAAGGGAAGTCTGAGTAAG
10	10-F1	CTCAAACCCGTCTTCTCCTT	AAGCCATCAAAGGTGAGGTA
	10-F2	CGCCTCTGCATCGTCTCA	CCATCCTGACGTCTCCACGATT
11	11-F1	TCGTTAGGAGAAGAGCTGGGAAA	CACTTTGGAGAAACCTTCCACCTT
	11-F2	GCTTGCATCGAGTGTCAATGAGTT	AGGAGAAGCTACAAGGAGGGACAA
13	13	ATGCAAACGGCGCCTCTCT	TTGTTTCCGGGCCCTTCT
15	15	GCTGTTTTGTCTTCACTAGTCTGA	GGAGAGGACCAGTCATCCCTAGAA

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para analizar por dHPLC los amplicones de los exones 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15 y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *TECTA*.

Amplicón	Tamaño (pb)	Time shift (min)	T óptima (°C)
1	271	0.7	56.4
2	366	0.6	59.0
3	373	0.8	59.6
4	404	0.6	62.6
5	352	0.6	59.8
6	494	0.9	60.5
7-F1	442	0.9	58.1
7-F2	361	0.6	61.7
8-F1	330	0.5	64.3
8-F2	407	0.6	62.0
9-F1	423	0.8	59.2
9-F2	411	0.6	62.0
10-F1	432	0.6	61.5
10-F2	306	0.6	61.5
11-F1	416	0.6	59.2
11-F2	370	0.6	61.2
12	399	0.6	61.5
13	452	0.6	62.2
14	437	0.6	57.4
15	421	0.6	61.5
16	314	0.6	59.1
17	390	0.6	59.5
18	355	0.7	58.3
19	48	0.7	57.9
20	405	0.6	56.6
21	353	0.6	56.1
22	308	0.6	59
23	334	0.6	55.7

Tabla 4. Condiciones para el análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC de los exones del gen *TECTA*.

3. Gen *TECTB*

3.1. Pacientes

Para el estudio de este gen candidato analizamos 45 familias de nuestra colección con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva.

3.2. Análisis de haplotipos

Para el análisis de haplotipos fueron utilizados tres marcadores microsatélites localizados en las proximidades del gen *TECTB* en el orden: cen-D10S1750-D10S1682-*TECTB*-D10S1269. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 5.

MICROSATÉLITE	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
D10S1750	5'-FAM-TTTTACAGGCCAAAAGTG	CGGCTTAACCTTAATCATTCC
D10S1682	5'-HEX-CCAAGAGTTTACTACTAATCCTTCAG	AGCTAATGAGTCCAAGTCCA
D10S1269	5'-FAM-CTCAGATCGCGGAGTAGA	TGCTGTATTTATTACCAGTGCTTG

Tabla 5. Secuencias de cebadores para la amplificación de los marcadores microsatélites cercanos al gen *TECTB*.

3.3. Detección de mutaciones en el gen *TECTB*

Se efectuó la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 6, en un individuo afecto de cada una de estas familias compatibles con ligamiento utilizando el siguiente programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 5 min; 2) 5 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s, e hibridación de cebadores (*annealing*) durante 40 s a 68° C en el primer ciclo y reduciendo 1° C cada ciclo (*touchdown*); 3) 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 63° C durante 40 s; 4) Paso final de extensión a 72° C durante 7 min. 5) Conservación de las muestras 12° C.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL, a una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
1	AAAATTTCCCAAGACTGTATGTGC	TGGAGGGGGTGCTTAAGTACTTTC
2	TTTTGTCACAGCTGGTGAGGAATAG	AGCTTCACTGGCTTTGGCAACA
3-4	CCCAGAACCCTCATTCCCATC	TGCACAGAGCTTGGGGAAGACT
5-6	CACCTGCTTATGTCTTTGGGTTGA	TTCACCTCTTCTCCCAAGCTTT
7	CCTTGTGTGTAAATCGCTCAGCAG	CTGCCCTGGCCTGGTTATGAT

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
8	CTCACGCATCATCCACCTTC	CCTTCGTTTGGCTTGAGCTGTT
9	CCCAGCCAGGTTTGTGTGTGA	TCTTCAGAGTTCAGGGGCTGGT
10	GTGCCATCTCCCTCCCTTCT	ATTCTCTGCCCCCAACAATG

Tabla 6. Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *TECTB*.

4. Gen *OTOG*

4.1. Pacientes

Para el estudio de este gen candidato analizamos 60 familias de nuestra colección con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva.

4.2. Análisis de haplotipos

Para el análisis de haplotipos fueron utilizados tres marcadores microsatélites ligados al gen *OTOG* en el orden: cen-D11S902-*OTOG*-D11S4138-D11S4130-tel. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 7.

MICROSATÉLITE	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
D11S902	5'FAM-CCCGGCTGTGAATATACTTAATGC	CCCAACAGCAATGGGAAGTT
D11S4138	5'FAM-GTGCTGACCGCTCCAAGG	CCAAAGGGGTTAATAGGGGTCCA
D1S4130	5'FAM-AGCTCTGGAATCTCATCTTC	AGTCATGTGTGAGTCTGTG

Tabla 7. Secuencias de cebadores para la amplificación de los marcadores microsatélites del locus DFNB18.

4.3. Detección de mutaciones en el gen *OTOG*

Se efectuó la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 8, en un individuo afecto de cada una de estas familias compatibles con ligamiento utilizando el siguiente programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 5 min; 2) 5 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s, e hibridación de cebadores (*annealing*) durante 40 s a 68° C en el primer ciclo y reduciendo 1° C cada ciclo (*touchdown*); 3) 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 63° C durante 40 s; 4) Paso final de extensión a 72° C durante 7 min. 5) Conservación de las muestras 12° C.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL, a una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
1	GCTGCGGAGTGGAGGTGTGA	CTCTTTCCCCGCGGTCATA
2	CCCACAGCTCCCATCCGTATT	ACTCCAGAGACCCCTCCTGTAACC
3	CCTCATGGTCTGCCGCAGAG	CCAAGCAGGAAAAAGGGGTCA
4-5	CTGGATCCTGTGAAGCCTGAGAG	TAGAGCCCAGGCCAGTGCAG
6	TTGCTCCCCCTCTGTGATGTATG	CCAGTATGCTTCCGCCAGAT
7	GAAGTGGGGGCTTGGATCA	TGTTCCAAGTCCCCTCCAACC
8-9	CTTTTCAGGAGAATGGCTCAGTTG	TCAGAGCCTTGGGAAGCAGATCT
10	CCTGAAGCCCTGGCAGTGTC	AAACCTCGGGGCTGAGAGTTCT
11	TCAAAGCCCTCCCTCCCATC	TTCCTTCCTTCTCCACAAACAG
12-13	GGAGAAAGTTTGAAGTCGGTTCA	CGTAGCCAATGGAAGTGAAGTGA
14	TTCTCTGGGGACAAGCCTGTG	GGGCCATGGGAAGACCTGA
15	CTTTGGGGCTCTGTCTGTCAATTCT	AACCAAAGTGTCCCCTATCCTGATC
16	GGTTTCTCAAGCCTCCCCATA	AGTGCCTCTAGATACCCAGCCCTAA
17	CTATGCTATTTGTGCCCCCTGAGT	TCCTACAAATTTGGCCAGCACTCT
18	CATCCGTACAGCGTGTGCACA	TGGAGGAGACTGGAGGGCATC
19	TCAAATCCTGCCTCTGACCTTGA	GCCAGGTTCCCAAGTCTCAGA
20-21	CTGGAGATGTGTACATGTCACTGTAG	ATCAGTGCTCCACTCCCCACTCT
22	CTCCAGCTGCTGCCCCTGTA	TCCCTCCTCCAGCCCACACT
23	ACAGATGGCAGCTATGGGAAGAGT	ACACAAACCCCTATACCACACACAAC
24	GTCTCCTGCATGAAATCACAATCCT	GCCTCAGCACTTCTTCCAGTCTCTA
25	AGGCATCCAAAACCAGAACAGCT	GAAGCCAGTCCCTCAGCCCTCTT
26	GTCAGGGTATGAGGGAGGCAGA	GGAGGAGAGAACAGAGGCATGC
27	GATAGACTCCTGGGCTCATGGTGA	ACCTCACACCAGCATCCCTCTTC
28	GCCACCCTAAAATCTGTCTGTCATG	GAAATAGGACGGACTCATCTGAGCTG
29	TCATGTTGGTGCTGGTCGTCAT	GCATGCCACAGGTGACACTC
30	AAGAAGGGAGGCTGGGATGCT	CTCGGGATGGCTGATGCTGT
31	AGGGGTGGGGCAGGAGGTAT	CCTATTTCTCCGGCCACTACAGATAC
32	GGGCTGGGGGCTGGTGTA	GTGGGAAGAGCAGTGGACTGAGAG
33	CACTACCCCAACCACCATGA	ACACAGTTACCGTGGTACACACATCC
34	GGATAAGGCCTGTGCTCAA	TGTGCTGATCTTGCTTCTCTG
35F1	CCTCAAGCCTCACACCACAGC	CGACCGGGAGGAGACTGTGAT
35F2	TGGAGACAACAAGGGTGAAGTGA	TGCAGAGGGGAGTGGGTGTG
35F3	TATCCACAGAGAAGGGCGAAGC	GTGGTGCTCTTTCGTGGGACA
35F4	CCTTTCACTCCAGCAGCAATGAC	GCAGGGAAGAGGAAGGGATGAA
36	CTGCCCCGCTAGGACCTACAT	GCTCAGACCACGCATCACACAG

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
37	CCAGGAACCTGCCCCATCTT	CCTGGCTCACTGCTCCGTCT
38	CACTCACTTGGAGGGGACAGA	CACCCCTGCCCTGAATCATG
39	ACATGCCACTTTCGACGGTGAT	TCCCTGCCCTGACAGCTCTG
40	GGTTTCCTAGCTTCCCTTACCTAA	CCCCTCCCTGCCCAAAAG
41	TGGGCTGGCTGGGGATG	CCATGAATGATTAAAGCTGGGAAAG
42	AGGTAGGCCTGGTGCCACT	ACTGGCCACCCCTAAGCAGAC
43	TCTGCTTAGGGGTGGCCAGTAA	GCACTGACTCCTGAGCCTCTGC
44-45	GGGCAGTTGTCCAGTGTCTCC	TCTGAAGACCCCCAGCCTTTC
46	CTGTGTGCCAGGCCCTATG	GCTCCCTGTCAACCCCAT
47	TCACATCCCCAGGTGCCTGT	GGTGATTCTGGTGGCTTCTCTAG
48	TCCAGGGTACCCAGGGGATT	CCCGGGTTCCTTGCACTAGA
49-50	CCACCACAGGGAGGGACTGAC	GGGGGTTTAGGGCAGCTTCA
51	GGCTCTGGGATCCCTCACAGATA	AGATGGACAGCCTGCGCAAA
52	TTTGCGCAGGCTGTCCATCT	AAATGCAGAGAGACATATGGATTGG
53	ACTCTGCCTGTTTCTGGGATCTTG	TGGTGTGGGTGTTATCCCTTCAT
54	GGATGGGGAGGGGCACTAAT	CAAACCCCTCCATCCCAT
55	GGGCAGCAAAAAATGGGATG	CGTGCCAGATTCTACCACCTT

Tabla 8. Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *OTOG*.

4.4. Detección de mutaciones en el gen *Otog* de ratón

Se procedió a la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *Otog* en las cuatro estirpes de ratón *twister* disponibles en The Jackson Laboratory: $Otog^{tw-2J}/Otog^{tw-2J}$ (C57BR/cdJ- $Otog^{tw-2J}/Kjn$), $Otog^{tw-3J}/Otog^{tw-3J}$ (B6.D2- $Otog^{tw-3J}/Kjn$), $Otog^{tw-4J}/Otog^{tw-4J}$ (C57BL/6J- $Otog^{tw-4J}/Kjn$), $Otog^{tw-5J}/Otog^{tw-5J}$ (C57BL/6J- $Otog^{tw-5J}/Kjn$), utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 9 y el siguiente programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 5 min; 2) 5 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s, e hibridación de cebadores (*annealing*) durante 40 s a 68° C en el primer ciclo y reduciendo 1° C cada ciclo (*touchdown*); 3) 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 63° C durante 40 s; 4) Paso final de extensión a 72° C durante 7 min. 5) Conservación de las muestras 12° C.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 μ L, a una concentración final de 1,5 mM de $MgCl_2$, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
1	AGACTGGTCTGTAGCCTGGTTCTCA	GGCCCAGACCTGTTTCGCTTA
2-3	GGGGTCTTACCTGGTGTGGAGAA	TTACACACTCAGACACGCACCAGAG
4	TTCATCTTCGGCATGTTTAGGTGT	TGGTACCCTGGCAGGCTCTCT
5-6	ATGTGTCTTGCCTCTGCTGGAAT	GGGGAGGTTCCAGGTTCCAA
7	GGAGGAAAAGCGTTCAGCACAT	CCAGTACCCACAGGCTAGACACAC
8	GGTAGGGGTGGCTGGCTGTC	CATGGCCATGATGTCAGAGGTCT
9-10	CAAGAGACTGGCTCAGTTGGGAAC	TCGGTTAAATGGGACAGCTGAAA
11	CCATGAGGAACTATTATTGGAAGGTT	AGGTTCTGACAGCTGTGGCTCTG
12	TTGGCCAAACAAATAGACCATAACC	CCTCACCTCCCTTAAGCCTGTCA
13-14	ATGGCTCTGAGTATGGGGACCTTT	ACCAGAGCAACAGAACAAAGAGGAGT
15	TCCATGAGCAAGCTGCCTTCTT	TCCCAGGAAGAGACAACAGCTGA
16	CACTTCTGCTCTGTGCCTTTGGA	TGCCGGAGTGGGGACAAAG
17	CAGGGCTTTCTGCAGGATGAAG	CTAAGGGGCCCATGGGTCTC
18	TGACCATGTGTTAGATATAAGCCAATG	CTCCCTGTGGCTTCTCCTTCTGT
19	ATCTGCCCATATTCCTGCTGTGT	GGAGGACACAGGGCTCTGCA
20	ATGCTAAACCCATCCACACAGTT	TGCATGCTGGTGGGAGGAAG
21-22	ACCTCTCTCCACACACCCTTGTCT	CGGGGATGGGGTACCCTCTA
23	AAGCTGCCCATCCCTTCCA	GTCTCTCCATCCTCGGCTGT
24	GACAAATCTAGAAGGAATGCTCTT	ACATTATCATGGTTACAAATATTCAAG
25	ATGGAGGTTGCTATGCTTGCTGA	TCCTCCCGGGGTCCAGATC
26	CCCTTCTCTTCTGTGCTCTTCATG	CCTCCCCAACTCCATCACCA
27	GGTGGAGGAAGGGGAGATGT	AGTGGAAGCAATGGACAGGACA
28	GCCCTACCCTATCCTTCTTAAACATG	CTTAGGCTAGGGATACCAGGCAGA
29	AGGGCCCCTATATGACCAGACAA	GAGCAGAGCTGAGGCAGGAGAA
30	AAGCTGGCTGCCTCTCCCATAT	GGATTGCAACACAGGAATATACACCA
31	GGGCAGAGGTTGGGTGTGAGT	TCAGCACTGATGTGGCCCAAG
32	GCACCTGACTCTTCTGAACTTCTG	CCATCAACACCGCCTTTTCTG
33	CCAGCCACTGAGTGTGAGAGCA	GAAGAGGAGAGAGGGCAGGGAAT
34	AGCTGGGATAATTCTGGGCACTAGT	TGTCACGTGAGAAAAATGGCTAAGA
35	TTTACACGTGTGCCATACAGATGATG	GACCCTGAGCAGAGTTTCTCAGTGA
36_F1	CCAGCCCCTTACCTCAGCACT	GCCACCTTAGTTACTGCAGTTGACAG
36_F2	CCACACCTCTGCAGCCCTCT	GAGGTGGAGGGGTGGGGATA
36_F3	TCTCTCTGGCCTACCTCTGGACA	CTCAGTCGCCAAGGGGGTAAC
36_F4	ACCCACCTCATCTCTGACTCTGT	GAACCTCAACAGACACAGCTTATGGTA
37	GTTCCAGAAGGGTCGAGGTAGGT	CTGCAGAAGTATGGGAGGGAACA

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
38	GTGTTTGA CTCACTGCCATCTT	CCAATCTCCCTCTCAGCCTAGTT
39	GAGGGGGCTCTGGGCTGAT	CAGCCCCTGCCCTAATTACA
40	GGAGTCAGTTCAGTGATGGGTGAGA	TTAACAGCCTCAGCCCCAGACA
41-42	GGGGCAGTTAGTAGTGGGCTTTG	CGTGGCTCTGGGAGTCCTTTC
43-44	TGGGCACGGTGGATGCTC	TCCCGGTTGTCATGGCCATA
45-46	AGGGCAGGGAATGGAAGGAG	CTTTCCTCTCAGTCACCCACAGAA
47-48	GGCCCCATCCTCTCCCTGA	GGGAAGCCAGTCTCAGCCAAG
49	GCTAGGCTGAGAGTTGTGCCATT	AGAAGACGGGAAGGAGAGGAGAA
50-51	CCAAAGGACCCAGTTGTCA	CATTCTGGAGCAGGCAGCAA
52-53	AGGGCAGCAGAGGGGCTTAGT	TTCTCCCACCCAGTCAGAGAGT
54	CTCCCATGCCAGCTCTCTAAG	AGGGCCATGACTTTCAGCTGAT
55-56	TGATGGAGGGGACATAAATGTGTG	ACAGCTTCCTCCTGACCTCAA

Tabla 9. Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *Otog*.

5. Gen *STRC*: locus DFNB16

5.1. Pacientes

Para este estudio analizamos 277 casos de nuestra colección con sordera no síndromica de herencia autosómica recesiva. De ellos, 131 son casos sin antecedentes familiares de sordera (casos esporádicos) seleccionados por presentar sordera moderada y 146 son casos familiares. 91 de estos casos familiares presentan sordera moderada.

5.2. Análisis de haplotipos

Se realizó sobre 55 familias de nuestra colección con sordera no síndromica de herencia autosómica recesiva.

Para el análisis de haplotipos fueron utilizados cuatro marcadores microsatélites ligados al locus DFNB16 en el orden: cen-D15S780-D15S778-*STRC*-D15S1039-D15S126-tel. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 (a excepción de los marcadores D15S778 Y D15S780 en los que la temperatura de *annealing* es de 54° C) y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 10.

MICROSATÉLITE	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
D15S778	5'HEX- TGCATTCCAGCCACTGACAG	GGGATTACAGGTGCATGAGCT
D15S780	5'FAM- AAATTGCAAGTTGGACAGAA	CTGATTGGAAGTTCCTGTGTG
D15S1039	5'HEX- TGCCGGTAGTAACATCTG	CCAAGGATAAAGTATTTGTGTC
D15S126	5'FAM GTGAGCCAAGATGGCACTAC	GCCAGCAATAATGGGAAGTT

Tabla 10. Secuencias de cebadores para la amplificación de los marcadores microsatélites del locus DFNB16.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 μ L, a una concentración final de 1,5 mM de $MgCl_2$ (a excepción de los marcadores D15S778 y D15S1780 en los que la concentración final de $MgCl_2$ fue 1 mM) utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

5.3. Detección de deleciones en la región que contiene el gen *STRC*

5.3.1. PCR múltiplex del marcador D15S784

Para determinar si existía delección de ambos alelos del marcador D15S784, se diseñó una PCR múltiple en la que se amplificaban simultáneamente D15S784 (tamaño 168 pb) y el exón 4 del gen *GJB6* (tamaño 333 pb) como control interno de amplificación. Los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 11. Este test se aplicó a las familias compatibles con ligamiento para el gen *STRC*. Se aplicó además a individuos afectados de sordera moderada pertenecientes tanto a casos esporádicos como a casos familiares con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva

AMPLICÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
D15S784	GAGACCCTGTCTCAAAACAC	GAGGAATGACTGAAATGATT
EXÓN 4 GJB6	CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT	CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA

Tabla 11. Secuencias de cebadores para la amplificación del marcador D15S784 y exón 4 del gen *GJB6*

Las condiciones de amplificación son las siguientes: 1) un ciclo de desnaturalización a 94° C durante 6 min; 2) 5 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s, e hibridación de cebadores (*annealing*) durante 40 s a 63° C en el primer ciclo y reduciendo 1° C cada ciclo (*touchdown*); 3) 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 58° C durante 40 s; extensión 72° C durante 30 s 4) Paso final de extensión a 72° C durante 5 min. 5) Conservación de las muestras 12° C

En aquellos casos en los que no se obtuvo amplificación del marcador D15S784 y sí del control interno, realizamos una segunda PCR para verificar que la ausencia de amplificación del marcador no se debía a la presencia de polimorfismos en las secuencias de reconocimiento de los cebadores utilizados. Para esta segunda reacción, los cebadores alternativos para la amplificación del marcador D15S784 se muestran en la Tabla 12.

MARCADOR	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
D15S784	TTATGCCACATTTCTTATGAGGATT	AGCCAAGATCATGCCACTCTACT

Tabla 12. Secuencias de cebadores para la amplificación del marcador D15S784

Las condiciones de amplificación son las siguientes: 1) un ciclo de desnaturalización a 94° C durante 6 min; 2) 30 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 60° C durante 30 s; extensión 72° C durante 30 s. 4) paso final de extensión a 72° C durante 5 min. 5) Conservación de las muestras a 12° C. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5%

5.3.2. Tipado fluorescente de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Las deleciones de ambos alelos del gen *STRC* en los individuos que no amplificaron el marcador D15S784 en la PCR múltiplex, fue confirmada por la detección de productos PCR marcados con un fluorocromo, digeridos por un enzima de restricción y separados por electroforesis capilar (del Castillo *et al.*, 2003). Se diseñaron dos parejas de cebadores (Tabla 13) para amplificar los exones 23 y 29, respectivamente, tanto de *STRC* como de Ψ *STRC*. En estos dos exones existe una variación SNP entre gen y pseudogén que crea un polimorfismo de tipo RFLP. Se trata en ambos casos de una diana *Bst*NI presente en el gen que no lo está en el pseudogén. Cada amplicón contiene además otra diana *Bst*NI, presente tanto en gen como en pseudogén, que utilizamos como control para verificar la digestión total por parte del enzima.

AMPLICIÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
EXÓN 23	5'HEX-CCTGCCTTCCCCCTTCAGAA	CCTACTTGTGACCCAAATCTTCTAACTCT
EXÓN 29	6'FAM-CCTCCTCACCCACCATAGAAG	TGTGAACGGCGTCTGGAGAGA

Tabla 13. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar indistintamente gen y Ψ *STRC* en el ensayo RFLP.

Las condiciones de amplificación son las siguientes: 1) un ciclo de desnaturalización a 94° C durante 6 min; 2) 26 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 60° C durante 30 s; extensión 72°C durante 30 s 4) paso final de extensión a 72° C durante 5 min. 5) Conservación de las muestras 12° C (del Castillo, *et al.* 2003).

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL, a una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Posteriormente, 8 µL del producto PCR se digirieron a 60° C durante 3 h con exceso de enzima de restricción *Bst*NI (5U/reacción) en volumen final de 10 µL. Se tomó una alícuota de 4 µL de la digestión y se separó en un genotipador-secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer siguiendo las instrucciones del fabricante para determinar su talla y la intensidad de fluorescencia. Usando esta técnica se detectaron hasta 3 productos fluorescentes de tallas distintas para cada exón. Para el exón 23: 65 pb (gen), 139 pb (pseudogén) y 238 pb (control de

digestión parcial). Para el exón 29: 135 pb (gen), 212 pb (pseudogén) y 328 pb (control de digestión parcial). La detección del fragmento control de digestión parcial implicó en todos los casos la repetición del experimento desechando los resultados obtenidos.

5.3.3. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

El análisis de comparación de secuencia entre gen *STRC* y Ψ *STRC* mostró que 28 nucleótidos antes del inicio del exón 23, el gen *STRC* presenta una secuencia de 31 nucleótidos que no tiene el Ψ *STRC*. Esta diferencia permitió diseñar una pareja de cebadores que amplificaran gen *STRC* y Ψ *STRC* simultáneamente para después resolver en un gel de agarosa los productos de amplificación correspondientes a gen *STRC* (228 pb) y Ψ *STRC* (197 pb) y confirmar por otra vía las deleciones de los dos alelos del gen *STRC*. Se diseñó una pareja de cebadores (Tabla 14) que amplifican gen *STRC* y Ψ *STRC* simultáneamente obteniéndose dos fragmentos de amplificación en los individuos silvestres correspondientes a gen *STRC* (228 pb) y pseudogén (197 pb).

AMPLICIÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
AFLP EXÓN 23	TGGCATCTCCAATCACTTCTTGTC	AATGTCCCTCGTACATCTGCACAA

Tabla 14. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar indistintamente gen y pseudogén *STRC* en el ensayo AFLP.

