



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE HIPOACUSIAS  
NO SINDRÓMICAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS  
EN FAMILIAS ARGENTINAS.**

**TESIS DOCTORAL**

**SARA ROMINA CHARAF HASBANI**

Madrid, 2013

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE HIPOACUSIAS  
NO SINDRÓMICAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS  
EN FAMILIAS ARGENTINAS.**

Memoria que presenta **Sara Romina Charaf Hasbani**

Licenciada en Biología para optar al grado de  
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis

Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino

Unidad de Genética Molecular

Hospital Universitario Ramón y Cajal

Unidad de Genética Molecular

Hospital Universitario Ramón y Cajal

Madrid, 2013

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

**CERTIFICA,**

Qué Doña **Sara Romina Charaf Hasbani** ha realizado bajo su dirección el Trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "**ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE HIPOACUSIAS NO SINDRÓMICAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS EN FAMILIAS ARGENTINAS**".

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

En Madrid, a 6 de febrero de 2013

Fdo: Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino

Director de Tesis

Unidad de Genética Molecular

Hospital Ramón y Cajal, Madrid

## AGRADECIMIENTOS

**Con todo mi cariño  
a mis padres Graciela y  
Jaime que siempre me han  
dado todo su apoyo  
y amor.**

A fines de 2008 emprendí un maravilloso viaje en el "barco de la vida". Salida: Buenos Aires. Destino: Madrid. Mucha gente por conocer, lugares por visitar y aromas un tanto familiares que a lo largo de estos 4 años me acompañaron día a día. Poco a poco y con la ayuda de mi "castellano" iba recogiendo sonrisas por el camino. Todos, absolutamente todos han puesto su granito de arena en esta tesis, otros montañas y no faltaron las piedras. En todo viaje, hasta que uno emprende el regreso, se viven miles de situaciones. Sobrinos nacer y crecer, familiares que no están y otros que con mucho esfuerzo lograron salir adelante. Esta tesis no solo me enseñó a conocer el fascinante mundo del oído, sino a asentar conocimientos, reforzar valores, cosechar amistades, valorar las cosas simples de la vida y reconocer a cada una de las personas (de Argentina y España) que por casualidad o causalidad se cruzaron en este camino y han contribuido en la realización de este trabajo.

- Quiero agradecer al Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación- Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (MAEC-AECID) por la concesión de la beca (2008-2012).

-A todos los pacientes, familiares, doctores y especialistas que han colaborado desinteresadamente en este estudio (Cuky Nahas, Rosario García, Fga Margarita Pastoriza-Ferro, Dra Silvia Graffiña, Dr Kahan, Patricia Granados, Marcela Fernández, Lic. Miryam Reyes, Dr Adrián Mutto, Dra Mabel Segovia,...)

-Al Dr Felipe Moreno: quiero expresarle especial gratitud y el más sincero cariño. No olvidaré jamás...allá por el año 2006 cuando lo contacté desde Buenos Aires. Siempre dispuesto a ayudar en lo que fuese necesario...moviendo cielo y tierra. Gracias por tener siempre la puerta abierta de su despacho y solucionar todo tipo de problemas que han surgido en este periodo. Ha demostrado en todo momento su gran amistad!!!.

-Al Dr Ignacio del Castillo: por su dedicación en la dirección de esta tesis, por sus acertados consejos y porque a pesar de todo, quiero darle las gracias por haberme dado la posibilidad de ser su becario en estos años, dándome la oportunidad de tener una visión más amplia y crítica en el mundo de la investigación.

-Dra Mabel Segovia: porque sin ella hoy no estaría aquí. Por confiar en mí y embarcarnos juntas en este proyecto. Por los días dedicados a viajar para entrevistar a los pacientes y por su incondicional amistad.

- Dra. Begoña Fernández Calvin: por su inestimable ayuda. Por ser mi tutora del programa de doctorado de la Universidad y dedicarme su tiempo y profesionalidad.

-Dra Manuela Villamar: compañera de laboratorio y testigo de infinitos momentos. Por alentarme, por respetar mis silencios y reírse de mis alegrías.