Las condiciones de amplificación son las siguientes: 1) un ciclo de desnaturalización a 94° C durante 6 min; 2) 30 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 63° C durante 30 s; extensión 72° C durante 30 s 4) paso final de extensión a 72° C durante 5 min. 5) Conservación de las muestras 12° C.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 μ L, a una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

5.3.4. PCRs de largo recorrido específicas del gen *STRC*

Una vez identificadas las familias con delección en homocigosis del marcador D15S784 se procedió al diseño de cebadores localizados sobre SNPs que diferencian el gen *STRC* del pseudogén *STRC* con el objetivo de conseguir amplificar específicamente el gen. Los cebadores diseñados se muestran en la Tabla 15. Se diseñaron dos PCRs de largo recorrido, una que amplifica específicamente el gen desde antes del comienzo del exón 1 hasta el intrón 22 y otra, que amplifica específicamente el gen desde el intrón 18 hasta después del final del exón 29.

AMPLICIÓN	Tamaño(pb)	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
LONG_PCR_PRE-EX1-IN22	15665	AGTTTGTTTCTCCTGGGCGTCAT	GAGCACTGTGAGAAATAGGGATCAAA
LONG_PCR_I18-POST-EX29	6240	GCCCAGCTCCACCTGAATCC	TGTGAACGGCGTCTGGAGAGA

Tabla 15. Secuencias de los cebadores utilizados para las PCRs de largo recorrido específicas del gen *STRC*.

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL, con 12,25 µL de H₂O, 2,5 µL de tampón 10X LA PCRTM Buffer II (sin Mg²⁺), 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM (concentración final 2,5 mM), 4 µL de mix dNTPs (concentración final de cada dNTP 2,5 mM), 1 µL cebador directo (10 mM), 1 µL cebador reverso (10 mM) y 0,25 µL de enzima *TaKaRa LA TaqTM* (5U/µL) (TAKARA Bio INC). Cada reacción utiliza entre 37,5 ng y 50 ng de DNA molde. El producto PCR de aproximadamente 16 kb se obtiene utilizando el siguiente programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 min; 2) 14 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s, e hibridación (*annealing*) - extensión de cebadores durante 10 min 45 s a 68° C; 3) 16 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s e hibridación (*annealing*) - extensión de cebadores a 68° C durante 10 min 45 s, autoextensión a 68° C durante 15 s; 4) Paso final de extensión a 72° C durante 10 min. 5) Conservación de las muestras 12° C. El producto PCR de aproximadamente 6 kb se obtiene utilizando el siguiente programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 94° C durante 2 min; 2) 14 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s, e hibridación (*annealing*) - extensión de cebadores durante 4 min 30 s a 68° C; 3) 16 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s e hibridación (*annealing*) - extensión de cebadores a 68°C durante 4 min 30 s, autoextensión a 68° C durante 15 s; 4) Paso final de extensión a 72° C durante 10 min. 5) Conservación de las muestras 12° C.

El producto PCR de aproximadamente 16 kb se resuelve en gel de agarosa al 0,6%. El producto PCR de aproximadamente 6 kb se resuelve en gel de agarosa al 0,8%.

5.4. Detección de deleciones en heterocigosis en el gen *STRC*: PCR cuantitativa (qPCR)

Para cuantificar el número de copias del gen *STRC* (detección de deleciones en heterocigosis del gen *STRC*) se diseñaron sondas para amplificar específicamente el gen *STRC* utilizando el programa informático Primer Express[®] Software v3.0 (Applied Biosystems). La sonda diseñada para llevar a cabo la qPCR se ubicó en una zona de copia única situada por delante del exón 1 del gen *STRC*, colocando los cebadores sobre SNPs que diferencian el gen del pseudogén *STRC*. Además se añadieron mutaciones sobre los cebadores para reducir su afinidad sobre la secuencia del pseudogén y por tanto favorecer aún más la amplificación del gen sobre el pseudogén. El truaje de la sonda se realizó siguiendo los principios de apareamientos incorrectos (*mismatches*) de las bases nucleotídicas (Kornberg & Baker, 1991).

Las secuencias de los cebadores de las sondas específicas del gen *STRC* así como del gen *ALB* utilizado como control se muestran en la Tabla 16. La adenina marcada en rojo en el cebador directo de la sonda *STRC* F1.2. V2 introduce uno de estos apareamientos incorrectos. En el caso del gen, genera un apareamiento A-C que sí se acomoda en una doble hélice de ADN de tipo B, permitiendo que continúe la extensión del cebador. Sin embargo, sobre la secuencia del pseudogén genera un apareamiento A-A, formándose una burbuja que impediría que la DNA polimerasa continuase la extensión del cebador, por lo que no se amplificaría el pseudogén.

SONDAS qPCR	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
SONDA <i>STRC</i> F1.2.V2	TCAGAGTTTTGATAGGGCTTTA	CGGGATCCCCTATCATTTGG
SONDA ALBÚMINA	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC

Tabla 16. Secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR. En verde se representa un SNP que diferencia gen de pseudogén (A=gen *STRC*, G = pseudogén *STRC*). En rojo se representa la posición de otro SNP que diferencia gen de pseudogén (C = gen, T = pseudogén). En esta posición se ha introducido un cambio para dificultar aún más la amplificación del pseudogén respecto al gen.

La reacción de qPCR se lleva a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) en un volumen final de 20 µL utilizando 10 µL de SYBR® *Premix Ex Taq*™, 0,4 µL de ROX Reference Dye (50×conc.), 0,8 µL cebador directo (10 mM), 0,8 µL cebador reverso (10 mM), 3 µL de H₂O y 0,2 ng, 1 ng y 5 ng de DNA respectivamente diluidos en 5 µL de H₂O. Cada reacción se realiza por duplicado.

La reacción de qPCR se llevó a cabo en el termociclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) bajo el control del paquete informático 7300 System SDS Software v1.3, utilizando el siguiente programa: 1) 50° C durante 2 min, 2) 95° C durante 10 min, 95° C durante 15 s, 3) hibridación de cebadores (*annealing*) 59° C durante 30 s, 4) 72° C durante 30 s, 5) 95° C durante 15 s, 60° C durante 30 s, 95° C durante 15 s. La medida de la fluorescencia y recogida de datos tiene lugar durante el paso 4).

Los datos de fluorescencia son procesados mediante el software del termociclador, el cual proporciona directamente los valores necesarios para la cuantificación:

- Los valores de umbral de ciclo (CP) de cada reacción. Se define el umbral de ciclo como el punto en el cual la fluorescencia sube apreciablemente por encima del ruido de fondo.
- La pendiente de la recta obtenida al representar los valores de CP en función de la cantidad de ADN de partida.

El modelo matemático empleado para la cuantificación del gen problema (*STRC*) respecto a un gen de referencia de número de copias conocido (*ALB*) es el siguiente (Pfaffl, 2001):

$$\text{proporción} = \frac{(E_{STRC})^{\Delta CP_{STRC} \text{ (control-muestra)}}}{(E_{ALB})^{\Delta CP_{ALB} \text{ (control-muestra)}}}$$

E_{STRC} = Eficiencia de la PCR del gen *STRC* = $10^{-1/\text{pendiente}}$

E_{ALB} = Eficiencia de la PCR del gen *ALB* = $10^{-1/\text{pendiente}}$

ΔCP_{STRC} = CP de la muestra control – CP muestra problema (para el gen en estudio, en este caso *STRC*)

ΔCP_{ALB} = CP de la muestra control – CP muestra problema (para el gen de referencia, en este caso *ALB*)

5.5. Detección de mutaciones puntuales en el gen *STRC*: secuenciación de exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *STRC*

Sobre las PCRs de largo recorrido específicas se secuenciaron los exones del gen *STRC* utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 17.

AMPLICIÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
STRC_EX1	TCCCCTATCATTAGTCCCTCTCACA	CACAAGTCTCTGCCTCTCTCCTTTG
STRC_EX2F1	GCTCAGGGGCAGGGTTGAG	GTCAGCAGCCAGGACAGAGTCA
STRC_EX2F2_EX3	TGGACTTGTGGAGGTGCTGCT	CAGCTCTTCACCTCCAGATTTTCC
STRC_EX4F1	GCTTGCCATGCCCCCTTGAG	GTCGCTCAGCCCACAGAGTCTC
STRC_EX4F2	CTGCTCCCACCCCTACCA	GCGTGTGGGGTGAGCAAGA
STRC_EX4F3	TCTGACCCCTGGCCCTTC	GCTTTCCTCTGGCAGAGCAC
STRC_EX5_EX6	TGCAGGAGAGACAGAGAAGACAGCT	GAGATGCTCAGTATCCCTGCCATT
STRC_EX7	GCTTGCTTTAGTGGGAGGAGGAA	ACCGTGACAGGAGCAGGAGGA
STRC_EX8_EX9	AGGGCTACAGAGGGTCAGAGGAA	TGACAGCTGTGCCTTCCTCTCTC
STRC_EX10	GTGCCCCTGTGTAGTGGTGTAGTGT	AACAGGTAAGAATGGCCATGGAGT
STRC_EX11	TGGGAAATTCAGATGTGGGATTAGA	GCGTCCTCCTGCAGACAGAGTT
STRC_EX12_EX13	TTGCCTTAGGAACCCACTTAGGAC	GATGCCTTCCTCCCAACCAGA
STRC_EX14	GTGGCAAGGAGGATGAGATAATCAG	ACCAGAACTCTCAGGGCCACTG
STRC_EX15	CCCCATGGTTCCTTTTCTCTGA	GGCTAAGGGATAGGTAAAGAAGGTAGACTA
STRC_EX16	CACAGAGTGAGGAGGCAGGACTG	CAAAGGGAGGTGCTAGGAGAACG
STRC_EX17_EX18	ACAGGCTGTTGTATGTGTTGAATGAG	GGAACAGTCAATACATAGAGCAACT
STRC_EX19	CACTAAATTGGTCTGGGGTCACAT	AGAGATTCTCGGACTCCAAGAGGTAT
STRC_EX20	AGGGGGCTTGGTGTCTTGATC	GCAAATGTCTCTCCTAGGCAGAAG
STRC_EX21	GCATGTCCTCTTTTCCCTTCC	GCTCACCAGTCCCCTCTATGCA
STRC_EX22	TGCAAAACAGAGACAGGACTTTGG	TTTGATACTCCCTGTACATCCTGCTG
STRC_EX23	TATTTCTCACAGTGCTCTATCCTCCAA	ATCTCTTGCTTCCCCCACCTCT
STRC_EX24	AATAAGCGTCTCTGTGTCTGATGCA	GATGATCTATAGGGCTGGGTCTGTG
STRC_EX25	TCCTCAGCCTTCCCCATGACT	AAATGAGTTCCTTCTCCATGG
STRC_EX26	TCTCATGACCACAGCCCTTTC	CTAGCCCTTATTAAACACCCTCAG
STRC_EX27-28	AGGGCACTTTGGGAGTAGTTAGAGAA	GAGCCAGACAGACCAAATTAGG
STRC_EX29	ACAGGCAGAGCGCTAATTTCCA	CGCCAGCTGATGACTCAAGATTC

Tabla 17. Secuencias de cebadores utilizadas para secuenciar los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *STRC*

6. Gen *LOXHD1*: locus DFNB77

6.1. Pacientes

Para este estudio analizamos 54 familias de nuestra colección con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva.

6.2. Análisis de haplotipos

Para el análisis de haplotipos fueron utilizados tres marcadores microsatélites ligados al locus DFNB77 en el orden: cen-D18S1143-*LOXHD1*-D18S1356-D18S1137-tel. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 18.

MICROSATÉLITE	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
D18S1143	5'FAM-CACTGAATGGCACTGTAAC	CCTGGGTGAGAAATGAC
D18S1356	5'HEX-AGCAGAAAGTTTGCAATGC	TAAGACAAATAGCCAGATGGC
D18S1137	5'FAM-TGACTATTGACATCTGGC	GGACTTGACGCTAATGAC

Tabla 18. Secuencias de cebadores para la amplificación de los marcadores microsatélites del locus DFNB77.

6.3. Detección de mutaciones puntuales en el gen *LOXHD1*

Se efectuó la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 19, en un individuo afecto de cada una de estas familias compatibles con ligamiento utilizando el siguiente programa: 1) un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 5 min; 2) 5 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s, e hibridación de cebadores (*annealing*) durante 40 s a 68° C en el primer ciclo y reduciendo 1° C cada ciclo (*touchdown*); 3) 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 40 s e hibridación de cebadores (*annealing*) a 63° C durante 40 s; 4) Paso final de extensión a 72° C durante 7 min. 5) Conservación de las muestras 12° C.

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µL, a una concentración final de 1,5 mM; de MgCl₂, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Los productos de PCR se resuelven mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
1	TCAGGTTCCCGCAGGTGTGA	GGCTTGCTCCGAAATCTTAGAATG
2	GCAGGACATATCGTGGGTCTCAC	CATAGGAGGCATTACCGTCCAAA
3	GGGAATCTTGGAATGGGATCTTG	GGGAAGTTTAGGGCACTGTGATTC
4	CAGCTTGCAAGGTATCCCCATTT	CAGAGCAAGACAGGCACGATTCT
5	GTGGTAGCTACTTTGGGGCCTCTA	AAATAGTCCTGGGCTTGGCTTATG
6	CAAGCCACACATGAAGCAAACC	GAAGAGTGGATGCAGATGGACCTAG
7	AGGTAATCGCCAGTCATCCCTGTAT	CCCAGCTGGCTCCTGTTTGA
8	ACATGATGGGGAAAGAGGATGTGT	ACCCAAAATGCCAATGAAAGAG
9	TGGGAGCCTGCTGAACATCAC	GCTTTTGCCTAGTGGTCTGACATTC
10	CTGTGTATACCCCGCCCTTCAGT	CAGCCTTGGTTCTGGACTGTTTG
11	CCTCACGTGCTCCTGGTTACAAG	TCACCATAACCCTTTTTCAGTCCCTAT
12	TTCTGCCCTAGTCATCTGGTTGCT	CTAAGGGGCTGAAGATGCAAAG
13	TAGAAGGAGAGGAGGAATCAGAG	GGACCAGCATCAGCTCAAC
14	GCTCCTGTCCCATGTGTGAAAGA	GAAGGGAATGTGAGGCTCAGGTC
15	GCCTCCATAGTGAATCTGCATGAAT	CTGCCACCTCTGTGAAAACATGAAG
16	CTTCCTGTCACCCCTGCACTA	CCCAAGTGTGCTTTTCTCTTCAAA
17	ATGGTGGCTACAGGCAGGTGAG	AGAAGCAGTGAAAGCCCCCATT
18	ACTGTAAAGCGCCAGGCACCT	AAAGCTCAGGTCTGGAGAGAGGAAG
19	CCCTCTCCATCCTGCAGCTTAG	ACCTATTTGGCCTCCACGTGAG
20	TTGGGAGTGTGGGCAGTTTCA	GGGAATCTCAGAGGGCACCAA
21	TCATCCCCACTCCTGGTTGCT	GGCCCACCCCAAGTCTTCT
22	GGGGCAGACAGGGGAGAGTTT	AGGGGAGGGAAGGAAGATGGA
23	AATCACTGGGCTCACAGATACAGGAT	CTGGGGAAGAATGTGGGTGAATC
24	TGTGGGGACTCATTGTGGGAAG	GGCTAAAGGGATTAAGGAAGCTGTG
25	CCACAGGAAATCATCTCTGCTCAG	CTGAAGGAAGAACTGGGGCTGA
26	GGCTGGTTGTGCTGGTGAAGA	ATCAGGATGAAGGGCATGTGTTT
27	GCAAAGGGACTCAGGGTGGAT	GCCTTGAACCTGCTCTGGAAAG
28	GAGCTGATGAATCCCTGAAGTTGG	AGGGCATGTGCTCAGGAGGAC
29	AGCAAACAAAAGGAAGGCATTAACC	GCCCAAATGAGTGTGCACAATG
30-31	GTGCAGCAACTGAGGGGGAAG	TGGGGCTCAAGAATGGCTCA
32	TCTGAAGGGCTCACTGCACTTTG	CTATCATGGGGCCCCGAGAA
33	CTAGGGTGGGACTGGGCACAG	ATTTGAGCTGGCCCTTGAAAGAG
34	GGATGCAAGAGATGGGCTGGT	GGTCCATTGACAAGCCAGAGGA
35	GCCCATTCCTCAAATCCCAAG	TGAAGAAAAATGCCCTGACCAGA
36	CAAGGCCAGAGCAAGAGGACTG	GGAAGCATCAATGTGGTGGTCAT

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
37	AACAAGGAGATCAAGGCCAAA	ACCTGACCCCCCTCCAGCT
38	TCTTGCTCCCGCCCTGAAG	TCCCTTTCACCATTGCCTGTTT
39	CCTCCAGGACTGCCATGAGCT	TGTCTCTTCCCTTCCTGCCTTCT
40	AAGAAGCAACTGGAAGAATGGAGATG	TGTAGGTTCAATAAACTGGGGGTAGG

Tabla 19. Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *LOXHD1*.

Recientemente descubrimos que habíamos diseñado cebadores sobre SNPs que acababan de ser publicados en las bases de datos. Diseñamos nuevos cebadores en aquellos exones donde alguno de los cebadores había sido diseñado sobre un SNP. La secuencia de los nuevos cebadores y la combinación con los cebadores ya diseñados se muestra en la Tabla 20.

EXÓN	CEBADOR DIRECTO (5'→3')	CEBADOR INVERSO (5'→3')
2	GCAGGACATATCGTGGGTCTCAC	ACCTGTGGTCAGATGTGCCTTCT
3	CCATGTCAGAAGGGAATCTTGGA	GGGAAGTTTAGGGCACTGTGATTC
8	ACATGATGGGGAAAGAGGATGTGT	GCCCATGCACTCTGTAACTAGTTCAG
10	CTGTGTATACCCGCCCTTCAG	GGCCAGATAGAAATTGTACCCCAT
11	ATGTGAGGGTGGCTTGATTGAAG	TCACCATAACCCTTTTCAGTCCCTAT
12	TCTGCCCTAGTCATCTGGTTGCT	TCCAAATCCACTCTGGCACTCTAA
14	GCTCCTGTCCCATGTGTGAAAGA	TCATGGTAGTAGGGCTGGGTCTTC
16	CTTCCTGTCACCCCTGCACTA	GTGTGAATGTGTGTTCCGAAATGG
18	CTGGAACAGGCTCAGGAAAGGTT	AAAGCTCAGGTCTGGAGAGAGGAAG
19	CCCTCTCCATCCTGCAGCTTAG	AGAGAGCTATTGGGAACCATGATG
20	TTGGGAGTGTGGGCAGTTTCA	GGATGAACAAGTCACACTGCCAAA
26	GGCTGGTTGTGCTGGTGAAGA	GGTAGGGCTTCTCCTCTCCCTCT
32	GGGCTCACTGCACTTTGTCTCTG	CTATCATGGGGCCCCGAGAA
38	CCTGAAGACGGGCACTGCTT	TTTCCCTTTCACCATTGCCTGT
39	CTTGCCATCCCATCCCTGTTT	GCTCTCTTGCCCATGGTCCAG

Tabla 20. En color azul las secuencias de cebadores rediseñados para la amplificación de los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *LOXHD1*.

RESULTADOS

1. Gen *TECTA*: locus DFNB21

Para este estudio analizamos 224 familias de nuestra colección con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva. De ellas, 149 corresponden a casos sin antecedentes familiares de sordera (casos esporádicos) y 77 son casos familiares.

1.1. Análisis de haplotipos

Para el análisis de haplotipos fueron utilizados cuatro marcadores microsatélites ligados al locus DFNB21 en el orden: cen-D11S925-(*TECTA*-D11S4089)-D11S4107-D11S4167-tel.

Analizamos por haplotipos 77 familias con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva. El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento de la hipoacusia al locus DFNB21 en 18 familias y exclusión en 54. En 5 familias la informatividad de los marcadores fue insuficiente para determinar el ligamiento al locus DFNB21.

1.2. Detección de mutaciones en el gen *TECTA*

En las familias en las que no se pudo excluir ligamiento de la hipoacusia al locus DFNB21, se secuenciaron los 23 exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *TECTA* en un individuo afecto de cada familia. Se detectaron los siguientes cambios: c.1111A>G (p.Arg371Gly), c.1485A>G (p.Ala495Ala), c.2256C>T (p.Ile752Ile), c.2805T>C (p.Tyr935Tyr), c.5171G>A (p.Ser1724Asn), c.5634C>T (p.Ser1878Ser), IVS15+16A>G, IVS17+40C>G, IVS17+41G>A y IVS17+65T>C. Todos ellos son polimorfismos sin efecto patogénico ya registrados en las bases de datos. Además, en la familia S1322 (Fig.11A) detectamos en los dos hermanos con hipoacusia dos mutaciones en heterocigosis no descritas previamente. Se trata por un lado de una duplicación de un nucleótido en el exón 1 que causa un cambio en el marco de lectura, lo cual provoca la aparición de un codón de parada prematuro: c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) (Fig. 12A). Por otra parte, en el exón 9 se encontró otro cambio en heterocigosis: c.2657A>G (p.Asn886Ser) (Fig. 12B). La segregación de las mutaciones fue comprobada por secuenciación en la familia siendo el padre (S1322-4) portador de la mutación c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) y la madre (S1322-5) portadora de la mutación c.2657A>G (p.Asn886Ser), lo que confirma que en los dos hermanos afectados ambas mutaciones se encuentran en heterocigosis compuesta. La madre portadora de la mutación c.2657A>G (p.Asn886Ser) era normoyente cuando recolectamos los datos para el estudio de esta familia. Cuando se publicó posteriormente que esta mutación podría estar implicada en hipoacusia de herencia dominante DFNA8/12 (Hildebrand *et al.*, 2011), nos pusimos en contacto con la familia y el nuevo examen clínico confirmó que había comenzado la pérdida auditiva de la madre portadora (Fig. 11C).

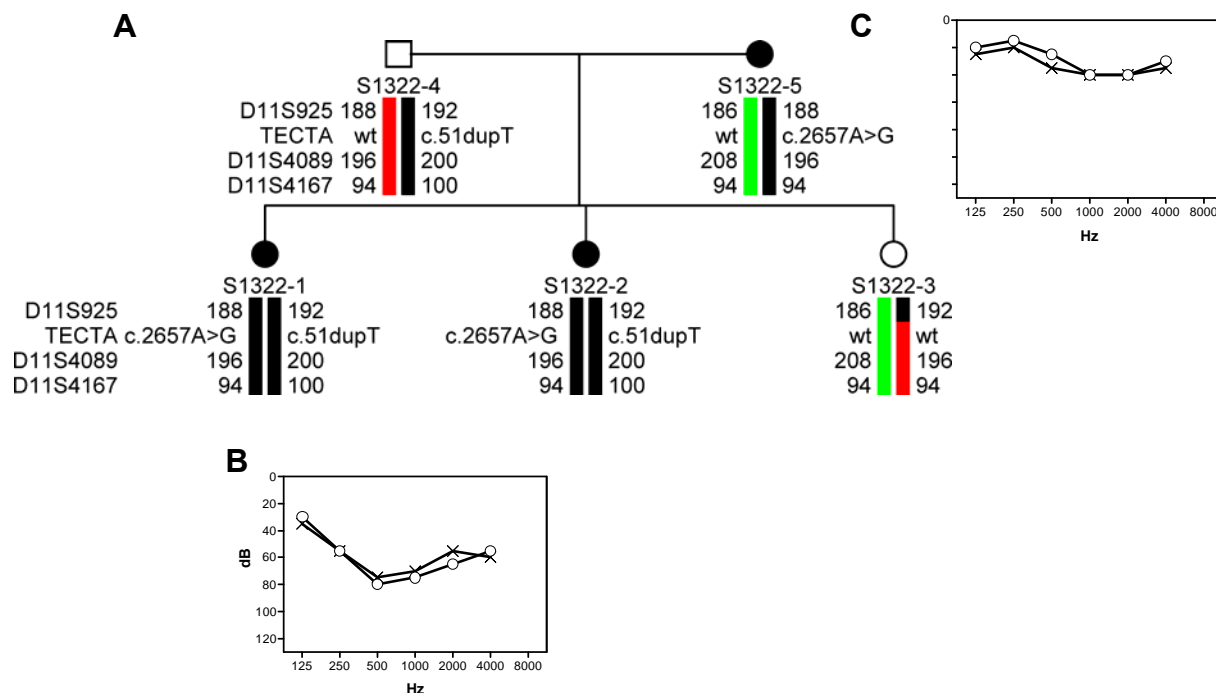


Fig. 11. A. Árbol genealógico de la familia S1322 donde se indican los resultados del análisis de haplotipos. B. Audiometría del individuo S1322-1, con las mutaciones en heterocigosis compuesta c.51dupT (p.Val18CysfsX18) y c.2657A>G (p.As886Ser). C. Audiometría del individuo S1322-5, portador de la mutación c.2657A>G (p.As886Ser).

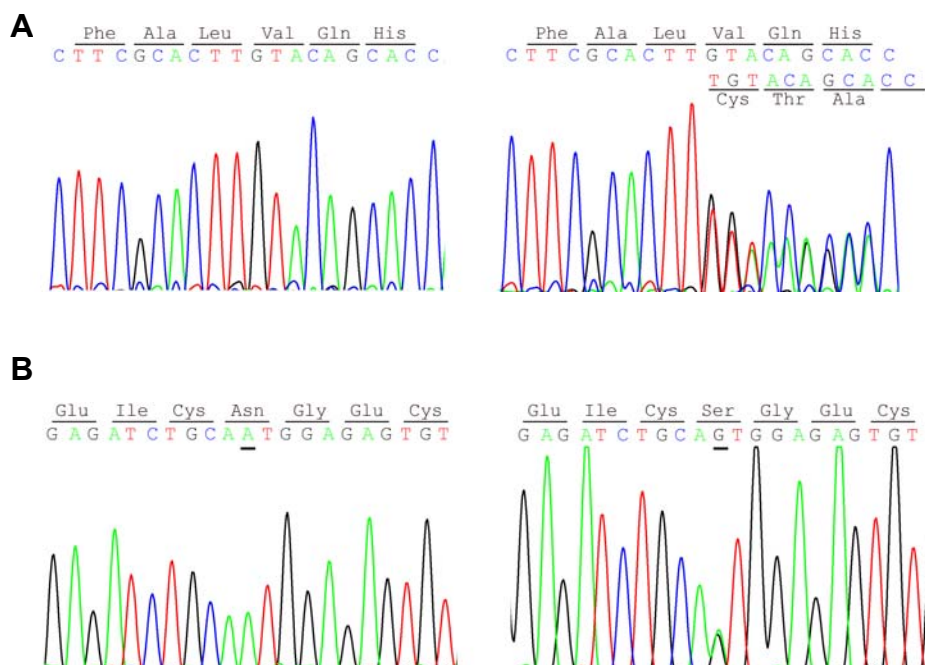


Fig. 12. Electroferogramas correspondientes a las mutaciones en el gen *TECTA* detectadas en la familia S1322. A. Electroferograma del exón 1 del individuo S1322-1 en el que se muestra a la izquierda la secuencia del exón 1 silvestre y a la derecha la mutación en heterocigosis c.51dupT (p.Val18Cysfs*18). B. Electroferograma del individuo S1322-1 en el que se muestra a la izquierda la secuencia silvestre del exón 9 y a la derecha la mutación en heterocigosis c.2657A>G (p.As886Ser).

El cambio c.2657A>G (p.Asn886Ser) genera una diana de restricción *Pst*I, de modo que se diseñó un test RFLP con el que se analizaron 50 controles normoyentes (100 cromosomas). En ninguno de ellos se detectó la mutación.

El residuo Asn886, que se localiza en el segundo dominio von Willebrand tipo D (vWD) de la proteína α -tectorina (Fig. 13A), fue analizado usando el programa ConSeq para determinar la conservación del mismo entre diferentes especies. Según la comparación de secuencias, la mutación p.Asn886Ser estaría afectando a un residuo altamente conservado (Fig. 13B). La mutación fue analizada en el programa informático PolyPhen2, obteniéndose un valor de 0,998 (escala de 0 a 1 siendo 1 totalmente deletéreo).

En conjunto, nuestros datos indican que la mutación c.2657A>G (p.Asn886Ser) sería patogénica y que las dos mutaciones c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) y c.2657A>G (p.Asn886Ser) son la causa de la hipoacusia de la familia S1322.

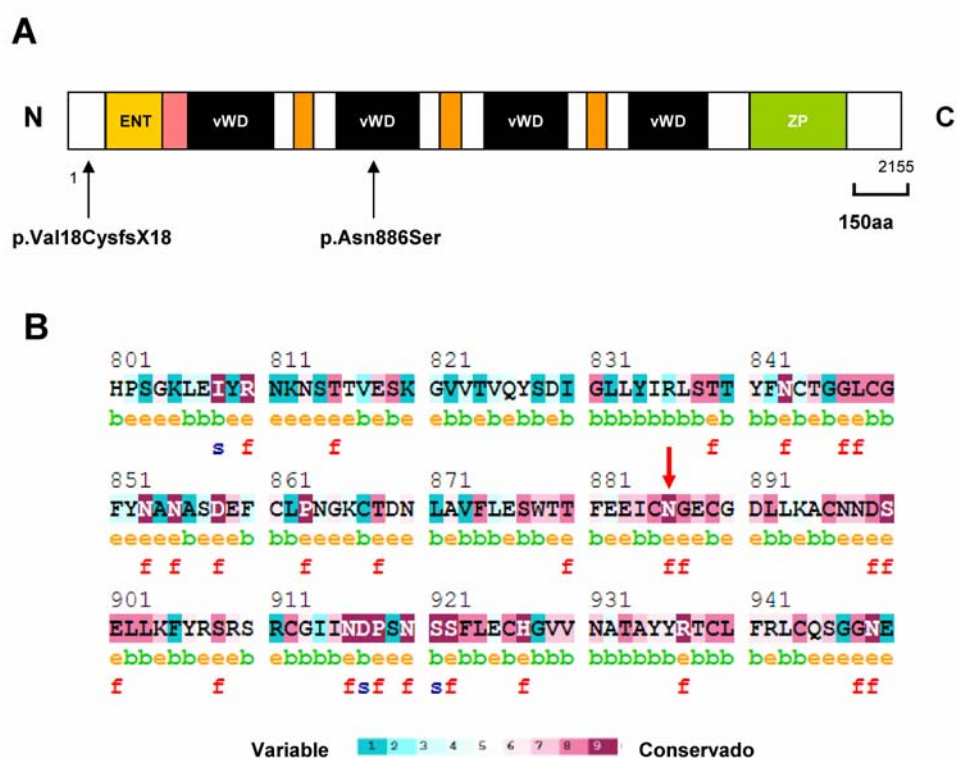


Fig. 13. A. Esquema de la estructura en dominios de la proteína α -tectorina humana. La caja amarilla representa el dominio entactina (ENT). Las cajas negras representan los cuatro dominios von Willebrand tipo D (vWFD). En rosa se representa el único dominio von Willebrand tipo C. En naranja, los tres dominios TIL formados por diez residuos de cisteína que forman entre sí cinco puentes disulfuro. Este dominio es típico de inhibidores de proteinasas así como de muchas proteínas extracelulares. La caja verde representa el dominio Zona Pelúcida (ZP). La localización de las mutaciones p.Val15CysfsX18 y p.Asn886Ser está indicada por flechas. La mutación p.Asn886Ser afecta al segundo dominio von Willebrand tipo D. **B.** Comparación de la secuencia de la α -tectorina humana con la de otras especies (macaco, mono tití, chimpancé, orangután, ornitorrinco, zarigüella, ratón, rata, cobaya, caballo, vaca, perro, pollo, sapo africano, pez globo, pez globo ocelado, pez espinoso) utilizando el programa informático ConSeq. La flecha roja indica el residuo Asn886 alterado en los individuos afectados de la familia S1322. Abreviaturas utilizadas: b (oculto); e (expuesto); s (estructural); f (funcional).

1.3. Cribado mediante análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC

Se analizaron 149 individuos con sordera de herencia autosómica recesiva sin antecedentes familiares (casos esporádicos). Se encontraron los siguientes polimorfismos en heterocigosis ya descritos en las bases de datos: c.56A>G (p.Gln19Arg), c.701A>G (p.Gln234Arg), c.2739C>T (p.Gly913Gly), c.2795T>C (p.Val932Ala), IVS1-12T>C, IVS15+26A>G, IVS17+41C>G, IVS17+42G>A y IVS17+66T>C. No se encontraron cambios patogénicos.

2. Gen *TCTB*

Para este estudio analizamos 43 casos familiares de la colección con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva. Para el análisis de haplotipos fueron utilizados tres marcadores microsatélites localizados en las proximidades del gen *TCTB* en el orden: cen-D10S1750-D10S1682-*TCTB*-D10S1269. Se detectaron 12 familias compatibles con ligamiento de la sordera al gen *TCTB*. A continuación se procedió a la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes en un individuo afecto de cada una de estas 12 familias. Se encontraron en heterocigosis dos polimorfismos no patogénicos descritos en las bases de datos: c.534C>G (p.Ser178Ser) y c.888C>T (p.Val296Val). Además, hallamos el cambio no descrito c.967T>C (p.Leu323Leu) en heterocigosis.

3. Gen *OTOG*

3.1. Análisis de haplotipos

Para este estudio analizamos 60 familias de la colección con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva. Para el análisis de haplotipos fueron utilizados tres marcadores microsatélites cercanos al gen *OTOG* en el orden: cen-D11S902-*OTOG*-D11S4138-D11S4130-tel. Se detectó compatibilidad de ligamiento al gen *OTOG* en 7 familias, exclusión en 52 familias y un caso de indeterminación por baja informatividad de los marcadores.

3.2. Detección de mutaciones en el gen *OTOG*

Secuenciamos los 55 exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *OTOG* en un individuo afecto de cada una de las 7 familias compatibles con ligamiento al gen *OTOG* así como en la familia con indeterminación por baja informatividad de los marcadores.

En los individuos afectados de la familia S1778 (Fig. 14) se encontraron en heterocigosis dos mutaciones no descritas anteriormente: c.6347C>T (p.Pro2116Leu) y c.6559C>T (p.Arg2187*) (Fig. 15). La segregación de las mutaciones se verificó por secuencia en todos los casos ya que no hay test RFLP factible. El padre (S1778-4) es portador de la mutación c.6347C>T (p.Pro2116Leu) y la madre (S1778-3) es portadora de la mutación c.6559C>T (p.Arg2187*), por lo que concluimos que ambos hermanos afectados portan las dos mutaciones en heterocigosis compuesta.

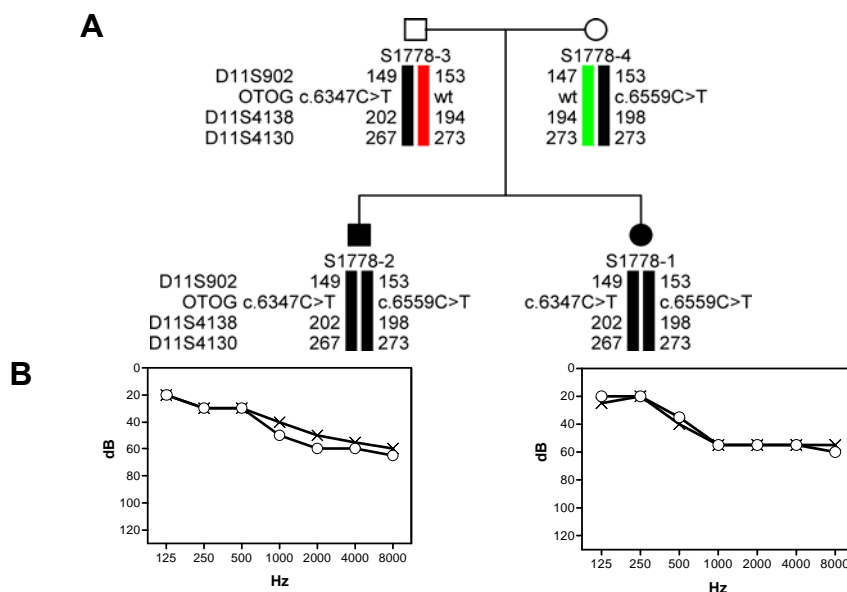


Fig. 14. A. Análisis de haplotipos de la familia S1778. B. Audiometrías del individuos S1778-1 (izquierda) y S1778-2 (derecha) a los 24 y 30 años respectivamente.

Se secuenciaron 300 controles normoyentes (600 cromosomas) sin que apareciese la mutación de sustitución de aminoácido c.6347C>T (p.Pro2116Leu). Por otro lado, el residuo Pro2116 fue analizado en el programa informático ConSeq (Fig. 16B) para determinar la conservación del mismo entre diferentes especies. Según la comparación de secuencias, la mutación p.Pro2116 estaría afectando a un residuo altamente conservado localizado en el cuarto dominio Von Willebrand tipo D de la proteína otogelina (Fig. 16). La mutación también fue analizada utilizando los programas informáticos Polyphen2 y SIFT. Ambos programas consideraron que la mutación es muy probablemente dañina: 0,973 en Polyphen2 (escala de 0 a 1, siendo 1 totalmente deletéreo) y 0 en SIFT (escala de 0 a 1, siendo 0 totalmente deletéreo). Estos resultados en conjunto apoyan la patogenicidad de la mutación p.Pro2116Leu.

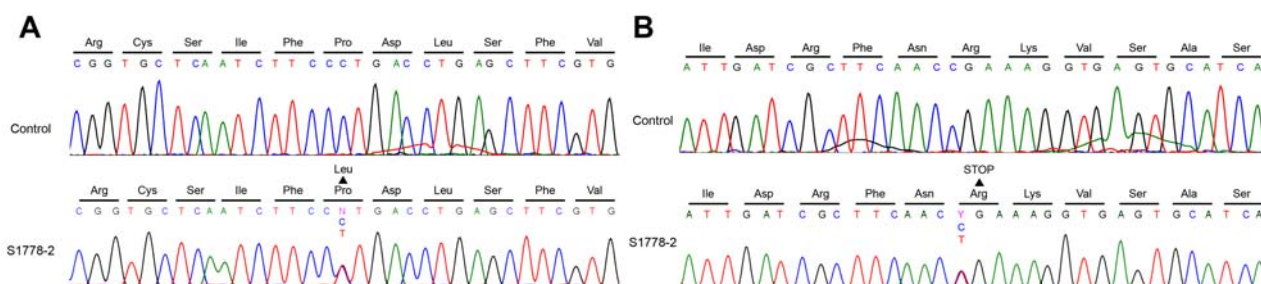


Fig. 15. Electroferogramas correspondientes a las mutaciones en el gen *OTOG* detectadas en la familia S1778. A. Electroferograma del exón 37 en el que se muestra la mutación c.6347C>T (p.Pro2116Leu). B. Electroferograma del exón 38 en el que se muestra la mutación c.6559C>T (p.Arg2187*).

Se encontraron además los siguientes polimorfismos no patogénicos ya descritos en las bases de datos c.953C>A (p.Ala318Asp), c.1123A>T (p.Thr375Ser), c.2376G>A (p.Pro792Pro), c.2755G>A

(p.Ala919Thr), c.3224G>A (p.Arg1075Gln), c.4123G>C (p.Ala1375Pro), c.2940C>T (p.Pro1647Leu), c.5840C>T (p.Thr1947Met), c.7681C>T (p.Leu2561Leu) y c.8249G>A (p.Arg2750Gln).

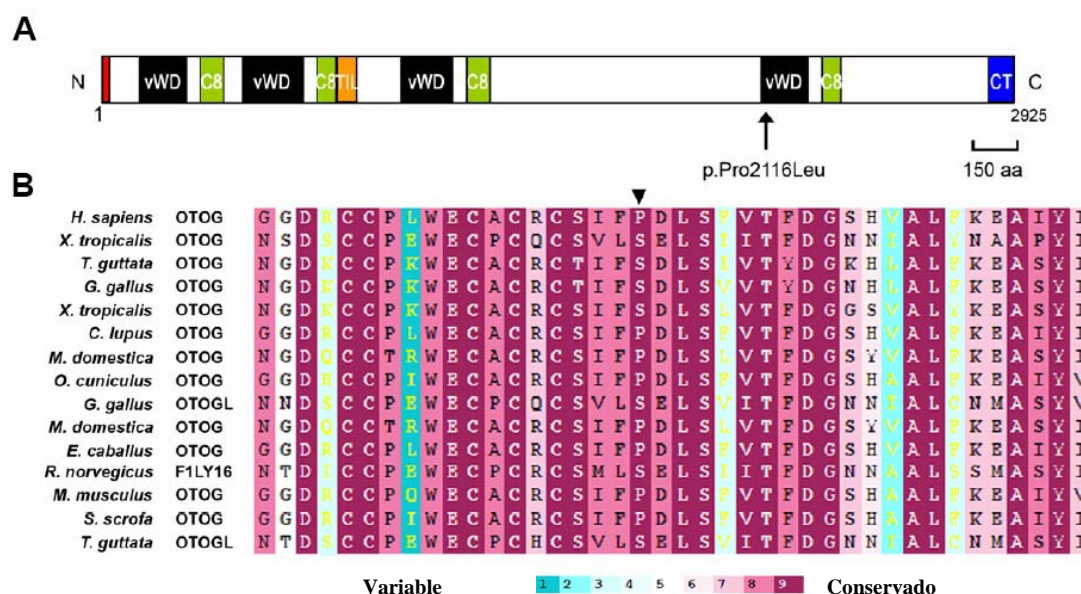


Fig. 16. A. Esquema de la estructura en dominios de la proteína otogelina humana. En rojo se representa el péptido señal N-terminal. Las cajas negras representan los cuatro dominios von Willebrand tipo D (vWFD). En verde, los dominios C8 constituidos por 8 cisteínas altamente conservadas. Este tipo de dominio es típico de proteínas con dominios von Willebrand tipo D, α -tectorina, zonadhesina y mucina. En naranja se representa el dominio TIL formado por diez residuos de cisteína que forman entre sí cinco puentes disulfuro. Este dominio es típico de inhibidores de proteasas así como de muchas proteínas extracelulares. En azul se representa el dominio C-terminal (CT). La posición del residuo afectado por la mutación p.Pro2116Leu, situado en el cuarto dominio von Willebrand tipo D, está indicada por una flecha. **B.** Comparación de secuencia de las proteínas otogelinas y sus parálogos “otogelina-like” de diferentes especies utilizando el programa informático ConSeq. El residuo Pro2116 que se encuentra alterado en todos los individuos afectados de la familia S1778 está indicado con una flecha y está altamente conservado (grado de conservación de 8).

3.3. Detección de mutaciones en el gen *Otog* de ratón

El estudio del gen *OTOG* humano como gen candidato a ser gen responsable de sordera en humanos fue sugerido por la expresión del gen ortólogo de ratón en oído interno, así como por la existencia de dos modelos murinos publicados que portan mutaciones en *Otog*: los ratones *twister* (Lane, 1981) y *Otog*^{tm/Prs} (Simmler *et al.*, 2000). En ambos casos se trata de mutaciones recesivas, una aparecida espontáneamente (*twister*) y la otra construida por recombinación homóloga (*Otog*^{tm/Prs}). Los homocigotos mutantes de ambas estirpes tienen un fenotipo muy similar, con claras alteraciones del equilibrio (disfunción vestibular) y sordera.

Posteriormente, los investigadores de The Jackson Laboratory identificaron 4 nuevos mutantes espontáneos con características fenotípicas muy similares a las de los ratones *twister* y *Otog*^{tm/Prs}, denominados *Otog*^{tw-2J/Otog}^{tw-2J} (C57BR/cdJ-*Otog*^{tw-2J}/Kjn), *Otog*^{tw-3J/Otog}^{tw-3J} (B6.D2-*Otog*^{tw-3J}/Kjn), *Otog*^{tw-4J/Otog}^{tw-4J} (C57BL/6J-*Otog*^{tw-4J}/Kjn), *Otog*^{tw-5J/Otog}^{tw-5J} (C57BL/6J-*Otog*^{tw-5J}/Kjn) (Peck *et al.*, 2010). Las pruebas de complementación demostraron que dichas mutaciones eran alélicas a la mutación

Otog^{tm/Prs}. Sin embargo, no se intentó identificar qué mutaciones portaban estas estirpes ni se publicaron los datos detallados de su fenotipo audiovestibular.

El gen *Otog* de ratón tiene 56 exones, su ARNm tiene una longitud de 10043pb (NM_013624.2) y codifica una proteína de 2911 aminoácidos. La secuenciación de los 56 exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *Otog* reveló que la mutación responsable de la sordera y los problemas vestibulares de la estirpe *Otog*^{tw-2J}/*Otog*^{tw-2J} es c.1952+2T>A en homocigosis, que afecta al sitio donador de *splicing* del exón 17. La mutación del gen *Otog* de la estirpe *Otog*^{tw-3J}/*Otog*^{tw-3J} es c.509G>T (p.Glu170*) en homocigosis y se localiza en el exón 6. La mutación de las estirpes *Otog*^{tw-4J}/*Otog*^{tw-4J} y *Otog*^{tw-5J}/*Otog*^{tw-5J} es en ambos casos la misma, c.3454C>T (p.Arg1152*), en homocigosis, y se localiza en el exón 29. Las estirpes *Otog*^{tw-4J}/*Otog*^{tw-4J} y *Otog*^{tw-5J}/*Otog*^{tw-5J} son coisogénicas, habiendo surgido la mutación en ambos casos en el fondo genético C57BL/6J. Por ello, cuando se identificaron ambos mutantes espontáneos se hipotetizó que la variante en el gen *Otog* que portaran podría ser una misma mutación recurrente (Peck *et al.*, 2010), como efectivamente ha confirmado nuestro estudio (Fig. 17).

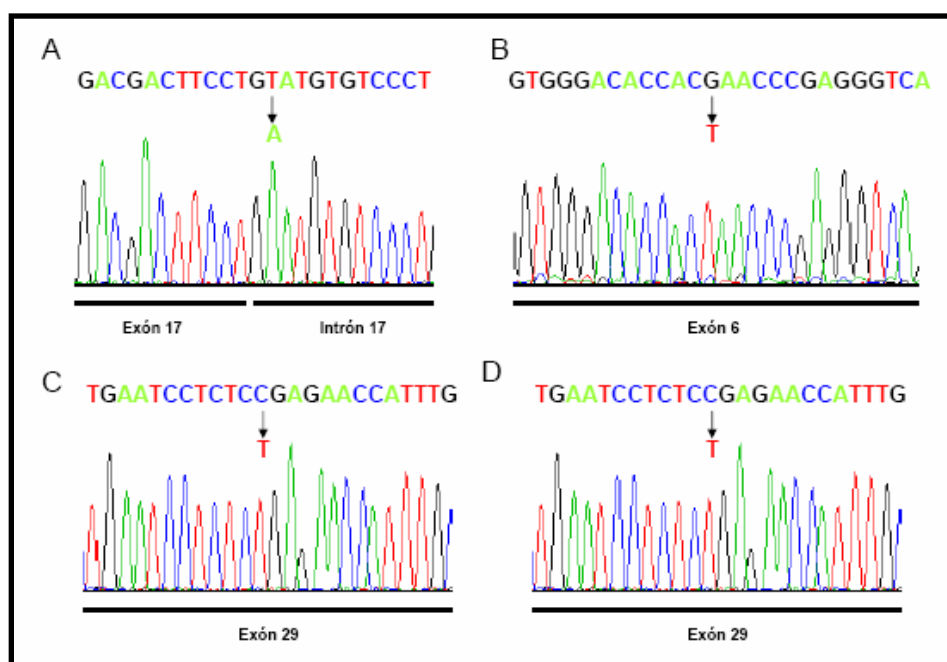


Fig. 17. Electroferogramas de diferentes exones del gen *Otog* en mostrando las mutaciones causantes de sordera en las distintas estirpes de ratón *twister*. **A.** Electroferograma de la estirpe *Otog*^{tw-2J}/*Otog*^{tw-2J} en el que se muestra la mutación en homocigosis c.1952+2T>A, que afecta al sitio donador de *splicing* del exón 17. **B.** Electroferograma de la estirpe *Otog*^{tw-3J}/*Otog*^{tw-3J} en el que se muestra la mutación en homocigosis c.509G>T (p.Glu170*) en el exón 6. **C.** Electroferograma de la estirpe *Otog*^{tw-4J}/*Otog*^{tw-4J} en el que se muestra la mutación en homocigosis c.3454C>T (p.Arg1152*) en el exón 29. **D.** Electroferograma de la estirpe *Otog*^{tw-5J}/*Otog*^{tw-5J} que porta en homocigosis la misma mutación que la estirpe *Otog*^{tw-4J}/*Otog*^{tw-4J}.

4. Gen *STRC*: locus DFNB16

Para este estudio analizamos 277 casos de nuestra colección con sordera no síndrómica de herencia autosómica recesiva. De ellos, 131 son casos sin antecedentes familiares de sordera (casos esporádicos), seleccionados por presentar sordera moderada, y 146 son casos familiares. 91 de estos casos familiares presentan sordera moderada.

4.1. Análisis de haplotipos

Se realizó sobre 55 familias de nuestra colección con sordera no síndrómica de herencia autosómica recesiva. Para el análisis de haplotipos utilizamos cuatro marcadores microsatélites ligados al locus DFNB16 en el orden: cen-D15S780-D15S778-*STRC*-D15S1039-D15S126-tel. El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento al locus DFNB16 en 20 familias y exclusión en 35. De las 20 familias con compatibilidad de ligamiento, 8 no pudieron ser analizadas por imposibilidad de obtener nueva muestra de ADN.

4.2. Detección de deleciones en la región que contiene el gen *STRC*

Por la estructura de la región en la que se localiza el gen *STRC*, con dos segmentos duplicados en tándem, se espera que aparezcan con frecuencia deleciones que afecten total o parcialmente al gen, como he indicado en la Introducción. Cabe esperar que la mayoría de las deleciones que afecten al marcador D15S784, situado en la repetición proximal junto al gen *STRC*, se asocien con deleciones en el gen *STRC* (Fig. 18). Para determinar si existían deleciones en homocigosis del marcador D15S784 en las familias con herencia autosómica recesiva con compatibilidad de ligamiento con el locus DFNB16, se diseñó una PCR múltiplex (Fig. 19) en la que se amplifican simultáneamente el marcador D15S784 (168 pb) y el exón 4 del gen *GJB6* (333 pb) como control interno de amplificación. De las 20 familias compatibles con ligamiento al gen *STRC*, los individuos afectados de las familias S691, S1178, S1302 y S1735 no amplificaron el marcador D15S784, sugiriendo deleción de ambos alelos del gen *STRC* (Fig. 20).

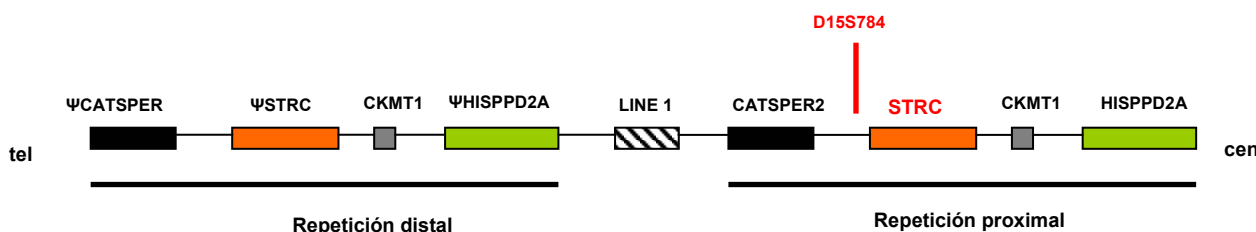


Fig. 18. Visión extendida de la región duplicada del cromosoma 15q15 en la que se localiza el gen *STRC* (telómero- izquierda, centrómero-derecha). La posición del marcador D15S784, que es único, está representada en rojo. La secuencia Line1 que separa las dos duplicaciones en tándem está representada por una caja a rayas. Los pseudogenes están representados por el símbolo Ψ . Las dos copias del gen *CKMT1* son funcionales.

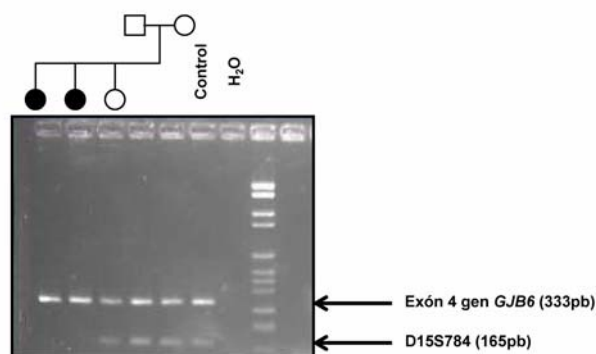


Fig. 19. PCR múltiplex del marcador de copia única D15S784 (banda de 165pb) y el exón 4 del gen *GJB6*, resuelta en un gel de agarosa al 1,5%, en la familia S691, compatible con ligamiento al locus DFNB16. El marcador D15S784 no amplifica en los individuos afectados mientras que sí lo hace el exón 4 del gen *GJB6*. Los individuos normoyentes amplifican tanto el marcador D15S784 como el exón 4 del gen *GJB6*. El marcador de peso molecular es el marcador VI de Roche.

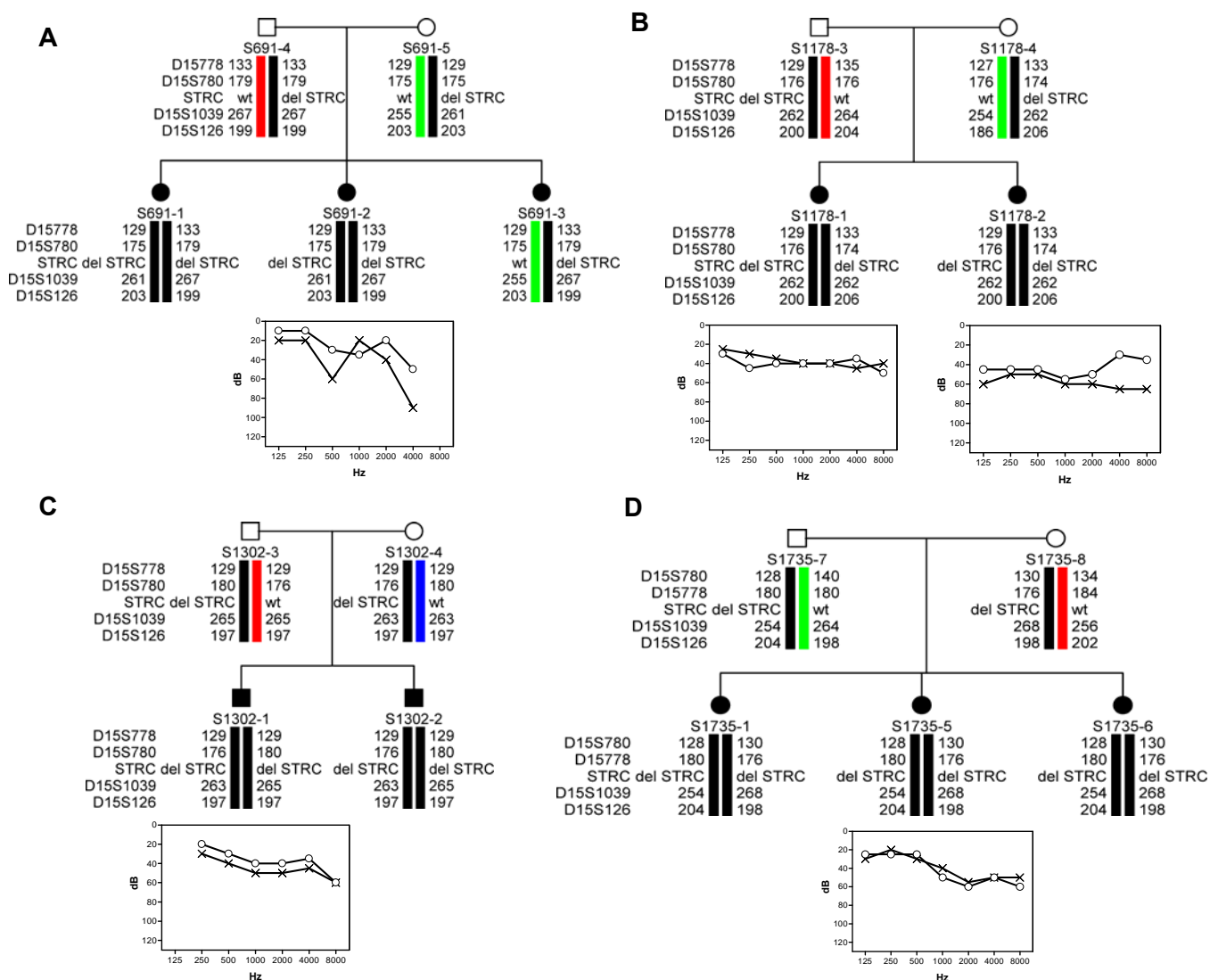


Fig. 20. Análisis de haplotipos de las familias en las que obtuvimos compatibilidad de ligamiento al locus DFNB16 y que presentaban delección en homocigosis del marcador D15S784. **A.** Análisis de haplotipos de la familia S691. **B.** Análisis de haplotipos de la familia S1178. **C.** Análisis de haplotipos de la familia S1302. **D.** Análisis de haplotipos de la familia S1735. Se muestra audiometría bajo los individuos afectados de los que disponíamos historia clínica.

Este mismo test se llevó a cabo en 91 casos familiares de la colección, seleccionados por presentar sordera moderada, típica de los pacientes con hipoacusia DFNB16. Los individuos afectados de la familia S1831 no amplificaron el marcador D15S784, sugiriendo también delección de ambos alelos del gen *STRC*.

Por otro lado, se seleccionaron 131 casos esporádicos (sin antecedentes familiares de sordera) de la colección que presentaban sordera moderada y se les sometió a este mismo test. Los individuos afectados E073-1, E276-1, y E835-1 no amplificaron el marcador D15S784, sugiriendo también la delección de ambos alelos del gen *STRC*.

En aquellos casos en los que no se obtuvo amplificación del marcador D15S784 y sí del control interno, realizamos una segunda PCR con cebadores alternativos para verificar que la ausencia de amplificación del marcador no se debía a la presencia de polimorfismos en las secuencias de reconocimiento de los cebadores. Para esta segunda reacción no se obtuvo amplificación del marcador D15S784 para ningún individuo afecto de las familias S691, S1178, S1302, S1735 y S1831 ni tampoco para los casos esporádicos E073-1, E276-1 y E835-1.

4.3. Estrategias complementarias para la confirmación de delecciones de ambos alelos del gen *STRC*

El marcador D15S784 es un marcador de copia única que se localiza muy próximo al gen *STRC*, y delecciones del mismo se asocian generalmente con delecciones en el gen *STRC* (Zhang *et al.*, 2007). Sin embargo, este marcador está fuera del gen y por tanto queríamos utilizar otras pruebas para confirmar que efectivamente la ausencia de amplificación del marcador D15S784 implica delecciones que verdaderamente están afectando al gen *STRC*. Pretendíamos evitar la existencia en nuestro estudio de falsos positivos (individuos con delección en homocigosis del marcador D15S784 que en realidad no tienen delecciones de los dos alelos del gen *STRC*) y falsos negativos (individuos sin delección en homocigosis del marcador D15S784 que en realidad presentan delecciones de ambos alelos del gen *STRC*). Esta confirmación la llevamos a cabo diseñando una batería de pruebas complementarias que sirvieran para la detección de delecciones en ambos alelos del gen *STRC*, teniendo en cuenta la elevada homología de secuencia entre el gen *STRC* y el *ΨSTRC* y, por tanto, la dificultad que implica el diseño de cebadores específicos del gen.

Ante estas premisas el primer paso que dimos antes de iniciar el estudio este gen fue realizar una comparación de secuencias entre gen *STRC* y *ΨSTRC* y determinar en qué puntos se localizaban los SNPs que distinguían a ambos (Fig. 21). Una vez identificadas las diferencias procedimos al diseño de las citadas estrategias complementarias de detección de delecciones de los dos alelos del gen *STRC*.

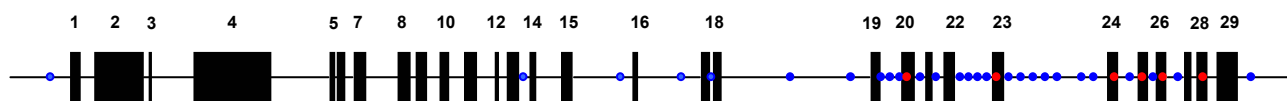


Fig. 21. Diagrama resumen del resultado del análisis de la comparación de las secuencias de gen *STRC* y el Ψ *STRC*. Los círculos de color azul representan al menos un SNP intrónico de diferencia entre gen *STRC* y el Ψ *STRC*. Los círculos de color rojo representan al menos un SNP exónico de diferencia entre gen *STRC* y el Ψ *STRC*. Como puede apreciarse, los primeros 19 exones de gen *STRC* y Ψ *STRC* son idénticos. En el exón 20 se localiza el codón stop que diferencia a gen *STRC* de Ψ *STRC*.

Para la confirmación por otros métodos de delecciones que afecten a ambos alelos del gen *STRC* empleamos tres estrategias complementarias: tipado fluorescente de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y PCRs de largo recorrido específicas del gen.

4.3.1. Tipado fluorescente de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

La presencia de gen *STRC* fue determinada por la detección de productos PCR marcados con un fluorocromo, digeridos por un enzima de restricción y separados por electroforesis capilar (del Castillo *et al.*, 2003). Se diseñaron dos parejas de cebadores para amplificar los exones 23 y 29, respectivamente, tanto del gen como del Ψ *STRC*. En estos dos exones existe una variación SNP entre gen y Ψ *STRC* que crea un polimorfismo de tipo RFLP; se trata en ambos casos de una diana *Bst*NI presente en el gen que no lo está en el pseudogén. Cada amplicón contiene además otra diana *Bst*NI, presente tanto en *STRC* como en el Ψ *STRC* que utilizamos como control para verificar la digestión total por parte del enzima (Fig. 22).

Los individuos homocigotos para la delección del marcador D15S784 en las familias S691, S1178, S1302, S1735 y S1831 así como de los casos esporádicos E073-1, E276-1 y E835-1 sólo presentan los picos correspondientes a los exones 23 y 29 de pseudogén, mientras que los padres y hermanos normoyentes (que en PCR múltiplex amplificaban el marcador D15S784) presentan los picos de gen *STRC* y Ψ *STRC* (Fig. 22B). Es preciso indicar que esta prueba tiene solamente valor cualitativo, puesto que refiere el número de copias del gen al de Ψ *STRC*, que en sí mismo es desconocido.

4.3.2. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

El análisis de comparación de secuencia entre gen *STRC* y Ψ *STRC* mostró que 28 nucleótidos antes del inicio del exón 23, el gen *STRC* presenta una secuencia de 31 nucleótidos que no tiene Ψ *STRC*. Esta diferencia permitió diseñar una pareja de cebadores que amplificaran gen *STRC* y Ψ *STRC* simultáneamente para después resolver en un gel de agarosa los productos de amplificación correspondientes a gen *STRC* (228 pb) y Ψ *STRC* (197pb) y confirmar por otra vía las delecciones de los dos alelos del gen *STRC* (Fig. 23).

Los individuos homocigotos para la delección del marcador D15S784 de las familias S691, S1178, S1302, S1735 y S1831 así como de los casos esporádicos E073-1, E276-1 y E835-1 sólo amplifican el fragmento correspondiente al Ψ STRC.

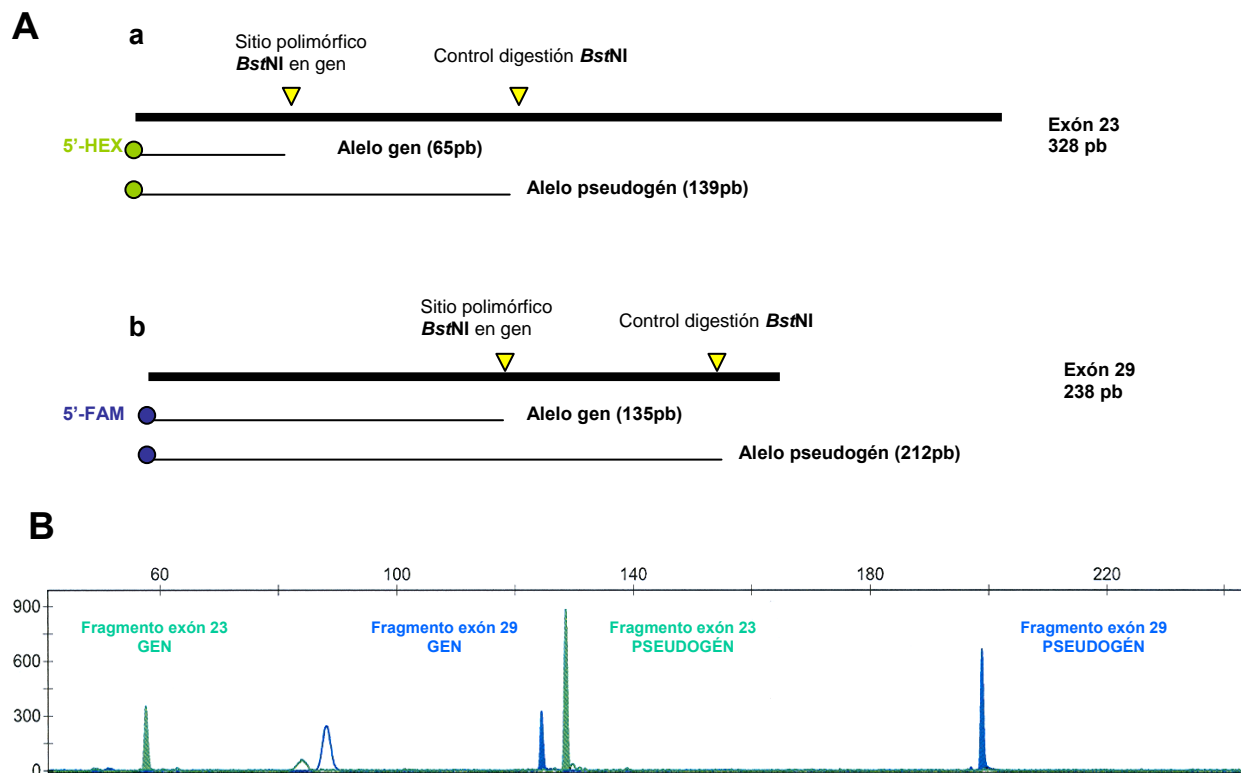


Fig. 22. A. Diseño del test RFLP fluorescente de los exones 23 y 29 de gen y Ψ STRC. **a.** Diseño RFLP del exón 23. El cebador directo está marcado en 5'-HEX. El fragmento presenta dos dianas *Bst*NI. Una de las dianas es un sitio polimórfico localizado en la posición 65 del amplicón y es exclusiva del gen *STRC*. La otra diana se localiza en la posición 139 del amplicón tanto de gen como de Ψ STRC y es utilizada como control de digestión total por parte del enzima. **b.** Diseño RFLP del exón 29. El cebador directo está marcado en 5'-FAM. El fragmento presenta dos dianas *Bst*NI. Una de ellas es un sitio polimórfico localizado en la posición 135 del amplicón que es exclusivo del gen *STRC*. La otra diana se localiza en la posición 212 del amplicón tanto de gen como de Ψ STRC y es utilizada como control de digestión total por parte del enzima. **B.** Electroforesis capilar de los productos de digestión del individuo S691-4 con presencia de gen *STRC* y Ψ STRC.

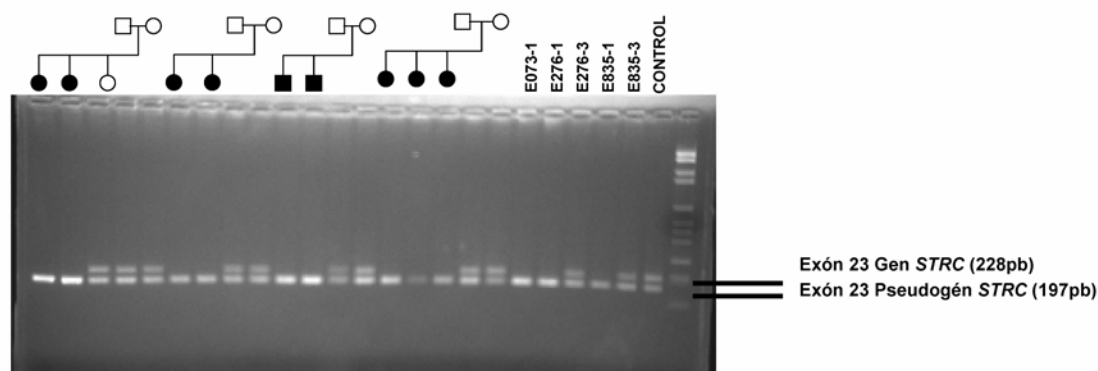


Fig. 23. AFLP del exón 23 *STRC* y Ψ STRC resuelto en un gel de agarosa al 2%. Los primeros 19 pocillos representan a las familias compatibles con ligamiento al locus DFNB16 S691, S1178, S1302 y S1735. Los últimos pocillos corresponden a individuos afectados de casos esporádicos con delección en homocigosis del marcador D15S784 y los progenitores de los que disponíamos (E276-3 y E835-3). Como puede apreciarse en la fotografía sólo hay amplificación del gen (fragmento de 228pb) en los individuos normoyentes. En los individuos afectados sólo amplifica el fragmento del exón 23 correspondiente al Ψ STRC (197pb).

4.3.3. PCRs de largo recorrido específicas del gen *STRC*

Hasta ahora habíamos confirmado la existencia de individuos afectados con sordera moderada con deleciones de ambos alelos del gen *STRC*, bien identificando deleciones en homocigosis del marcador D15S784 que se encuentra fuera de la secuencia codificante del gen *STRC*, o bien identificando deleciones en zonas discretas del gen (RFLP de los exones 23 y 29; AFLP del exón 23).

Sin embargo, queríamos verificar si la extensión de las deleciones detectadas en nuestras familias afectaba a la totalidad del gen *STRC*. Una vez identificadas las familias con deleción en homocigosis del marcador D15S784, cuyo test RFLP sólo detectaba el amplificado correspondiente al Ψ *STRC* y que en el test AFLP sólo se producía amplificación del exón 23 con el tamaño correspondiente al pseudogén, se procedió al diseño de cebadores localizados sobre SNPs que diferencian el gen *STRC* del Ψ *STRC* con el objetivo de amplificar específicamente el gen.

Se diseñaron dos PCRs de largo recorrido solapantes, una que amplifica específicamente el gen desde antes del comienzo del exón 1 hasta el intrón 22 y otra, que amplifica específicamente el gen desde el intrón 18 hasta después del final del exón 29. El diseño de dos PCRs solapantes tenía como objetivo lograr amplificar dos veces de manera independiente el exón 20 del gen *STRC* y comprobar que en ninguno de los dos amplicones obtenidos se detectaba el codón de terminación correspondiente al Ψ *STRC* (Fig. 24).

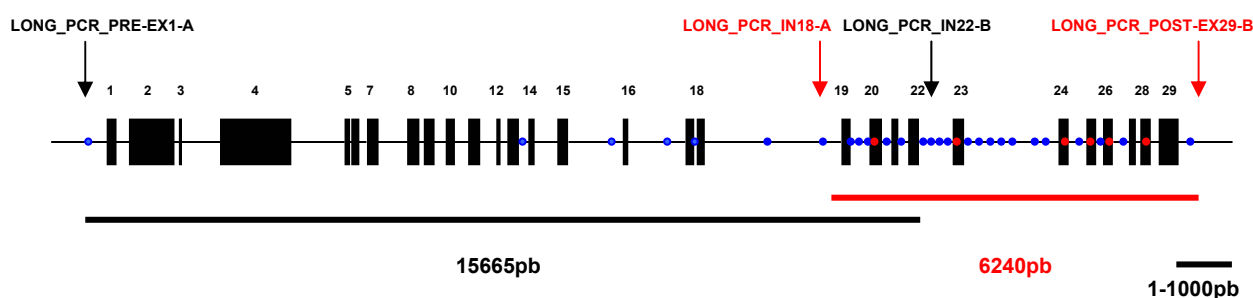


Fig. 24. Esquema de la estrategia de amplificación específica del gen *STRC*. En el diagrama se muestra la extensión de las dos PCRs de largo recorrido diseñadas con el objetivo de cubrir toda la longitud del gen *STRC* (la barra negra indica la extensión del amplicón de 16kb y la barra roja la del amplicón de 6kb). Los cebadores se sitúan sobre SNPs (círculos azules, SNPs intrónicos; círculos rojos, SNPs exónicos) que diferencian gen de Ψ *STRC* y su localización está indicada con flechas negras (amplicón 16kb) y rojas (amplicón de 6kb).

Tal y como esperábamos, la presencia en todos los individuos afectados testados de deleciones de ambos alelos del marcador D15S784, y de ambos alelos de los exones 23 y 29, verificada por los ensayos RFLP y AFLP, se corresponde con la deleción de ambos alelos del gen *STRC* confirmada por la ausencia de amplificación en las PCRs de largo recorrido (Fig. 25).

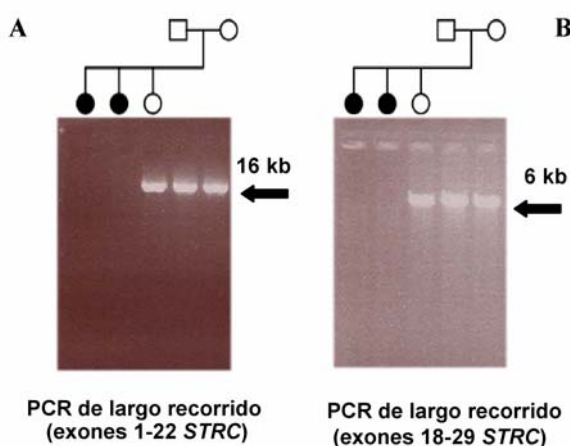


Fig. 25. **A.** PCR de largo recorrido específica del gen *STRC* en la familia S691 que abarca desde el exón 1 hasta el intrón 22 resuelta en un gel de agarosa al 0,6%. **B.** PCR de largo recorrido específica del gen *STRC* que abarca desde el intrón 18 hasta después del exón 29 resuelta en un gel de agarosa al 0,8%. En ambos casos sólo se obtiene amplificado en los individuos normoyentes de la familia S691.

4.4. Detección de deleciones en heterocigosis en el gen *STRC*: PCR cuantitativa (qPCR)

La presencia de deleciones de ambos alelos del gen *STRC* implica la existencia de individuos portadores de una deleción en heterocigosis. Para cuantificar el número de copias del gen *STRC* y detectar individuos con deleciones en heterocigosis diseñamos una serie de sondas localizadas en distintos puntos del gen *STRC*, colocando los cebadores sobre SNPs que diferencian *STRC* de Ψ *STRC*. Se diseñaron cuatro sondas. La primera de ellas se ubicó en una zona de copia única situada a 600 nucleótidos del extremo 5' del exón 1 del gen *STRC*, colocando los cebadores sobre SNPs que diferencian al gen del Ψ *STRC*. Para favorecer aún más la amplificación del gen respecto del pseudogén, se añadieron mutaciones sobre los cebadores. El trucaje de la sonda se realizó siguiendo los principios de apareamientos incorrectos (*mismatches*) de las bases nucleotídicas. Las estructuras cristalinas de oligonucleótidos que contienen apareamientos incorrectos G-T, A-C y G-A indican que éstos se acomodan perfectamente en las hélices B de DNA, mientras que otros apareamientos no pueden acomodarse (revisado en Kornberg & Baker, 1991). La segunda, tercera y cuarta sondas se ubicaron en el intrón 19, el intrón 22 y el exón 26 respectivamente sobre SNPs que diferencian al gen del Ψ *STRC* (Fig. 26).

Probamos las cuatro sondas con muestras de los padres de los individuos afectados con deleción de ambos alelos del gen *STRC* y de un individuo control normoyente. Para las sondas del intrón 19 y exón 26 las curvas de disociación a la temperatura de extensión (durante el paso de medición de la fluorescencia) indicaban la presencia de varios productos PCR con lo que pudimos deducir que dichas sondas no eran específicas del gen *STRC* sino que probablemente estaban amplificando tanto gen como Ψ *STRC*.

La sonda del intrón 22 fue diseñada sobre la zona de 31 nucleótidos del intrón 22 existentes en la secuencia del gen *STRC* y no presentes en la secuencia del Ψ *STRC*. Sin embargo, además de no obtener un

buen rendimiento durante la qPCR (la cantidad de producto de amplificación era insuficiente y por tanto la medida de fluorescencia era muy baja), las curvas de disociación a la temperatura de extensión tampoco reflejaban la existencia de un único producto de amplificación.

Sólo la sonda situada 600 nucleótidos por delante del exón 1 (F1.2 V2) es específica del gen *STRC* gracias a las mutaciones introducidas sobre los cebadores para favorecer la amplificación del gen respecto del Ψ *STRC*. Por este motivo decidimos utilizar exclusivamente la sonda F1.2 V2 y descartar las otras tres. La incorporación de mutaciones sobre la secuencia de los cebadores de las sondas del intrón 19 y del exón 26 fue imposible, y la mejora de la qPCR para la sonda del intrón 22 también lo fue.

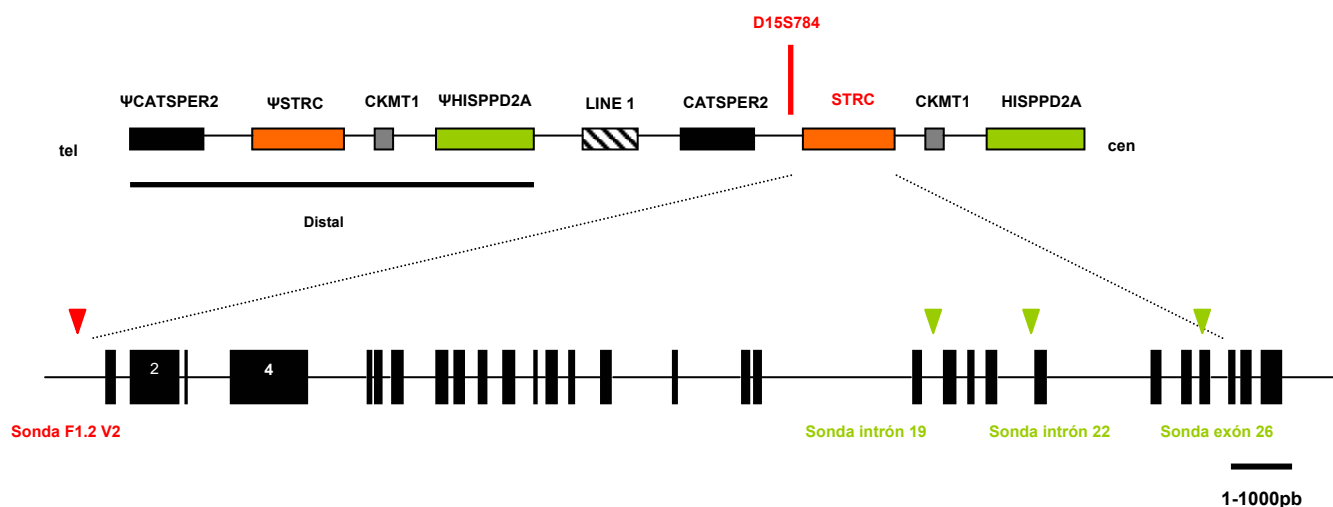


Fig. 26. Visión extendida del gen *STRC*. En el diagrama se puede observar la localización de las sondas diseñadas para la qPCR. En verde, las sondas del intrón 19, intrón 22 y exón 26 que finalmente no fueron utilizadas para el estudio ya que no eran específicas de gen *STRC*. En rojo, la sonda F1.2 V2 que gracias al trucaje especial de los cebadores, es específica de gen *STRC* y pudo por tanto ser utilizada para la detección de individuos heterocigotos para deleciones en el gen *STRC*.

Para verificar la segregación de las deleciones de ambos alelos del gen *STRC*, los primeros individuos analizados por qPCR fueron los padres de los casos familiares, cuyos hijos afectados no amplificaban la PCR de largo recorrido específica del gen *STRC*. La cantidad relativa (número de copias) del gen *STRC* se calcula en base al método de Pfaffl (2001). Los resultados de la cantidad relativa o proporción de la sonda F1.2 V2 en relación con la sonda del gen *ALB* (número de copias conocido) y en relación con un individuo control normoyente se muestran en la Figura 27.

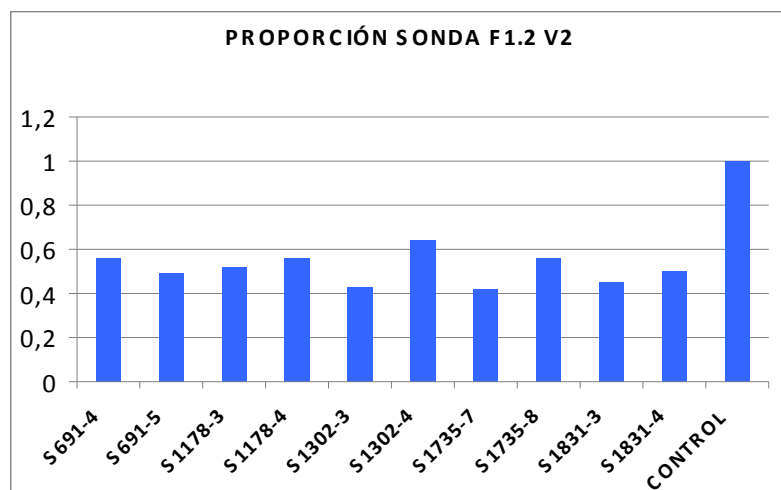


Fig. 27. Valores de la proporción de la sonda F1.2 V2 correspondientes a los padres de los casos familiares compatibles con ligamiento con el gen *STRC* y cuyos hijos afectados presentan delección de ambos alelos del gen *STRC* comprobada por las dos PCRs solapantes de largo recorrido, AFLP y RFLP. La proporción de la sonda en todos los casos ronda el valor 0.5 lo que indica la presencia de la mitad de carga genética que en el individuo control normoyente. Esto significa que estos individuos presentan una única copia del gen *STRC*.

A continuación analizamos por qPCR a los padres de los individuos esporádicos con delección de ambos alelos del gen *STRC* (no amplifican las PCRs de largo recorrido). Los resultados se muestran en la Figura 28.

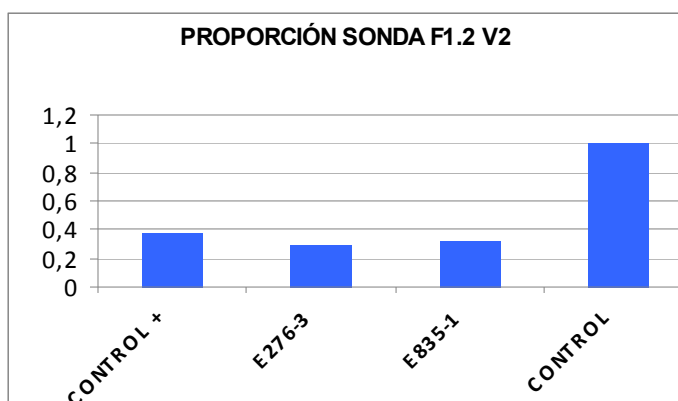


Fig. 28. Valores de la proporción de la sonda F1.2 V2 correspondientes a los padres de los individuos afectados esporádicos con delección en homocigosis del gen *STRC* comprobada por las dos PCRs de largo recorrido específicas del gen *STRC*. En este caso también incluimos al individuo S691-4, control positivo heterocigoto para las delecciones del gen *STRC*.

También analizamos por qPCR al resto de individuos afectados de las familias con compatibilidad de ligamiento al locus DFNB16 en los que no habíamos obtenido delección en homocigosis del marcador D15S784 y en los que en los test de RFLP y AFLP se detectaba la presencia de gen y Ψ *STRC*. El objetivo era identificar individuos portadores de delecciones en heterocigosis de un alelo del gen *STRC*. Los resultados de los promedios para la sonda F1.2 V2 se muestran en la Figura 29.

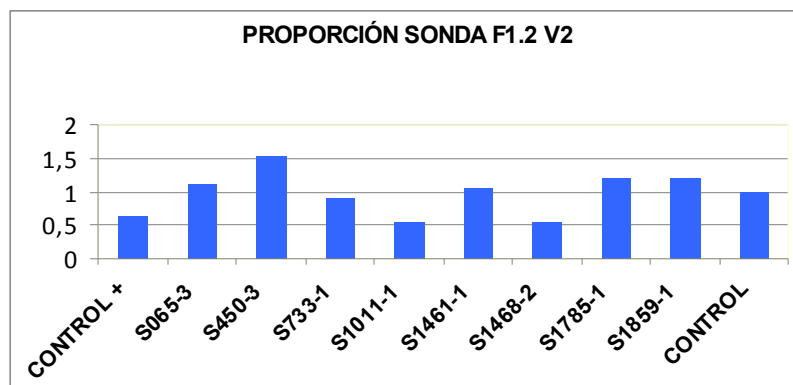


Fig. 29. Valores de la proporción de la sonda F1.2 V2 para el resto de individuos afectados de las familias compatibles con ligamiento con el gen *STRC* sin delección del gen. Se obtienen dos individuos con valores cercanos a 0.5 que son S1011-1 (proporción = 0.55) y S1468-2 (proporción = 0.54). Estos resultados indican delección en heterocigosis del gen *STRC*. Para el individuo S450-3 se obtiene una proporción igual a 1.51 lo que indica que este individuo presenta tres copias del gen *STRC*.

4. 5. Detección de mutaciones puntuales en el gen *STRC*

El diseño de las dos PCRs de largo recorrido solapantes y específicas del gen *STRC* utilizando cebadores localizados sobre SNPs que diferencian el gen *STRC* del Ψ *STRC* nos permitió amplificar específicamente el gen *STRC* y buscar sobre él mutaciones puntuales. Diseñamos cebadores de secuencia para amplificar exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *STRC* y utilizamos como molde los productos de amplificación de las dos PCRs de largo recorrido.

Empezamos secuenciando a los individuos S1011-1 y S1468-2 que son compatibles con ligamiento al locus DFNB16, que presentan sordera moderada y que según los resultados de análisis de la qPCR han perdido uno de los alelos del gen *STRC* (proporción en qPCR para la sonda F1.2 V2 próximo a 0.5). No encontramos ninguna mutación puntual en el otro alelo.

También secuenciamos a los individuos compatibles con ligamiento S065-3 y S733-1. En el individuo S065-3 no encontramos ningún cambio y en el individuo S733-1 detectamos en heterocigosis los siguientes polimorfismos no patogénicos ya descritos en las bases de datos: c.179T>C (p.Phe60Ser), c.3893A>G (p.His1299Pro) y c.4842C>T (p.Phe1314Phe).

La PCR de largo recorrido es una técnica muy sensible a la fragmentación del ADN genómico. La calidad de las muestras de ADN de los individuos S450-3, S1461-1, S1785-1 y S1859-1 no era excelente y no se pudo conseguir nueva muestra de sangre de estos pacientes al término de esta tesis de modo que no se les pudo secuenciar el gen *STRC*.

La familia S1831 es uno de los casos de nuestra colección de familias con hipoacusia de herencia autosómica recesiva con sordera moderada en el que detectamos la delección en homocigosis del marcador D15S784 a través de la PCR múltiplex. La familia S1831 (Fig. 30) es el único caso de todos los estudiados en el que uno de los progenitores (la madre) también presenta sordera moderada. En este caso los hijos presentan delección de ambos alelos del gen *STRC* y tanto la madre como el padre portan una delección en heterocigosis del gen *STRC* (proporción en qPCR de 0.5 y 0.45 respectivamente). Para averiguar si la

hipoacusia de la madre (S1831-4) era de tipo DFNB16, secuenciamos los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen *STRC*. No encontramos ningún cambio.

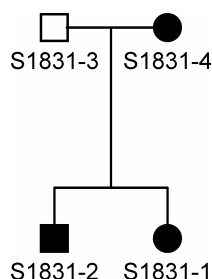


Fig. 30. Árbol genealógico de la familia con sordera moderada S1831

Es importante reseñar que cuando analizamos las secuencias de los 4 individuos cuya familia presentaba compatibilidad de ligamiento con el locus DFNB16 y cuya calidad de DNA nos permitió la amplificación de 16Kb, no encontramos ningún SNP del Ψ *STRC* ni tampoco detectamos el codón de parada del exón 20 del Ψ *STRC*, con lo que estamos completamente seguros de estar obteniendo exclusivamente productos de amplificación correspondientes al gen *STRC*.

5. Gen *LOXHD1*: locus DFNB77

5.1. Análisis de haplotipos

Para este estudio analizamos 54 casos de nuestra colección con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva. Para el análisis de haplotipos utilizamos tres marcadores microsatélites ligados al locus DFNB77 en el orden: cen-D18S1143-*LOXHD1*-D18S1356-D18S1137-tel. El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento de la hipoacusia al locus DFNB77 en 15 familias y exclusión en 37. En 2 familias la informatividad de los marcadores fue insuficiente para determinar el ligamiento al locus DFNB77.

5.2. Detección de mutaciones puntuales en el gen *LOXHD1*

Procedimos a la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes de *LOXHD1* en un individuo afecto de cada una de las 17 familias en las que no se pudo excluir el ligamiento de la hipoacusia al locus DFNB77. Se encontraron los siguientes polimorfismos no deletéreos descritos en las bases de datos: c.1087G>A (p.Val363Ile), c.1207G>A (p.Ala403Thr), c.1876G>T (p.Gly626Cys), c.1894G>T (p.Gly632Cys), c.2175C>T (p.Asn725Asn), c.2473G>A (p.Val825Met), c.3269G>A (p.Arg1090Gln), c.3463A>G (p.Arg1155Gly), c.4148C>T (p.Thr1383Met), c.4714C>A (p.Arg1572Arg), c.4868A>G (p.Glu1623Gly), c.6107C>T (p.Ala2036Val), c.6398G>A (p.Arg2133His), c.1654+69C>T, c.5213+13G>A y c.4740+21G>A, todos ellos en heterocigosis.

En los individuos afectados de la familia S1649 se encontró una delección en homocigosis de 7pb no descrita anteriormente: c.3914_3920del (p.Val1306Thrfs*57) (Fig. 31A). La delección c.3914_3920del (p.Val1306Thrfs*57) genera una diana de restricción *MaeIII* en el fragmento de amplificación del exón 26 de modo que se diseñó un test para analizar 80 controles normoyentes (160 cromosomas). En ninguno de ellos se detectó la mutación (Fig. 32A).

Además, en todos los individuos afectados de la familia S1649, se encontró la mutación en homocigosis c.512-1G>A, que afecta al sitio aceptor de *splicing* del exón 5 (Fig. 31B). La mutación c.512-1G>A genera una nueva diana de restricción *DdeI* en el amplicón de PCR que incluye al exón 5 de modo que se diseñó un test para analizar 80 controles normoyentes (160 cromosomas). En ninguno de ellos se detectó la mutación. Dado que la familia S1649 pertenece a un pequeño pueblo de Ciudad Real en el que sería posible un efecto endogámico, tratamos de averiguar si podíamos detectar esta mutación en otras muestras de nuestra colección procedentes de esta provincia (42 en total). En ninguna de ellas se encontró la mutación (Fig.32B).

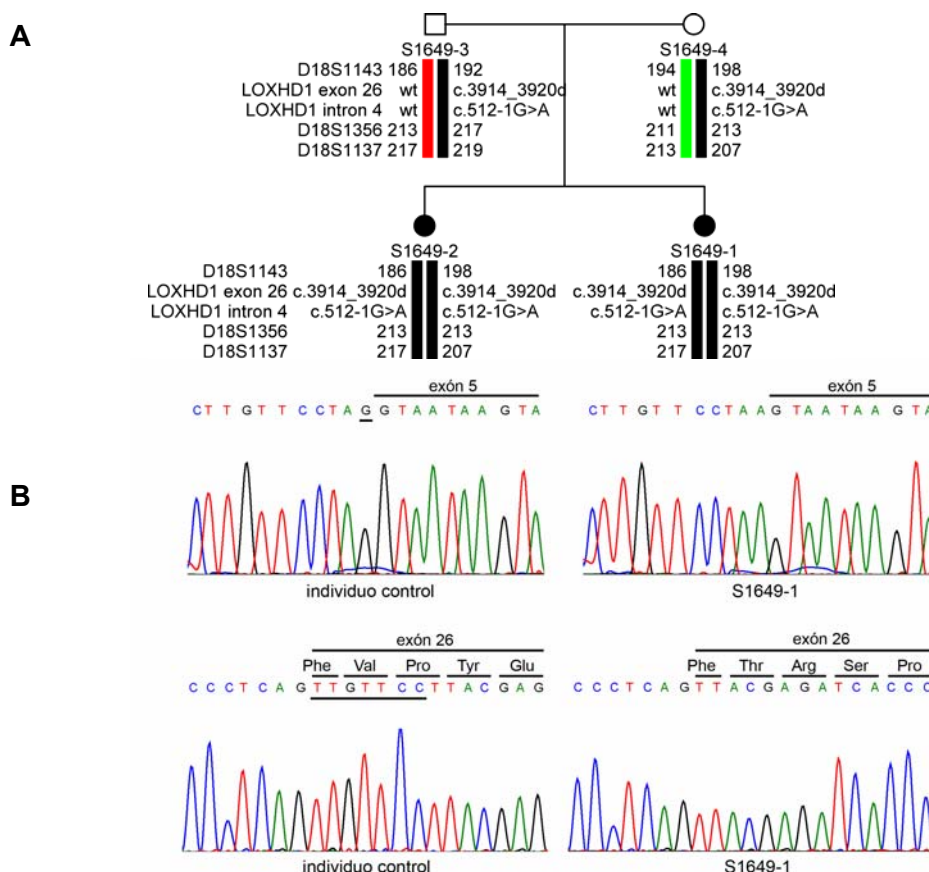


Fig. 31. A. Análisis de haplotipos de la familia S1649. B. Electroferograma parcial del individuo S1649-1 en el que se muestra la mutación c.512-G>A en homocigosis que afecta al sitio aceptor de *splicing* del exón 5. C. Electroferograma parcial del individuo S1649-1 en el que se observa la delección de 7pb en el inicio del exón 26 en homocigosis.

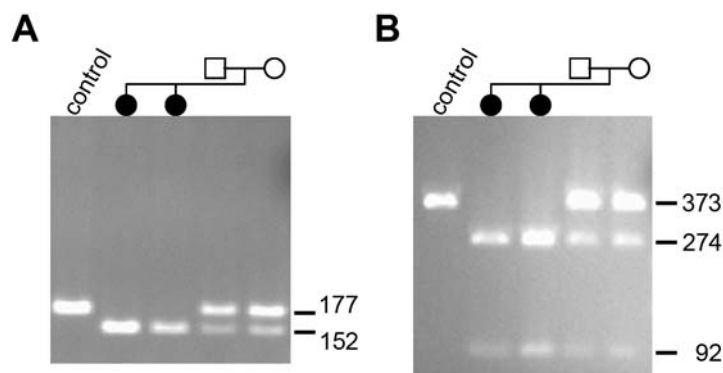


Fig. 32. **A.** Gel de agarosa al 2% en el que se se resuelve el análisis de restricción *MaeIII* en la familia S1649 para la mutación c.3914_3920del (p.Val1306Thrfs*57) en homocigosis. **B.** Gel de agarosa al 2% en el que se se resuelve el análisis de restricción *DdeI* en la familia S1649 para la mutación del sitio aceptor de splicing c.512-1G>A.

Los afectos de la familia S1649 presentan hipoacusia prelocutiva, probablemente congénita, con afectación moderada-severa de las frecuencias medias y altas (Fig. 33).

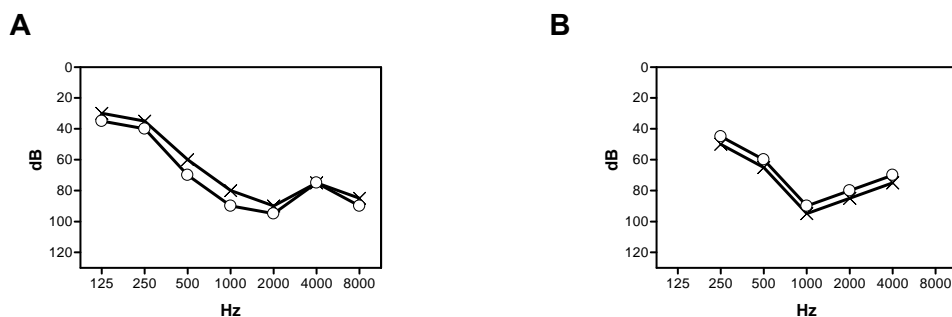


Fig. 33. Audiometrías de los individuos afectos de la familia S1649. **A.** Audiometría del individuo S1649-1 a la edad de 11 años. **B.** Audiometría del individuo S1649-2 a la edad de 7 años.

En la familia S647 (Fig. 34A), con hipoacusia moderada (Fig. 35A) que progresa hasta severa (Fig. 35B), encontramos en los individuos afectos y en uno de los progenitores el cambio en heterocigosis c.6136G>A (p.Glu2046Lys) (Fig. 34B), que no está descrito en las bases de datos, clasificado como inequívocamente deletéreo por el programa informático Polyphen2 (puntuación 1) y que no fue detectado en 50 controles normoyentes (100 cromosomas). Dicho cambio está situado en el exón 39 y afectaría al 14º dominio PLAT de la proteína Loxhd1. Dado que no encontramos la mutación del segundo alelo, no hemos podido confirmar que la sordera de esta familia sea de tipo DFNB77.

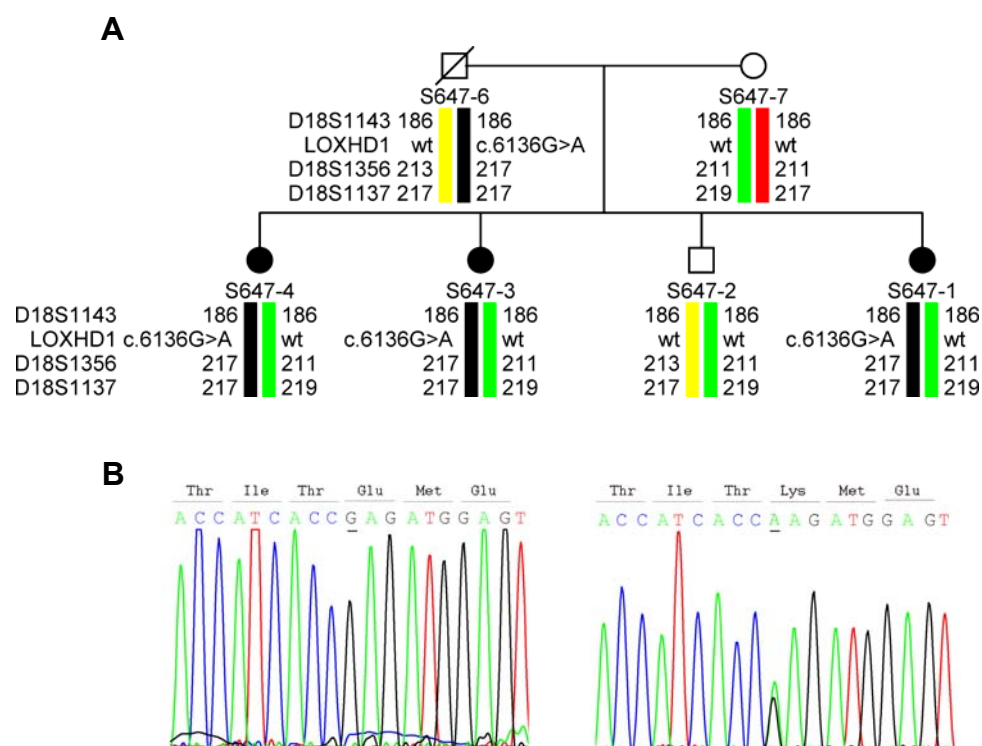


Fig. 34. A. Análisis de haplotipos de la familia S647. **B.** Electroferograma parcial del individuo afecto S647-4 en el que se muestra la secuencia silvestre a la izquierda y a la derecha la secuencia con el cambio c.6136G>A (p.Glu2046Lys) en heterocigosis.

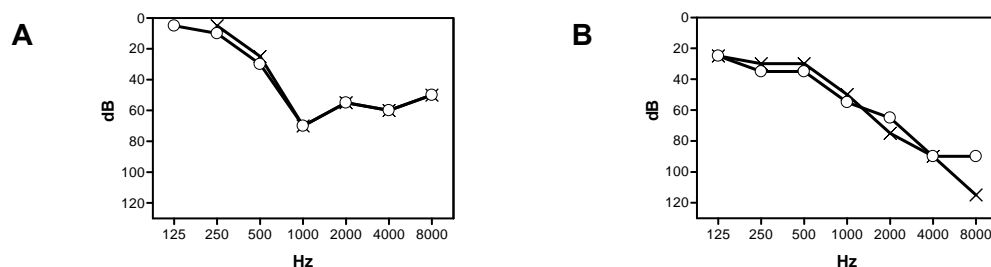


Fig. 35. Audiometrías de los individuos afectados de la familia S647. **A.** Audiometría del individuo S647-1 a los 24 años de edad. **B.** Audiometría del individuo afecto S647-4 a los 37 años de edad. De las audiometrías de los individuos afectados a diferentes edades se puede inferir la posible progresividad de la hipoacusia.

DISCUSIÓN

1. Hipoacusia tipo DFNB21: gen *TECTA*

Tradicionalmente se ha considerado que las mutaciones de sustitución de aminoácido (*missense*) en el gen *TECTA* son responsables de hipoacusia de herencia autosómica dominante (DFNA8/12) mientras que las mutaciones responsables de hipoacusia recesiva (DFNB21) afectarían a los sitios de *splicing*, causarían cambios en el marco de lectura o la aparición de codones de terminación prematuros (Mustapha *et al.*, 1999; Naz *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2007). La diferencia en el fenotipo dependiendo del tipo de mutación en el gen *TECTA* se basa a nivel de proteína en los presuntos efectos de dominancia negativa de las mutaciones *missense* descritas hasta la fecha frente a la inactividad de la misma causada por las mutaciones de herencia recesiva. De hecho, las mutaciones *TECTA* de herencia dominante afectan a aminoácidos fundamentales para determinados dominios de la α -tectorina, aunque la proteína sigue sintetizándose y el fenotipo observado se considera debido a la dominancia negativa. Sin embargo, una mutación *missense* con herencia recesiva podría provocar: (1) un incorrecto plegamiento de la α -tectorina y su consiguiente degradación, (2) una exportación defectuosa o (3) que la proteína no se incorpore correctamente a la membrana tectoria (alelos funcionales nulos).

El perfil audiométrico asociado a la hipoacusia DFNA8/12 depende del dominio y el residuo afectado (Verhoeven *et al.*, 1998; Alloisio *et al.*, 1999; Balciuniene *et al.*, 1999; Moreno-Pelayo *et al.*, 2001; Iwasaki *et al.*, 2002; Pfister *et al.*, 2004; Plantinga *et al.*, 2006; Collin *et al.*, 2008; Sagong *et al.*, 2010). Las correlaciones genotipo-fenotipo establecidas originalmente indicaban que las mutaciones *missense* en el dominio ZP producen pérdidas auditivas que afectan a las frecuencias medias, mientras que las mutaciones *missense* en la región ZA afectan a las frecuencias altas (Hildebrand *et al.*, 2011) (Fig. 13). La pérdida auditiva es progresiva si las mutaciones afectan a cualquier residuo cisteína independientemente del dominio en el que se encuentre, mientras que si los residuos afectados son otros la hipoacusia es estable.

Nuestro laboratorio describió en 2008 una mutación *missense* espontánea en el ratón *mystery*, que se hereda de forma autosómica recesiva (Moreno-Pelayo *et al.*, 2008). La α -tectorina con la mutación *mystery* (p.Ala349Asp, en el dominio ZA) sí se incorpora a la membrana tectoria pero es incapaz de interaccionar con las proteínas β -tectorina y otogelina. Por otra parte, nuevos estudios en los que nuestro laboratorio también ha participado han permitido identificar la primera delección responsable de hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica dominante DFNA8/12, c.1124delT (p.Val375Alafs*4), así como las primeras mutaciones *missense* responsables de hipoacusia DFNA8/12 en el dominio ENT c.589G>A (p.Asp197Asn) y c.632T>C (p.Phe211Ser), lo que ha permitido establecer nuevas correlaciones genotipo-fenotipo (Hildebrand *et al.*, 2011).

En nuestro estudio hemos identificado en todos los individuos afectos de la familia S1322 dos nuevas mutaciones en heterocigosis compuesta: c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) y c.2657A>G (p.Asn886Ser). El padre de los individuos afectos es portador de la mutación c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) y es normoyente.

La madre es portadora de la mutación c.2657A>G (p.Asn886Ser) y cuando iniciamos el estudio de esta familia también era normoyente (Fig.11).

La patogenicidad de la mutación *missense* c.2654A>G es respaldada por los siguientes argumentos: (1) la segregación de la mutación con la enfermedad en la familia, (2) la no detección de la mutación en 50 controles normoyentes (100 cromosomas), (3) la alta conservación del residuo Asn-886 en la proteína (valor de ConSeq igual a 9) y (4) la evaluación de esta mutación como claramente deletérea por el programa informático Polyphen2 de predicción de efectos funcionales de mutaciones *missense* sobre proteínas (0.998).

Después de nuestro descubrimiento de la mutación c.2654A>G (p.Asn886Ser), Hildebrand *et al.* (2011) publicaron el alelo complejo [c.2654A>G; c.5383+5delGTGA] como responsable de hipoacusia DFNA8/12 en los individuos afectados de una familia inglesa, que presentaban pérdida auditiva en las frecuencias altas. Cabe destacar que la segunda mutación de este alelo complejo, c.5383+5delGTGA, ha sido también identificada en solitario en una familia brasileña con hipoacusia bilateral, prelocutiva y estable de tipo DFNA8/12, sin descripción de las frecuencias afectadas (Lezirovitz *et al.*, 2011). c.5383+5delGTGA afecta a los dos nucleótidos consenso del sitio donador de *splicing* generándose un transcrito aberrante sin exón 16 que sería responsable de la pérdida auditiva en la familia brasileña. Dado que existía la posibilidad de que la mutación c.2654A>G fuera dominante, solicitamos una nueva evaluación audiométrica de la madre portadora de la familia S1322, que confirmó la existencia de una pérdida auditiva leve en las frecuencias medias y altas.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la mutación c.2654A>G (p.Asn886Ser) es un alelo hipomórfico que por sí solo es responsable de hipoacusia dominante DFNA8/A12, con una pérdida auditiva leve en las frecuencias medias y altas, de aparición tardía, mientras que cuando se encuentra en heterocigosis compuesta con la mutación inactivante c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) causa una hipoacusia de tipo DFNB21, con pérdida auditiva moderada o severa que afecta a todas las frecuencias. Es por tanto la primera mutación *missense* en el gen *TECTA* implicada hasta la fecha en hipoacusia DFNB21 en humanos.

2. Gen *TECTB*

Los ratones *Tectb*^{-/-}, cuya membrana tectoria carece de β-tectorina, presentan alteradas las propiedades de sintonía de la cóclea, con disminución de la sensibilidad auditiva principalmente en las bajas frecuencias. Sin embargo, los ratones *Tectb*^{+/-} presentan una membrana tectoria sin alteraciones ultraestructurales y mantienen una sensibilidad auditiva idéntica al de los ratones de tipo silvestre (Russell *et al.*, 2007). Estos resultados hacen que el gen *TECTB* sea un excelente candidato para buscar mutaciones causantes de hipoacusia no sindrómica de herencia recesiva. Sin embargo, no hemos hallado mutaciones patogénicas en ninguno de los 45 casos familiares analizados, por lo que no es posible confirmar que este gen se encuentre implicado en el desarrollo de sordera de herencia recesiva.

3. Gen *OTOG*

La existencia de dos modelos murinos con sordera y alteraciones del equilibrio provocadas por mutaciones inactivantes en el gen *Otog* nos llevaron a escoger el gen ortólogo *OTOG* como candidato a ser responsable de sordera en humanos.

El análisis de haplotipos indicó que en la familia S1778 la sordera segregaba con marcadores que flanqueaban al gen *OTOG* (Fig. 14). La secuenciación de los 55 exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *OTOG* en los individuos afectados de la familia S1778 reveló la existencia de dos mutaciones no descritas anteriormente: c.6347C>T (p.Pro2116Leu) y c.6559C>T (p.Arg2187*). Ambas mutaciones se encuentran en heterocigosis compuesta en los dos individuos afectados de la familia S1778. Por su parte, los padres son portadores heterocigotos: el padre es portador de c.6347C>T (p.Pro2116Leu) y la madre es portadora de c.6559C>T (p.Arg2187*) (Fig. 14, 15).

La mutación c.6559C>T, que provoca la aparición de un codón de terminación prematuro en el exón 38 (p.Arg2187*), es indudablemente dañina, puesto que o bien provocaría la síntesis de una proteína truncada carente del cuarto módulo estructural formado por los dominios von Willebrand y C8, además de toda la región carboxilo-terminal, o bien causaría la degradación del transcrito aberrante debido a la actuación de la maquinaria de *nonsense-mediated decay*. Por otra parte, la patogenicidad de la mutación *missense* c.6347C>T es respaldada por los siguientes argumentos: (1) la segregación de la mutación con la enfermedad en la familia; (2) el hecho de que la mutación no fue detectada al analizar 300 controles normoyentes (600 cromosomas), ni está descrita en las bases de datos Proyecto de los 1500 Exomas y Proyecto de los 1000 Genomas; (3) la alta conservación del residuo Pro-2116 en la proteína otogelina (valor de ConSeq igual a 8), localizado en el cuarto dominio von Willebrand de la misma; y (4) la evaluación de esta mutación como claramente deletérea en programas informáticos de predicción de patogenicidad de mutaciones *missense* (valor de 0 en SIFT, valor de 0,97 en PolyPhen2) (Fig. 16).

Cabe destacar que los marcadores microsatélites utilizados en el análisis de haplotipos de la familia S1778 no permiten excluir al gen adyacente *USH1C*, responsable de la sordera no sindrómica DFNB18. Para excluir un posible papel patogénico de este gen, se secuenciaron sus exones y secuencias intrónicas flanqueantes en un individuo afecto de la familia S1778, sin encontrar mutaciones patogénicas. Además, nuestro laboratorio descartó que la sordera de la familia S1778 se debiera a mutaciones en el resto de genes conocidos responsables de sordera de herencia recesiva, ya sea excluyéndolos por análisis de haplotipos o confirmando por secuenciación de un individuo afecto de la familia la ausencia de mutaciones patogénicas en los exones y regiones intrónicas flanqueantes de los genes que no pudieron ser excluidos por dicho análisis.

En paralelo a nuestro estudio, el grupo de la Dra. Hannie Kremer (Universidad de Radboud, Nimega, Holanda) realizando estudios de aproximación por mapeo de homocigosidad (genotipado de SNPs de alta resolución utilizando Affymetrix Genechip Genome-Wide Human Arrays 5.0) identificó una familia

consanguínea (W00-384) con cinco regiones de homocigosidad mayores de 1Mb. Una de estas regiones (2.40Mb) solapaba parcialmente con la correspondiente al locus DFNB18. El gen *USH1C* fue descartado al no hallar mutaciones patogénicas después de secuenciar todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen. En cambio, la secuenciación del gen adyacente *OTOG*, también contenido en la misma región de homocigosidad de 2.40Mb permitió detectar una mutación de tipo inactivante (deleción en homocigosis de 1 pb en el exón 35: c.5508delC, p.Ala1838Profs*31). En conjunto, los datos obtenidos por nuestro laboratorio y por el de la Dra. Kremer confirman que el gen *OTOG* es responsable de sordera en humanos.

Los rasgos fenotípicos de los individuos afectados de ambas familias son muy similares a pesar de las diferencias en el tipo de mutaciones detectadas (mutación truncante en homocigosis en la familia holandesa frente a heterocigosis compuesta de mutación truncante/mutación *missense* en la familia española). Tanto los individuos afectados de la familia W00-384 como los de la familia S1778 presentan sordera bilateral, moderada y estable, con ligera caída en las frecuencias altas, así como disfunción vestibular detectada por pruebas específicas. En el caso de la familia holandesa la alteración vestibular se manifiesta por un retraso en el desarrollo motor, mientras que en la familia española la disfunción vestibular tiene carácter subclínico y sólo se detectó mediante un test específico de disfunción vestibular (test calórico).

Todos los modelos murinos con mutaciones en el gen *Otog* presentan un fenotipo común consistente en sordera y alteraciones graves del equilibrio (Simmler *et al.*, 2000a; Simmler *et al.*, 2000b; Peck *et al.*, 2010). Solamente el modelo creado por recombinación homóloga (*Otog*^{*tm1Prs*}) tiene caracterizado su genotipo (deleción de los tres primeros exones del gen *Otog*) (Simmler *et al.*, 2000b), por lo que analizamos el gen *Otog* en las cuatro estirpes de ratón *twister* disponibles en The Jackson Laboratory para identificar las mutaciones subyacentes a su fenotipo. La secuenciación del gen *Otog* reveló que las mutaciones responsables de la sordera y problemas vestibulares de estos ratones son de tipo inactivante en todos los casos: la estirpe *Otog*^{*tw1-2J*}/*Otog*^{*tw1-2J*} presenta la mutación en homocigosis c.1952+2T>A, que afecta al sitio donador de *splicing* del exón 17; la estirpe *Otog*^{*tw1-3J*}/*Otog*^{*tw13J*} presenta la mutación en homocigosis c.509G>T (p.Glu170*) en el exón 6; las estirpes *Otog*^{*tw1-4J*}/*Otog*^{*tw1-4J*} y *Otog*^{*tw1-5J*}/*Otog*^{*tw1-5J*} presentan ambas la mutación en homocigosis c.3454C>T (p.Arg1152*) en el exón 29.

Es importante destacar que los problemas vestibulares provocados por mutaciones en el gen *OTOG* observados en los pacientes son menos acusados que los de los modelos murinos. Probablemente esto sea debido a que la compensación del sistema nervioso central sea más eficiente en humanos que en ratones, como ocurre en otros casos (Petit *et al.*, 2001). Sin embargo, sí existe mayor similitud entre el grado de afectación vestibular de los modelos murinos y el de la familia holandesa (con retraso en el inicio de la deambulación en la infancia), no ocurriendo lo mismo en la familia española (fenotipo subclínico). Parece, por tanto, que los problemas vestibulares serían más evidentes cuando ambos alelos del gen portan una mutación claramente inactivante, como ocurre en los modelos de ratón y en la familia holandesa. Los problemas vestibulares de los pacientes de la familia española quizás sean menos evidentes porque una de las

dos mutaciones que portan es de tipo *missense*. El estudio de nuevos pacientes con mutaciones en el gen *OTOG* y la generación de ratones *knock-in* con mutaciones equivalentes a la detectada en la familia española deberían ayudar a esclarecer esta cuestión.

4. Hipoacusia tipo DFNB16. Gen *STRC*

El gen *STRC* forma parte junto con los genes *CATSPER2*, *HIPPD2A* y *CKMT1A* de una región duplicada en tándem en el cromosoma 15q15 cuya estructura favorece la aparición de anomalías estructurales (duplicaciones/deleciones) por recombinación homóloga, que son responsables de hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB16 (Verpy *et al.*, 2001) y de una rara sordera sindrómica con infertilidad (Avidan *et al.*, 2003).

En el curso de la caracterización de la anemia diseritropoyética congénita (que parece determinada por una deleción en alguna otra parte del genoma) se describió por primera vez en una familia francesa una deleción en homocigosis en la región 15q15 que es responsable del síndrome de sordera e infertilidad (Avidan *et al.*, 2003). En este caso, la hipoacusia que se produce por la pérdida del gen *STRC* es prelocutiva y de carácter moderado. Estos pacientes presentan astenoteratozoospermia o dismotilidad espermática por la pérdida del gen *CATSPER2* pero no presentan rasgos dismórficos (Avidan *et al.*, 2003). Otras tres familias más han sido identificadas con esta hipoacusia sindrómica (Zhang *et al.*, 2007).

Las duplicaciones presentes en la región y el alto porcentaje de similitud entre el gen *STRC* y el *ΨSTRC* han obstaculizado el análisis molecular del gen *STRC* en individuos con sordera no sindrómica. Son precisamente las escasas diferencias entre gen y pseudogén las que han impedido el desarrollo de ensayos de amplificación por PCR del gen *STRC* sin interferencias con el *ΨSTRC*. Precisamente por este hecho, las aproximaciones basadas en PCR que han sido utilizadas hasta la fecha resultan insatisfactorias porque en la mayoría de los casos no permiten averiguar con certeza si las mutaciones puntuales detectadas se hallan en exones del gen o del pseudogén (Francey *et al.*, 2012).

Las bases de datos con información sobre variación del número de copias (*Copy Number Variation*, CNVs) son una herramienta fundamental para laboratorios que utilizan este tipo de técnicas en sus cribados. Pero la dificultad de este tipo de estudios consiste en distinguir CNVs de la población no afectada, y por tanto no patogénicas, de las deleciones o duplicaciones patogénicas presentes en individuos afectados (Knijnenburg *et al.*, 2009).

La región 15q15 ya ha sido estudiada utilizando técnicas de hibridación comparativa a genoma completo (*Comparative Genomic Hybridisation*, CGH array), MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) e hibridación de SNPs (*SNP array* con cobertura de 317.000 sondas de oligonucleótidos), lo que ha permitido la identificación de deleciones con una extensión mínima de unas 90 kb que, cuando afectan a ambos alelos, son responsables de sordera sindrómica en un paciente (Knijnenburg *et al.*, 2009). Se desconoce la localización exacta de los puntos de rotura de las deleciones presentes en heterocigosis

compuesta en dicho paciente, aunque sí se ha confirmado que se trata de dos deleciones diferentes. Este paciente presenta retraso mental, hipoacusia moderada y una serie de características dismórficas (orejas de implantación baja, nariz con caballete, paladar hendido, fisuras parpebrales pequeñas, pestañas muy tupidas, sinofridia, braquidactilia y sudoración de palmas de manos y pies sin motivo aparente). Debido a que el paciente tenía 10 años cuando se llevó a cabo el estudio, no se sabe si también presenta infertilidad secundaria por dismotilidad espermática. Parece por tanto que o bien puede existir una amplia variabilidad fenotípica de los pacientes dependiendo de la extensión de la deleción en homocigosis de la región 15q15, siendo este último caso el más severo descrito hasta la fecha; o bien el retraso mental y las características dismórficas pueden no estar relacionadas o estar sólo parcialmente relacionadas con la deleción en homocigosis de la región 15q15 (Knijnenburg *et al.*, 2009). A partir de los datos obtenidos por estos autores en su población y de los registrados en la base de datos DGV (*Database of Genomic Variation*, <http://dgvbeta.tcag.ca/dgv/app/home>), se estimó que en la población normal existiría una incidencia de portadores de CNVs en la región 15q15 que sería del 1,6% para las deleciones y de 0,7% para las duplicaciones.

Es importante resaltar que el uso de distintas metodologías de detección, de distintas plataformas de hibridación y de distintos algoritmos para identificar las CNVs genera discrepancias en el análisis de los resultados. Por ejemplo, Francey *et al.* (2011) analizaron las variaciones en el número de copias de esta región en 1910 controles utilizando un *array* de *Illumina* con cobertura de 610.000 SNPs. Al analizar los datos obtenidos con dos algoritmos de uso habitual, PennCNV y BeadStudio, los resultados obtenidos fueron muy distintos. Con PennCNV no se detectaron CNVs en la región, mientras que con BeadStudio se detectaron CNVs en 12 de 1910 controles - 10 deleciones (0,52%) y 2 duplicaciones (0,10%), todas en heterocigosis (Francey *et al.*, 2011). Estos resultados son sensiblemente inferiores al 1,6% de frecuencia de portadores de la deleción más común y al 0,7% de frecuencia de duplicaciones anteriormente estimadas (Knijnenburg *et al.*, 2009).

Aunque los datos expuestos anteriormente muestran deleciones de gran tamaño en la región 15q15, nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio de las deleciones que afectan al gen *STRC* y provocan hipoacusia no sindrómica. En nuestro estudio hemos puesto a punto un nuevo protocolo diagnóstico para la detección de mutaciones en el gen *STRC* responsables de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva DFNB16. Es un método rápido y fiable, ya que realizamos toda una batería de pruebas complementarias para la confirmación de deleciones de ambos alelos del gen *STRC* que puede llevar a cabo cualquier laboratorio diagnóstico.

Nuestra aproximación inicial, rápidamente implantada en el protocolo de diagnóstico de rutina de hipoacusias de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal, se basó en el uso de la PCR múltiplex del marcador D15S784. Por ahora, todos los pacientes de nuestra colección con deleción de ambos alelos del marcador D15S784 presentan deleción de ambos alelos del gen *STRC* y por ahora no hemos

encontrado ningún individuo con delección del gen *STRC* que amplificase el marcador D15S784, de modo que es una primera aproximación excelente, puesto que es una prueba rápida y barata.

No obstante, el marcador D15S784 está fuera de la región codificante del gen *STRC*, por lo que pusimos a punto pruebas específicas de análisis del gen *STRC*: el AFLP del exón 23 y los RFLPs fluorescentes de los exones 23 y 29 del gen *STRC*. Estas pruebas han confirmado la delección de ambos alelos del exón 23 y 29 del gen en todos aquellos individuos que presentan delección de ambos alelos del marcador D15S784.

A continuación llevamos a cabo la prueba complementaria fundamental del método diagnóstico: las PCRs solapantes de largo recorrido específicas del gen *STRC*. Con esta prueba tenemos la certeza absoluta de delección completa de ambos alelos del gen *STRC* comprobada por la ausencia de amplificación en dos PCRs solapantes e independientes (una que abarca la región comprendida desde antes del exón 1 hasta el intrón 22 y otra que abarca desde el intrón 18 hasta después del exón 29). Además, nuestro diseño de estas reacciones de amplificación solventa la principal dificultad para el estudio del gen *STRC*: la altísima homología de secuencia entre gen *STRC* y ψ *STRC* y la dificultad de diseñar cebadores específicos del gen para secuenciar todos sus exones y regiones intrónicas flanqueantes. Los cebadores que hemos diseñado para las PCRs solapantes de largo recorrido proporcionan amplificados específicos del gen *STRC* porque se localizan sobre SNPs que diferencian gen de pseudogén (Fig. 36), lo que hemos confirmado al secuenciar los productos y solamente encontrar las variantes de secuencia específicas del gen (en particular, la ausencia del codón prematuro de parada situado en el exón 20 que caracteriza a ψ *STRC*). De este modo no sólo podemos determinar si un individuo presenta delección de ambos alelos del gen *STRC*, sino que si es necesario buscar mutaciones puntuales en un individuo afecto sin delecciones podemos secuenciar específicamente los exones utilizando como molde los amplicones de las PCRs de largo recorrido. Esto elimina la incertidumbre de determinar si las mutaciones corresponden al gen o al pseudogén como ocurría hasta ahora (Francey *et al.*, 2011).

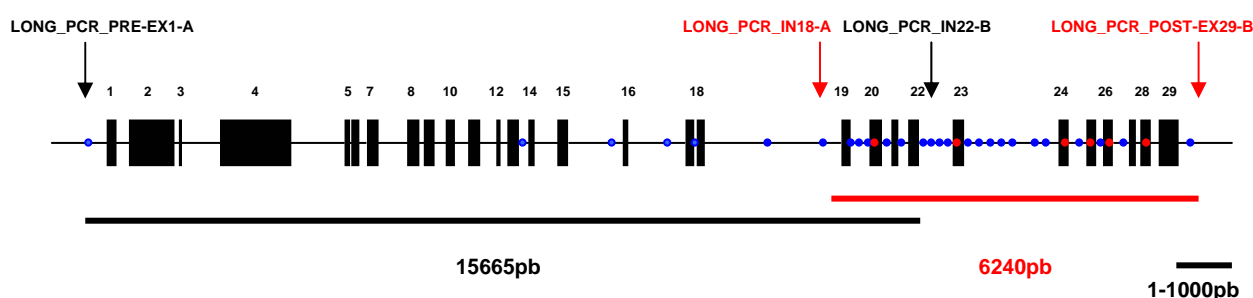


Fig. 36. Estructura del gen *STRC*. En rojo se muestran los puntos en los que hay al menos un SNP exónico de diferencia entre gen *STRC* y ψ *STRC*. En azul se muestran las regiones en las que hay al menos un SNP intrónico que diferencian a *STRC* y ψ *STRC*. Las flechas negras indican la posición de los cebadores de la PCR de largo recorrido de 16 kb. Las flechas rojas indican la posición de los cebadores de la PCR de largo recorrido de 6 kb. En los primeros exones no hay ningún SNP de diferencia entre gen *STRC* y ψ *STRC*, lo que dificulta el análisis mutacional del gen *STRC*.

Los resultados de Francey *et al.* y nuestros propios resultados implican la existencia de un elevado número de portadores de deleciones en el gen *STRC*. Este hecho nos planteó la necesidad de elaborar un protocolo de detección de portadores, no sólo para confirmar que los padres de los individuos con deleción de ambas copias del gen *STRC* presentan un único alelo del gen, sino también porque probablemente existan individuos sordos por deleción de un alelo del gen *STRC* y una mutación puntual en el otro.

Por ello, desarrollamos un ensayo de detección de portadores basado en qPCR, buscando sondas eficaces para la cuantificación que además fueran específicas del gen *STRC*. Como ya se ha indicado la similitud de secuencia entre los primeros 18 exones de gen y pseudogén es del 100% y en esa región es imposible diseñar una sonda que sea específica del gen *STRC*. Por otra parte, nuestros intentos de utilizar sondas localizadas sobre SNPs que diferencian gen de pseudogén en el intrón 19, intrón 23 y exón 26 sobre SNPs no obtuvieron resultados fructíferos. Por ello, el ensayo qPCR que finalmente hemos validado hace uso de una sonda (F1.2V2) que, si bien no está situada dentro del gen *STRC*, se encuentra localizada solamente a 600 pb del extremo 5' del exón 1 de *STRC* (Fig. 26). Nuestros resultados indican que esta sonda es altamente informativa y eficaz para la cuantificación, puesto que detecta todas las deleciones del gen *STRC* que hemos identificado hasta el momento. De hecho, hemos confirmado que todos los padres de los individuos con deleción de ambos alelos del gen *STRC* son heterocigotos para la deleción de la sonda F1.2V2.

De las 20 familias de nuestra colección con compatibilidad de ligamiento al gen *STRC*, 4 presentaron hipoacusia DFNB16 por deleciones completas de ambos alelos del gen, 3 fueron descartadas al elucidarse que la causa de su hipoacusia eran mutaciones en otros genes y 9 no pudieron ser analizadas ulteriormente debido al agotamiento de las muestras de ADN o a la baja calidad de las mismas. Las 4 familias restantes compatibles con ligamiento a *STRC* fueron analizadas por qPCR y secuenciación de los exones del gen, utilizando las PCRs solapantes de largo recorrido para la generación de molde. En dos de estas familias se detectó la deleción de un alelo de *STRC*, pero en ninguna de las 4 hallamos mutaciones puntuales patogénicas. Estos resultados sugieren que las mutaciones más comunes de los individuos con hipoacusia de tipo DFNB16 son deleciones de ambos alelos que abarcan toda la estructura del gen.

5. Locus DFNB77. Gen *LOXHD1*

Las mutaciones en el gen *LOXHD1* son causantes de dos trastornos neurosensoriales claramente distintos: la hipoacusia no sindrómica tipo DFNB77 (Grillet *et al.*, 2009) y la distrofia corneal de Fuchs de aparición tardía (DCF2), de herencia autosómica dominante (Riazuddin *et al.*, 2012). Las mutaciones publicadas que originan hipoacusia DFNB77 son de tipo *nonsense* (codones de parada prematuros), mientras que las mutaciones que dan lugar a DCF son de tipo *missense*.

Hasta la fecha se habían publicado dos mutaciones en *LOXHD1* causantes de hipoacusia DFNB77: c.2008C>T (p.Arg670*), en homocigosis en una familia consanguínea iraní con cinco generaciones (Grillet *et al.*, 2009), y c.4714G>A (p.Arg1572*), en homocigosis en dos familias de judíos askenazíes no

relacionadas (Edvarson *et al.*, 2011). La frecuencia de portadores de esta última mutación en la población askenazí, del orden de 1:180 individuos (4 portadores de 719 individuos analizados), no resulta despreciable. En efecto, los autores estimaron que probablemente esta mutación sea la responsable de hasta el 5% de las sorderas no sindrómicas recesivas de la población judía askenazí (2 familias de una cohorte de 39 familias), siendo la segunda sordera más prevalente después de la hipoacusia DFNB1 (75% de los casos) (Edvarson *et al.*, 2011).

Nuestro estudio añade dos nuevas mutaciones a esta lista. Hemos investigado una familia no consanguínea cuyos individuos afectados presentan dos nuevas mutaciones, ambas en homocigosis, que causan hipoacusia DFNB77: una delección de las primeras 7pb del exón 26 que provoca la aparición de un codón de parada prematuro (c.3914_3920del, p.Val1306Thfs*57), y una sustitución que elimina el sitio aceptor de *splicing* canónico del intrón 4 (c.512-1G>A) (Fig. 33 y Fig. 34). Los efectos de ambas mutaciones son equivalentes a los de las mutaciones DFNB77 ya publicadas. La mutación c.3914_3920del provocaría un alelo nulo, ya sea por actuación del mecanismo de NMD o bien por la síntesis de una proteína Loxhd1 que quedaría truncada en el 10º dominio PLAT. Por su parte, la eliminación del sitio de aceptor de *splicing* del intrón 4 que es producida por la mutación c.512-1G>A debería causar la exclusión (*skipping*) del exón 5 de los ARNm, lo que a su vez provocaría un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro. Esta hipótesis podría comprobarse analizando los transcritos *LOXHD1* de ARN obtenido de los afectados de la familia S1649, pero tal experimento no es factible porque los transcritos con exones 4 y 5 solamente se expresan en el oído interno (Grillet *et al.*, 2009).

Como hemos indicado, ambas mutaciones se encuentran en *cis*, siendo ambos padres heterocigotos para las dos variantes como confirman los ensayos RFLP (Fig. 32). Así pues, nos encontramos frente a un alelo mutante singular, [c.512-1G>A; c.3914_3920del], que tiene dos posible orígenes. Podría haberse originado por la improbable ocurrencia de dos sucesos mutacionales en un mismo cromosoma, aunque parece más probable que dos mutaciones que aparecieron independientemente hayan acabado ligadas en un mismo alelo por recombinación meiótica en un hipotético ancestro sordo de la familia S1649. La familia pertenece a un pequeño pueblo de Ciudad Real y la endogamia puede ser la explicación más sencilla a la presencia en homocigosis de este alelo tan poco común ya que ninguna de estas variantes ha sido encontrada en 80 controles normoyentes. Es importante resaltar que este alelo es claramente recesivo, ya que los padres portadores son normoyentes y no hay historial de trastornos visuales en las respectivas familias.

La hipoacusia DFNB77 se describió originalmente como postlocutiva y progresiva (Grillet *et al.*, 2009). La evolución de la hipoacusia se dedujo a partir de los audiogramas realizados a cuatro individuos afectados pertenecientes a la familia iraní con la mutación c.2008C>T (p.Arg670*). En el momento en el que se registraron sus audiogramas, sus edades estaban comprendidas entre los 16 y los 60 años. En estos pacientes se observa un audiograma descendente (*down-sloping*). Extrapolando los datos obtenidos a las diferentes edades, se concluyó que la sordera es inicialmente leve a moderada tanto en las frecuencias

medias (500-2000Hz) como en las frecuencias altas (>2000Hz), sin afectación de las frecuencias bajas. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo la hipoacusia evoluciona de moderada a severa en las frecuencias medias y altas durante la edad adulta hasta que finalmente termina afectando también a las frecuencias bajas (Grillet *et al.*, 2009). En cambio, los pacientes pertenecientes a las dos familias de judíos askenazíes presentan hipoacusia congénita, no progresiva y severo-profunda, aunque las frecuencias bajas están algo menos afectadas (Edvarson *et al.*, 2011).

El fenotipo de los dos hermanos afectados de la familia S1649 parece intermedio entre los fenotipos de las familias iraní e israelíes. La hipoacusia es prelocutiva, probablemente congénita, siendo moderada-severa en las frecuencias medias y altas (Fig. 33). Dada la corta edad de ambos afectados (12 y 7 años), no ha sido posible sacar conclusiones sobre la progresión de su hipoacusia, a pesar de haber examinado audiogramas seriados anuales. La variabilidad fenotípica que se observa entre los pacientes de las cuatro familias en las que se ha confirmado hipoacusia DFNB77, todos ellos homocigotos para alelos nulos, es un fenómeno bien documentado en otros tipos de hipoacusia no sindrómica de origen genético como por ejemplo DFNB1 (Snoeckx *et al.*, 2005). Este fenómeno puede deberse a factores ambientales o a los efectos de genes modificadores no identificados (Nadeau, 2005).

Hemos identificado además una familia con HNSAR en la que los individuos afectados, cuyos perfiles audiométricos serían consistentes con hipoacusia DFNB77 (Fig. 35), presentan en heterocigosis el cambio *missense* no descrito c.6136G>A (p.Glu2046Lys), sin que halláramos la segunda mutación acompañante. No es posible descartar aún que la hipoacusia de esta familia sea de tipo DFNB77, puesto que el extremo 5' del gen *LOXHD1* no está aún completamente caracterizado (el primer exón carece de secuencia Kozak para el inicio de la traducción). La identificación de posibles exones anteriores al exón 1 está actualmente en curso en nuestro laboratorio. Por otra parte, la mutación p.Glu2046Lys podría no tener efectos patogénicos (a pesar de ser evaluada como inequívocamente deletérea por Polyphen 2) o incluso ser responsable de distrofia corneal de Fuchs de aparición tardía (DCF2), al igual que sucede con otras mutaciones *missense* en *LOXHD1*. Si tal fuera el caso, los individuos supervivientes de la familia S647 portadores de la mutación (Fig. 34) son aún muy jóvenes para haber desarrollado la distrofia corneal (que se manifiesta a partir de la quinta década de la vida). El análisis de las córneas de individuos afectados por DCF2 y las investigaciones de los efectos de algunas mutaciones *missense* identificadas sobre la distribución subcelular de la proteína Loxhd1, en una línea celular de epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19), sugieren que el mecanismo por el que estas mutaciones provocan DCF2 es promoviendo la agregación descontrolada de la proteína. La eventual ejecución en células ARPE-19 de ensayos funcionales para la mutación p.Glu2046Lys debería ayudar a esclarecer su posible patogenicidad.

6. Epidemiología genética de las hipoacusias moderadas en la población española

Los estudios epidemiológicos en EE.UU. indican que aproximadamente cada año nacen 4.000 niños con hipoacusia de severa a profunda y otros 8.000 nacen con sordera de leve a moderada (Smith *et al.*, 2005),

lo que significa que al menos uno de cada 1.000 nacidos vivos presenta hipoacusia no sindrómica bilateral con pérdida de al menos 40 dB. Este grupo incluye a los niños con hipoacusia profunda, cuya frecuencia es de 4 por 10.000 (Smith *et al.*, 2005). Considerando a la población americana como ejemplo de población occidental, según estas estadísticas podemos inferir que el número de niños con hipoacusia no sindrómica con pérdida de al menos 40 dB en España debe ser también muy elevado, sin tener en cuenta las hipoacusias moderadas adquiridas durante la infancia (debidas a otitis media, meningitis, etc) (Smith *et al.*, 2005). Las pérdidas auditivas a partir de 40dB ya tienen impacto sobre la calidad de vida de los individuos afectados, por lo que es esencial la identificación y estudio de genes cuyas mutaciones producen sordera no sindrómica de intensidad moderada, progresivas o no.

El diagnóstico molecular de rutina de las hipoacusias hereditarias infantiles se centra, en la mayoría de los laboratorios, en la detección de mutaciones en el locus DFNB1 (análisis del gen *GJB2*, que codifica la conexina 26, y detección de deleciones en la región reguladora de la expresión de *GJB2*, que suelen afectar al gen adyacente *GJB6*). Esta estrategia está justificada por la elevada prevalencia de la hipoacusia DFNB1, que daría cuenta de hasta un 50% de los casos de hipoacusia infantil hereditaria (del Castillo y del Castillo, 2011). Sin embargo, a pesar de que existen alelos hipomórficos de *GJB2* que son responsables de un número no despreciable de hipoacusias moderadas o leves, tales como p.Met34Thr, p.Val37Ile y p.Leu90Pro (Cryns *et al.*, 2004, Snoeckx *et al.*, 2005), aproximadamente las tres cuartas partes de los afectados por hipoacusia DFNB1 diagnosticados presentan sorderas severas o profundas (Snoeckx *et al.*, 2005). En consecuencia, una fracción muy significativa de los casos de hipoacusia moderada queda sin elucidar tras el cribado de rutina. Por ello, en este trabajo investigamos la contribución de otros genes a la patogénesis de las sorderas moderadas, con objeto de poder desarrollar una aproximación diagnóstica basada en fenotipo que elevara el porcentaje de casos elucidados.

Es preciso considerar que el número de genes implicados en el desarrollo de hipoacusias moderadas de herencia recesiva que han sido identificados hasta el momento es relativamente reducido. A ello han contribuido dos factores. Por una parte, muchos genes han sido identificados al estudiar grandes familias consanguíneas provenientes de regiones geográficamente aisladas de países del Tercer Mundo. En muchos de los casos, se han seleccionado para dichos estudios familias en las que los individuos afectados presentaban sorderas severas o profundas, con la intención de hacer posible la detección de fenocopias causadas por factores ambientales (que suelen causar pérdidas auditivas de menor gravedad), las cuales son mucho más frecuentes que en los países desarrollados. Por otra parte, los casos familiares con hipoacusias moderadas o leves son referidos en menor proporción a los laboratorios de genética, ya sea porque los individuos afectados no son conscientes de serlo, porque siéndolo no solicitan el diagnóstico genético dado su menor grado de afectación, o bien porque no se identifica la agregación familiar de la hipoacusia en la consulta clínica.

Al inicio de este trabajo, se conocían dos genes implicados característicamente en el desarrollo de hipoacusias recesivas moderadas y estables: *STRC* (DFNB16) (Verpy *et al.*, 2001; Villamar *et al.*, 1999) y

TECTA (DFNB21) (Mustapha *et al.*, 1999; Naz *et al.*, 2003), cuya investigación constituyó nuestro objetivo inicial. En ambos casos, se trata de genes cuyos productos forman parte de la membrana tectoria (*TECTA*) o responsables del anclaje de la membrana tectoria al estereocilio más alto (*STRC*), por lo que decidimos estudiar además otros dos genes candidatos cuyos productos son también componentes de la membrana tectoria y cuya inactivación en ratón es causa de sordera (*TECTB* y *OTOG*).

Además, se conocía que algunas hipoacusias progresivas de herencia recesiva pueden empezar a manifestarse como hipoacusias moderadas que van empeorando paulatinamente debido al daño que sufren las células ciliadas y otras estructuras. Tal es el caso de las hipoacusias DFNB30 y DFNB77, causadas, respectivamente, por mutaciones en los genes *MYO3A* (Walsh *et al.*, 2002) y *LOXHD1* (Grillet *et al.*, 2009), siendo este último incluido como objetivo de nuestro trabajo por la participación de la proteína que codifica en la estructura de los estereocilios.

En nuestro estudio del gen *TECTA* investigamos 224 casos de hipoacusia no relacionados (77 familiares y 149 esporádicos) y encontramos dos mutaciones patogénicas en un caso familiar, que se añaden a la breve lista de mutaciones DFNB21 identificadas hasta la fecha (Tabla 21). Una de estas mutaciones es nueva (c.51dupT, p.Val18Cysfs*18). En lo que respecta a la segunda mutación (c.2654A>G, p.Asn886Ser), hemos confirmado que se trata de un alelo hipomórfico que puede causar hipoacusia de tipo DFNA8/A12 por sí sola o bien hipoacusia de tipo DFNB21, en heterocigosis compuesta con la mutación inactivante c.51dupT.

Exón	Mutación (ADN)	Mutación(Proteína)	Grado de hipoacusia	Origen	Referencia
1	c.51dupT	p.Val18Cysfs*18	Moderada	Español	Este trabajo
3	c.266delT	p.Leu89Argfs*34	Moderada	Iraní	Meyer <i>et al.</i> , 2007b
5	c.651dupC	p.Asn218Glnfs*31	Moderada	Iraní	Naz <i>et al.</i> , 2003
9	c.2654A>G	p.Asn886Ser	Leve-Moderada	Inglés Español	Hildebrand <i>et al.</i> , 2011, Este trabajo
	c.2941+1G>A		Severo-profunda	Libanés	Mustapha <i>et al.</i> , 1999
	9,6kb del		Moderada	Iraní	Meyer <i>et al.</i> , 2007b
15	c.5072G>T	p.Cys1691Phe	Moderada	Coreano	Sagong <i>et al.</i> , 2012
15	c.5211C>A	p.Tyr1737*	Moderada	Iraní	Meyer <i>et al.</i> , 2007b
20	c.6037delG	p.Glu2013Argfs*6	Moderada	Pakistaní	Naz <i>et al.</i> , 2003
	c.6162+3insT		Moderada	Coreano	Sagong <i>et al.</i> , 2012
21	c.6203-6218del	p.Lys2068Argfs*38	Moderada	Iraní	Alasti <i>et al.</i> , 2008

Tabla 21. Mutaciones en el gen *TECTA* responsables de hipoacusia DFNB21 descritas hasta la fecha.
En azul se indican las mutaciones en el gen *TECTA* identificadas en este trabajo.

Nuestros resultados indican que las mutaciones en el gen *TECTA* no son una causa frecuente de sordera de herencia recesiva en la población española (su contribución sería inferior al 1% de los casos), lo cual contrasta con el hecho de que la hipoacusia DFNA8/A12, también causada por mutaciones *TECTA*, sea uno de los tipos más frecuentes de sordera de herencia dominante en las poblaciones española y

estadounidense (Hildebrand *et al.*, 2011), las únicas estudiadas extensamente hasta la fecha para este tipo de hipoacusia. En lo que se refiere a las hipoacusias de herencia recesiva, hasta ahora solamente se ha estudiado en la población iraní la contribución del gen *TECTA*, describiéndose en dos estudios del mismo laboratorio (Meyer *et al.*, 2007b; Alasti *et al.*, 2008) una mayor prevalencia de la hipoacusia DFNB21 en dicha población (en total, 4 de los 120 casos investigados). En conjunto, la mayoría de las mutaciones responsables de hipoacusia DFNB21 han sido aisladas en homocigosis en familias consanguíneas procedentes de poblaciones de Oriente Medio (5 en Irán, 1 en Líbano, 1 en Pakistán; Tabla 21), lo que indicaría que la mayor prevalencia de este tipo de hipoacusia en esas poblaciones sería debida a su particular estructura familiar más que a un efecto fundador para una mutación concreta.

El estudio de los genes candidatos *TECTB* y *OTOG* en casos familiares con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva se saldó con resultados dispares. El hallazgo de una familia (de 60 casos familiares investigados) cuyos individuos afectados portaban dos mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *OTOG* (Tabla 22) nos ha permitido demostrar que *OTOG* está implicado en el desarrollo de un tipo de hipoacusia moderada, con afectación vestibular, que no parece frecuente en la población española. Por el contrario el análisis del gen *TECTB* en 45 familias de nuestra colección no encontró ninguna mutación patogénica. Esto sugiere que, de verificarse la existencia de mutaciones en el gen *TECTB* responsables de hipoacusia, la contribución del gen *TECTB* al conjunto de casos en nuestra población sería muy reducida.

Exón	Mutación (ADN)	Mutación (Proteína)	Grado de hipoacusia	Origen	Referencia
35	c.5508delC	p.Ala1831Profs*31	Moderada	Danés	Schraders <i>et al.</i> , en prensa
37	c.6347C>T	p.Pro2116Leu	Moderada	Español	Este trabajo
38	c.6559C>T	p.Arg2187*	Moderada	Español	Este trabajo

Tabla 22. Mutaciones en el gen *OTOG* responsables de hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva. En azul se indican las mutaciones descritas en este trabajo.

En nuestro estudio del gen *STRC* hemos analizado 277 casos con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva. De ellos, 243 presentan sordera moderada (131 casos esporádicos y 112 casos familiares). Hemos encontrado cinco casos familiares y tres casos esporádicos, todos con sordera moderada, con delección de ambos alelos del gen *STRC*. Esto constituye un 3,29% de individuos sordos por delecciones de ambos alelos del gen *STRC* en nuestra muestra de 243 casos con sordera moderada (2,89% de nuestra muestra de 277 casos con sordera), lo que indica que las mutaciones en el gen *STRC* son responsables de un porcentaje significativo de casos de sordera moderada en la población española. Es importante resaltar que no hemos determinado la extensión total de las delecciones en estos individuos, por lo que en algunos de ellos podrían estar inactivados ambos alelos del gen *CATSPER2*, lo que produciría una sordera sindrómica con infertilidad de los varones (que podría afectar a alguno de los individuos S1302-1, S1302-2 y S1831-2) (Fig. 20 y Fig. 30).

Finalmente, en nuestro estudio del gen *LOXHD1* investigamos 54 casos familiares no relacionados, en uno de los cuales identificamos dos mutaciones patogénicas (c.3914_3920del, p.Val1306Thrfs*57; y la mutación de *splicing* c.512-1G>A), ambas en homocigosis, que son responsables de la hipoacusia que segrega en dicha familia. Estas dos nuevas mutaciones se añaden a las otras dos mutaciones responsables de hipoacusia DFNB77 (Tabla 23) previamente identificadas, respectivamente, en una familia iraní y en dos familias israelíes askenazíes no relacionadas. Los datos epidemiológicos disponibles sugieren que la hipoacusia DFNB77, causada por la mutación c.4714C>T (p.Arg1572*) en *LOXHD1*, sería la segunda hipoacusia recesiva más frecuente en la población israelí de ascendencia askenazí, con una frecuencia de aproximadamente el 5% (2 casos familiares no relacionados en una cohorte de 39 casos), después de la hipoacusia DFNB1 (29 de 39 casos familiares, un 75%) (Edvarson *et al.*, 2011). La elevada frecuencia de portadores de esta mutación en la población askenazí (1:180) muestra que la significativa prevalencia de la hipoacusia DFNB77 se debería a un efecto fundador, como sucede con otros tipos de hipoacusias en otras poblaciones.

Exón	Mutación (ADN)	Mutación (Proteína)	Grado de hipoacusia	Origen	Referencia
	c.512-1G>A		Moderada	Español	Este trabajo
15	c.2008C>T	p.Arg670*	Profunda	Iraní	Grillet <i>et al.</i> , 2009
26	c.3914_3920del	p.Val1306Thrfs*57	Moderada	Español	Este trabajo
30	c.4714G>A	p.Arg1572*	Severo-Profunda	Judíos askenazí	Edvarson <i>et al.</i> , 2011

Tabla 23. Mutaciones en el gen *LOXHD1* responsables de hipoacusia no sindrómica DFNB77.

En azul se indican las mutaciones descritas en este trabajo.

En resumen, nuestros datos sobre la prevalencia de la hipoacusia DFNB16 indican que el cribado del gen *STRC* debe ser incorporado al diagnóstico molecular de rutina de las hipoacusias moderadas de herencia recesiva que no hayan sido elucidadas tras el cribado de mutaciones responsables de hipoacusia DFNB1. Esta incorporación ya se ha implementado en nuestra Unidad, utilizando los métodos diagnósticos desarrollados en este trabajo. Por el contrario, las hipoacusias causadas por mutaciones en los genes *TECTA*, *OTOG* y *LOXHD1* no contribuyen significativamente al conjunto de las hipoacusias no sindrómicas de herencia recesiva en la población española, por lo que no es prioritario incluir el cribado de estos genes en los protocolos de diagnóstico molecular de rutina. El desarrollo de paneles para la resecuenciación de todos los genes implicados en hipoacusias mediante las nuevas tecnologías de ultrasecuenciación permitirá optimizar el diagnóstico molecular en el futuro, aunque no parece que su uso se generalice con rapidez para el diagnóstico de rutina dado que el coste de tales tecnologías es aún elevado.

Por último, hay que destacar que nuestro estudio proporciona los primeros datos de epidemiología genética sobre las hipoacusias hereditarias de tipos DFNB16, DFNB21 y DFNB77 en poblaciones europeas, que no han sido analizadas hasta la fecha.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden extraerse de este trabajo son:

1. Hemos identificado en una familia dos mutaciones en el gen *TECTA* responsables de hipoacusia no sindrómica: c.2654A>G (p.Asn886Ser) y c.51dupT (p.Val18Cysfs*18). La mutación c.2654A>G (p.Asn886Ser) es un alelo hipomórfico que por sí solo es responsable de hipoacusia dominante DFNA8/12, con pérdida auditiva leve en las frecuencias medias y altas y de aparición tardía, mientras que cuando se encuentra en heterocigosis compuesta con la mutación inactivante c.51dupT (p.Val18Cysfs*18) causa hipoacusia recesiva de tipo DFNB21, con pérdida auditiva moderada o severa que afecta a todas las frecuencias.
2. Hemos identificado las primeras mutaciones en el gen *OTOG* responsables de hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva: c.6347C>T (p.Pro2116Leu) y c.6559C>T (p.Arg2187*), en heterocigosis compuesta. Los individuos afectados presentan sordera bilateral, moderada y estable, así como disfunción vestibular. Nuestros resultados han sido confirmados por el trabajo realizado en paralelo por nuestros colaboradores del equipo de la Dra. Kremer (Universidad Radboud de Nimega).
3. Hemos identificado las mutaciones en el gen *Otog* responsables de la sordera y disfunción vestibular de las cuatro estirpes de ratón *twister* disponibles en The Jackson Laboratory: c.1952+2T>A (estirpe *Otog*^{twi-2J}); c.509G>T (p.Glu170*) (estirpe *Otog*^{twi-3J}); y c.3454C>T (p.Arg1152*) (estirpes *Otog*^{twi-4J} y *Otog*^{twi-5J}). Todas ellas son claramente inactivantes.
4. La prevalencia de la hipoacusia DFNB21 y de la hipoacusia provocada por mutaciones en el gen *OTOG* no es elevada en la población española. El gen *TECTB* no ha sido validado como gen responsable de hipoacusia no sindrómica de herencia recesiva en este estudio.
5. Hemos desarrollado un nuevo protocolo diagnóstico para la detección de mutaciones en el gen *STRC* sin interferencias del ψ *STRC* basado en cuatro pruebas independientes: RFLP de los exones 23 y 29, AFLP del exón 23, dos PCRs solapantes de largo recorrido y PCR cuantitativa.
6. Dada la frecuencia de deleciones de ambos alelos del gen *STRC* que hemos detectado en nuestra muestra de la población española, el gen *STRC* debe ser examinado en casos de sordera hereditaria de intensidad moderada.

7. Hemos descrito en una familia dos nuevas mutaciones inactivantes en el gen *LOXHD1* responsables de hipoacusia DFNB77: c.3914_3920del (p.Val1306Thfs*57) y c.512-1G>A ambas en homocigosis. La hipoacusia de tipo DFNB77 no es frecuente en población española.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abnet CC, Freeman DM (2000). Deformations of the isolated mouse tectorial membrane produced by oscillatory forces. *Hear. Res.* 144:29-46.
2. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods.* 7:248-9.
3. Ahmed ZM, Smith TN, Riazuddin S, Makishima T, Ghosh M, Bokhari S, Menon PS, Deshmukh D, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB, Wilcox ER (2002). Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of *USH1C*. *Hum. Genet.* 110:527-31.
4. Alasti F, Sanati MH, Behrouzifard AH, Sadeghi A, de Brouwer AP, Kremer H, Smith RJ, Van Camp G (2008). A novel *TECTA* mutation confirms the recognizable phenotype among autosomal recessive hearing impairment families. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 72:249-55.
5. Aleem AM, Janjun J, Dignam JD, Walther M, Kuhn H, Svergun DI and Skrzypczak-Jankun E (2008). Human platelet 12-lipoxygenase, new findings about its activity, membrane binding and low-resolution structure. *J. Mol. Biol.* 376, 193-209.
6. Alloisio N, Morlé L, Bozon M, Godet J, Verhoeven K, Van Camp G, Plauchu H, Muller P, Collet L, Lina-Granade G (1999). Mutation in the zonadhesin-like domain of alpha-tectorin associated with autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *Eur J Hum. Genet.* 7:255-8.
7. Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattani D, Pariente A, Thulliez M, Borot N, Moati L, Barthelme A, Shalmon L, Krasnov T, Ben-Asher E, Olender T, Khen M, Yaniv I, Zaizov R, Shalev H, Delaunay J, Fellous M, Lancet D, Beckmann JS (2003). *CATSPER2*, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 11:497-502.
8. Azaiez H, Yang T, Prasad S, Sorensen JL, Nishimura CJ, Kimberling WJ, Smith RJ (2007). Genotype-phenotype correlations for *SLC26A4*-related deafness. *Hum. Genet.* 122, 451-457.

9. Balciuniene J, Dahl N, Jalonen P, Verhoeven K, Van Camp G, Borg E, Pettersson U, Jazin EE (1999). Alpha-tectorin involvement in hearing disabilities: one gene-two phenotypes. *Hum. Genet.* 105:211-6.
10. Bateman A and Sandford R (1999). The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr. Biol.* 9, R588-R590.
11. Berezin C, Glaser F, Rosenberg J, Paz I, Pupko T, Fariselli P, Casadio R, Ben-Tal N (2004). ConSeq: the identification of functionally and structurally important residues in protein sequences. *URL: <http://conseq.bioinfo.tau.ac.il/>. *Bioinformatics.* 20, 1322-1324.*
12. Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden, Perveen R, Cousin P, Sutphin JE, Noble B, Batterbury M, Kielty C (2001). Missense mutations in *COL8A2*, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2415-2423.
13. Capriotti E and Altman RB (2011). Improving the prediction of disease-related variants using protein three-dimensional structure. *BMC Bioinformatics.* 12: S3.
19. Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Leibovici M, Petit C (1997). Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14450-14455.
20. Collin RW, de Heer AM, Oostrik J, Pauw RJ, Plantinga RF, Huygen PL, Admiraal R, de Brouwer AP, Strom TM, Cremers CW, Kremer H (2008). Mid-frequency DFNA8/12 hearing loss caused by a synonymous *TECTA* mutation that affects an exonic splice enhancer. *Eur. J. Hum. Genet.* 16:1430-6.
21. Cryns K, Sivakumaran TA, Van den Ouweland JMW, Pennings RJE, Cremmers CWRJ, Flothmann K, Young TL *et al.* (2003). Mutational spectrum of the *WFS1* gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus and psychiatric disease. *Hum. Mutat.* 22:275-287.
22. Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PLM, Moreno F, del Castillo I, Chamberlin Parker G, Azaiez H, Prasad S, Cucci RA, Leonardi E, Snoeckx RL, Govaerts PJ, Van de

- Heyning PH, Van de Heyning CM, Smith RJH, Van Camp G (2004) A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J. Med. Genet* 41:147-154
23. del Castillo FJ, del Castillo I (2011). The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Front. Biosci.* 16:3252-74.
24. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Martín Y, Arellano B, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Ramírez-Camacho R, Cruz Tapia M, Solanellas J, Martínez-Conde A, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I (2008). Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *J. Med. Genet.* 40:632-6.
25. Dallos P, Popper AN, Fay RR (1996). Springer Handbook of Auditory Research Vol. 8. The Cochlea. Ed. Springer.
26. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380, 152-154.
27. Edvardson S, Jalas C, Shaag A, Zenvirt S, Landau C, Lerer I, Elpeleg O (2011). A deleterious mutation in the *LOXHD1* gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. *Am. J. Med. Genet.* 155:1170-2.
28. Francey LJ, Conlin LK, Kadesch HE, Clark D, Berrodin D, Sun Y, Glessner J, Hakonarson H, Jalas C, Landau C, Spinner NB, Kenna M, Sagi M, Rehm HL, Krantz ID (2012). Genome-wide SNP genotyping identifies the Stereocilin (*STRC*) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment. *Am. J. Med. Genet.* 158:298-308.
29. Furness DN, Hackney CM. (1985). Cross-links between stereocilia in the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 18: 177-188.
30. Ghaffari R, Aranyosi AJ, Richardson GP and Freeman DM (2010). Tectorial membrane travelling waves underlie abnormal hearing in *Tectb* mutant mice. *Nat. Communications* 19:1-96.

31. Gold T. Hearing II. The physical basis of the action of the cochlea (1948). *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 135, 492-498.
32. Goodyear RJ, Marcotti W, Kros CJ, Richardson GP (2005). Development and properties of stereociliary links types in hair cells of the mouse cochlea. *J. Comp. Neurol.* 485:75-85.
33. Gottsch JD, Sundin OH, Liu SH, Jun AS, Broman KW, Stark WJ, Vito EC, Narang AK, Thompson JM and Magovern M (2005). Inheritance of a novel *COL8A2* mutation deafness a distinct early-onset subtype of fuchs corneal dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 1934-1939.
34. Gueta R, Tal E, Silverg Y, Rouso I. (2007). The 3D structure of the tectorial membrane determined by second-harmonic imaging microscopy. *J. Struct. Biol.* 159: 103-110.
35. Gueta R, Barlam D, Shneck R, Rouso I. (2008). Sound-evoked deflections of outer hair cells stereocilia arise from tectorial membrane anisotropy. *Biophys. J.* 94:4570-4576.
36. Guyton AC, Hall JR. Compendio de Fisiología Médica. 11ª Edición. Editorial Mosby. (2007).
37. Grillet N, Schwander M, Hildebrand MS, Sczaniecka A, Kolatkar A, Velasco J, Webster JA, Kahrizi K, Najmabadi H, Kimberling W, Stephan D, Bahlo M, Wiltshire T, Tarantino L, Kuhn P, Smith R, Muller U (2009). Mutations in *LOXHD1*, an Evolutionarily Conserved Stereociliary Protein, Disrupt Hair Cell Function in Mice and Cause Progressive Hearing Loss in Humans. *Am. J. Hum. Gen.* 85, 328–337.
38. Hilgert N, Huentelman MJ, Thorburn AQ, Fransen E, Dieltjens N, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Skorka A, Waligora J, Ploski R, Castorina P, Primignani P, Ambrosetti U, Murgia A, Orzan E, Pandya A, Arnos K, Norris V, Seeman P, Janousek P, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Nishimura CJ, Janecke A, Nekahm-Heis D, Martini A, Mennucci E, Tóth T, Sziklai I, del Castillo, I, Moreno F, Petersen MB, Iliadou V, Tekin

- M, Incesulu A, Nowakowska E, Bal J, van de Heyning P, Roux AF, Blanchet C, Goizet C, Lancelot G, Fialho G, Caria H, Liu XZ, Xiaomei O, Govaerts P, Grønskov K, Hostmark K, Frei K, Dhooge I, Vlaeminck S, Kunstmann E, van Laer L, Smith RJ, Van Camp G (2009). 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.* 17, 517-524.
39. Hildebrand MS, Morín M, Meyer NC, Mayo F, Modamio-Hoybjør S, Mencía A, Olavarrieta L, Morales-Angulo C, Nishimura CJ, Workman H, DeLuca AP, del Castillo I, Taylor KR, Tompkins B, Goodman CW, Schrauwen I, Wesemael MV, Lachlan K, Shearer AE, Braun TA, Huygen PL, Kremer H, Van Camp G, Moreno F, Casavant TL, Smith RJ, Moreno-Pelayo MA. (2011). DFNA8/12 caused by *TECTA* mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Hum. Mutat.* 32:825-34.
40. Hubbard A. (1993). A traveling-wave amplifier model of the cochlea. *Science* 259, 68-71.
41. Iwasaki S, Harada D, Usami S, Nagura M, Takeshita T, Hoshino T (2002). Association of clinical features with mutation of *TECTA* in a family with autosomal dominant hearing loss. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 128:913-7.
42. Jain PK, Lalwani AK, Li XC, Singleton TL, Smith TN, Chen A, Deshmukh D, Verma IC, Smith RJ, Wilcox ER (1998). A gene for recessive nonsyndromic sensorineural deafness (DFNB18) maps to the chromosomal region 11p14-p15.1 containing the Usher syndrome type 1C gene. *Genomics.* 50:290-2.
43. Jovine L, Park J, Wassarman PM (2002). Sequence similarity between stereocilin and otoancorin points to a unified mechanism for mechanotransduction in the mammalian inner ear. *BMC Cell Biol.* 25;3:28.
44. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerisation of extracellular proteins. *Nat. Cell. Biol.* 4:457-461.
45. Kenna MA (2003). Neonatal hearing screening. *Pediatr. Clin. N. Am.* 50:301-313.

46. Kennedy HJ, Evans MG, Crawford AC, Fettiplace R (2006). Depolarization of cochlear outer hair cells evokes active hair bundle motion by two mechanisms. *J. Neurosci.* 26, 2757-2766.
47. Knijnenburg J, Oberstein SA, Frei K, Lucas T, Gijssbers AC, Ruivenkamp CA, Tanke HJ, Szuhai K. (2009). A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. *J. Med. Genet.* 46:412-7.
48. Kozlov AS, Risler T, Hüsperth AJ (2007). Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels. *Nat. Neurosci.* 10:87-92.
49. Kornberg A and Baker J (1991). DNA Replication Cap. 1. Págs. 28-29
50. Legan PK, Lukashkina VA, Goodyear RJ, Kossi M, Russell IJ, Richardson GP (2000). A targeted deletion in alpha-tectorin reveals that the tectorial membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. *Neuron* 28:273-285.
51. Legan PK, Lukashkina VA, Goodyear RJ, Nukashkin AN, Verhoeven K, Van Camp G, Russell IJ & Richardson G (2005). A deafness mutation isolates a second role for the tectorial membrane in hearing. *Nat. Neurosci.* 8: 1035-1042.
52. Leibovici M, Safieddine S, Petit C (2008). Mouse models for human hereditary deafness. *Curr. Top. Dev. Biol.* 84, 385-429.
53. Lezirovitz K, Batissoco AC, de Lima FT, Balester de Mello Auricchio MT, Lima Dantas VG, Oiticiza J, Mingroni Netto RG (2011). Splice donor site deletion in the *TECTA* gene causing autosomal dominant deafness in a Brazilian family. Póster el 8th Molecular Biology of Hearing and Deafness, Hinxton.

54. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE (1993). Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am. J. Med. Genet.* 46:486-491.
55. Meyer NC, Nishimura CJ, McMordie S, Smith RJ (2007). Audioprofiling identifies *TECTA* and *GJB2*-related deafness segregating in a single extended pedigree. *Clin. Genet.* 72:130-7.
56. Meyer NC, Alasti F, Nishimura CJ, Imanirad P, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Kochakian N, Jamali P, Van Camp G, Smith RJH, Najmabadi H (2007) Identification of three novel *TECTA* mutations in Iranian families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment at the DFNB21 locus. *Am. J. Med. Genet.* 143A:1623-1629.
57. Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Villamar M, Romero L, Hernández-Calvín FJ, Herraiz C, Barberá R, Navas C, Moreno F (2001). A cysteine substitution in the zona pellucida domain of alpha-tectorin results in autosomal dominant, postlingual, progressive, mid frequency hearing loss in a Spanish family. *J. Med. Genet.* 38:E13
58. Moreno-Pelayo MA, Goodyear RJ, Mencía A, Modamio-Høybjør S, Legan PK, Olavarrieta L, Moreno F, Richardson GP(2008). Characterization of a spontaneous, recessive, missense mutation arising in the *Tecta* gene. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 9:202-14.
59. Morton NE (1991). Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. NY. Acad. Sci.* 630:16-31.
60. Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S, El-Zir E, Beckmann JS, Loiselet J, Petit C (1999). An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum. Mol. Genet.* 8:409-12.
61. Nadeau JH (2005) Listening to genetic background noise. *N. Engl. J. Med.* 352:198-1599.
62. Nadol JB (1993). Hearing loss. *N. Engl. J. Med.* 329:1092-1102.

63. Naylor CE, Eaton JT, Howells A, Justin N, Moss DS, Titvall RW and Basak AK. (1998) Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat. Struc. Biol.* 5:738-746.
64. Naz S, Alasti F, Mowjoodi A, Riazuddin S, Sanati MH, Friedman TB, Griffith AJ, Wilcox ER, Riazuddin S (2003). Distinctive audiometric profile associated with DFNB21 alleles of *TECTA*. *J. Med. Genet.* 40:360-363
65. Ng PC and Henikoff S (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 11:863-74.
66. Osborne MP, Comis SD, Pickles JO (1998). Further observations of the fine structure of the tip links between stereocilia of the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 35: 99-108.
67. Peck B, Gagnon LH, Kane KL, Johnson KR (2010). Four new mutant alleles of the otogelin (*Otog*) gene. *M.G. I.*
68. Petit C, Levilliers J, Hardelin JP (2001). Molecular genetics of hearing loss. *Annu. Rev. Genet.* 35:589-646.
69. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:2002-2007
70. Pfister M, Thiele H, Van Camp G, Fransen E, Apaydin F, Aydin O, Leistenschneider P, Devoto M, Zenner HP, Blin N, Nürnberg P, Ozkarakas H, Kupka S (2004). A genotype-phenotype correlation with gender-effect for hearing impairment caused by *TECTA* mutations. *Cell Physiol. Biochem.* 14:369-76.
71. Plantinga RF, Cremers CW, Huygen PL, Kunst HP, Bosman AJ (2007). Audiological evaluation of affected members from a Dutch DFNA8/12 (*TECTA*) family. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 8:1-7.
72. Riazuddin SA, Vithana EN, Seet LF, Liu Y, Al-Saif A, Koh LW, Heng YM, Aung T, Meadows DN, Eghrari AO *et al.*, (2010). Missense mutations in the sodium borate cotransporter *SLC4A11* cause late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Hum. Mutat.* 31, 1261-1268.

73. Richardson GP, Russell IJ, Duance VC, Balley AJ (1987). Polypeptide composition of the mammalian tectorial membrane. *Hear. Res.* 25, 45-60.
74. Richardson GP, Lukashkin AN, and Russell IJ (2008). The tectorial membrane: One slice of a complex cochlear sandwich. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 16: 458-464.
75. Richardson GP, Boutet de Monvel J and Petit C. How the genetics of deafness illuminates auditory physiology (2011). *Annu. Rev. Physiol.* 73:311-334.
76. Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, Arslan E, Medá C, Curet C, Völter C, Sainz-Quevedo M, Castorina P, Ambrosetti U, Berrettini S, Frei K, Tedín S, Smith J, Cruz Tapia M, Cavallé L, Gelvez N, Primignani P, Gómez-Rosas E, Martín M, Moreno-Pelayo MA, Tamayo M, Moreno-Barral J, Moreno F, del Castillo I (2008). A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (*OTOF*) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum. Mutat.* 29, 823-831
77. Russel IJ *et al.*(2007). Sharpened cochlear tuning in a mouse with a genetically modified tectorial membrane. *Nat. Neurosci.* 10, 215-223.
78. Sagong B, Park R, Kim YH, Lee KY, Baek JI, Cho HJ, Cho IJ, Kim UK, Lee SH (2010). Two novel missense mutations in the *TECTA* gene in Korean families with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 40:380-385.
79. Sagong B, Park HJ, Lee KJ, Kim UK (2012) Identification and functional characterization of novel compound heterozygotic mutations in the *TECTA* gene. *Gene.* 492:239-43.
80. Schulze J (2009). *LRTOMT*: a new tone in understanding the symphony of nonsyndromic deafness. *Clin. Genet.* 75, 227-229.
81. Schwander M, Kachar B, Müller U (2010). The cell biology of hearing. *J. Cell. Biol.* 190: 9-20.

82. Simmler MC, Zwaenepoel I, Verpy E, Guillaud L, Elbaz C, Petit C, Panthier JJ (2000). *Twister* mutant mice are defective for otogelin, a component specific to inner ear acellularmembranes. *Mamm. Genome*. 11:961-966.

83. Simmler MC, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Guillaud L, Benichou JC, Petit C, Panthier JJ (2000). Targeted disruption of *Otog* results in deafness and severe imbalance. *Nat. Genet.* 24, 139-143.

84. Snoecks RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F *et al.* (2005). *GJB2* Mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am. J. Hum. Genet.* 77:945-957.

85. Steel KP. (1995). Inherited hearing defects in mice. *Annu. Rev. Genet.* 29:675-701.

86. Toriello HV, Reardon W, Gorlin RJ (2004). Hereditary hearing loss and its syndromes 2^a ed. Oxford monographs on medical genetics n° 50. Oxford University Press.

87. Tsuprun V, Santi P (2002). Structure of the outer hair cell stereocilia side and attachment links in the chinchilla cochlea. *J. Histochem. Cytochem.* 50:493-502.

88. Van Camp G, Smit RJH (2009). Hereditary Hearing Loss Homepage. URL: <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>.

89. Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, Legan PK, Hughes DC, Schattelman I, Verstreken M, Van Hauwe P, Coucke P, Chen A, Smith RJ, Somers T, Offeciers FE, Van de Heyning P, Richardson GP, Wachtler F, Kimberling WJ, Willems PJ, Govaerts PJ, Van Camp G (1998). Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat. Genet.* 19:60-2. Erratum in: *Nat Genet* 1999, 21:449.

90. Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovici M, Hutchin TP, del Castillo I, Nouaille S, Blanchard S, Lainé S, Popot J, Moreno F, Mueller RF, Petit C (2001). Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat. Genet.* 29:345-349.

91. Verpy E, Weil D, Leibobici M, Goodyear RJ, Hamad G, Houdon C, Lefevre GM, Hardelin JP, Richardson GP, Avan P, Petit C (2008). Stereocilin-deficient mice reveal the origin of cochlear distortion. *Nature* 456:255-258.
92. Verpy E, Leibobici M, Michalski N, Goodyear R, Houdon C, Weil D, Richardson GP and Petit C. (2011). Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J. Comp. Neurol.* 519: 194-210.
93. Villamar M, del Castillo I, Valle N, Romero L, Moreno F (1999). Deafness locus DFNB16 is located on chromosome 15q13-q21 within a 5-cM interval flanked by markers D15S994 and D15S132. *Am. J. Hum. Genet.* 64:1238-41.
94. von Békésy G. Experiments in Hearing. McGraw-Hill; New York: (1960).
95. Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H, Haika S, Lee MK, Kanaan M, King MC, Avraham KB (2002). From flies' eyes to our ears: Mutations in a human class III Myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:7518-23.
96. Weaver SP, Schweitzer L (1994). A radial gradient of fibril density in the gerbil tectorial membrane. *Hear. Res.* 76:1-6.
97. Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE (2008). Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum. Mutat.* 29, 6-13.
98. Willems PJ (2000). Genetic causes of hearing loss. *N. Engl. J. Med.* 342:1101-1109.
99. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C (1999). A mutation in *OTOF*, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat. Genet.* 21: 363-369.
100. Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N, Kahrizi K, Zanganeh M, Lohr NJ, Mohseni M, Mojahedi F, Daneshi A, Najmabadi H, Smith RJ (2007). Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J. Med. Genet.* 44:233-40.

ARTÍCULOS

Artículos firmados por el doctorando, directamente relacionados con este trabajo de tesis

Schraders M, **Ruiz-Palmero L**, Kalay E, Ostrik J, del Castillo FJ, Sergin O, Beynon A, Strom TM, Pennings RJE, Oonk MM, Kunst PM, Domínguez-Ruiz M, García-Arumi AM, del Campo M, Villamar M, Hoefsloot H, Moreno F, Admiraal RJC, del Castillo I, Kremer H. (2012) Mutations of the gene encoding otogelin (*OTOG*) are a cause of autosomal recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* En prensa.

Ruiz-Palmero L, del Castillo FJ, Villamar M, Garrido G, Gómez-Rosas E, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I. Identification of two novel *LOXHD1* mutations responsible for DFNB77 hearing impairment. Manuscrito en preparación.

Ruiz-Palmero L, Gandía M, Gómez-Rosas E, Villamar M, Moreno F, del Castillo I, del Castillo FJ. Novel genetic tools to screen for deafness-causing mutations in the tandemly duplicated region that contains the *STRC* (stereocilin) gene and pseudogene. Manuscrito en preparación.