- Lolo: un simple gracias creo que no alcanzaría para reconocer todo lo que has hecho por mí en estos años. Desde las secuencias, el genotipado, el *dHPLC* hasta prestarme un oído y siempre dispuesta a escuchar y ayudarme a resolver las dificultades para analizar mis muestras. Gracias Lolo!!!

-A los Dres Francisco del Castillo, Miguel Ángel Moreno-Pelayo, Concepción Hernández-Chico: porque a pesar de no ser mis directores, admiro la dedicación que tienen con su grupo.

-A Dra Montserrat Rodríguez-Ballesteros: por asesorarme y ayudarme en el estudio de la otoferlina.

-A María Domínguez-Ruíz: siempre dispuesta a ayudar. Desde mis primeros días en el laboratorio 9, trámites en la facultad, compañera de banco en el programa de doctorado, recomendarme con su tutora apenas sin conocerme y hasta el día de hoy, en todo lo que haga falta. Gracias May ill!

A todos mis compañeros de la Unidad (los que están y los que estuvieron): Rosa, Merche, Marta C., José Luis, Susana, Matías, Fernando, Ángeles, Lucía, Eli, Yoli, Germán, Alba, Fran, Ana, Nati, Gema, Elena, Marta, Laura, Gloria, Cristina, Tamara, María José, Luis, Humberto....

-A Luciana Serrao de Castro: Por todos los momentos indescriptibles que hemos compartido: risas, viajes, llantos, charlas y silencios. Por toda tu amistad y paciencia.

Hasta aquí, todos fueron muy importantes, pero las personas que nombraré a continuación fueron y son los pilares fundamentales para que hoy esté frente a esta hoja.

-A mi Abuela: creo que estas tres palabras resumen todo: GRACIAS POR ESPERARME.

-A mis hermanos Martín y Marcelo, por estar siempre a pesar de la distancia, compartiendo cada momento de nuestras vidas. A Judy y a mis sobrinos Ian, Sol y Ciro...simplemente porque los amo. Con solo decir tres palabras mágicas "tía ¿cuánto falta?" era suficiente para encauzar el río más turbulento. Mil gracias!!!

-A Marcelo por regalarme una nueva manera de mirar las cosas más simples y a enseñarme a entender a un otro con la mente del otro. Gracias por todo tu ser y dejarme ver la vida con la claridad de tu mirada. Por tu infinita paciencia de esperar y creer en mi palabra ese día...el más difícil...aún sin saber cuándo llegaría !!!

-A mis Padres (Graciela y Jaime): Simplemente GRACIAS. Gracias por los valores que nos inculcaron a mis hermanos y a mí. Gracias por enseñarnos que hay que luchar por nuestros sueños, cueste lo que cueste y dure lo que dure, sin desviarse del camino. Gracias por la

eterna paciencia, sabios consejos y conversaciones alentando hasta el último minuto, sin importar los días y la diferencia horaria.

-A mi persona, por haber llegado hasta aquí con entereza.

Solo resta decir que..Una hermosa etapa se termina, pero otra hermosa etapa está por comenzar...

Muchas Gracias a todos....

"Mi Buenos Aires querido,

cuando yo te vuelva a ver,

no habrá más penas

ni olvidos..."



## INDICE





	Páginas
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Audición.....	3
1.1 Aspectos generales.....	3
1.2 Anatomía del oído humano.....	3
1.3 Fisiología del oído humano.....	7
1.4 Hipoacusia.....	8
1.4.1 Clasificación de las hipoacusias.....	8
1.4.2 Epidemiología de la hipoacusia.....	9
1.4.3 Problemática del estudio de la hipoacusia hereditaria no sindrómica.....	11
1.4.4 Diagnóstico genético de la hipoacusia no sindrómica.....	12
❖ Los beneficios y la problemática del diagnóstico en la población argentina.....	12
2. <b>Locus DFNB1: genes <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i></b> .....	13
2.1 Genes <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i> y sus mutaciones.....	14
2.2 Proteínas Conexinas.....	16
2.3 Conexinas y Uniones comunicantes en el oído interno.....	18
3. <b>Locus DFNB9 (gen <i>OTOF</i>)</b> .....	19
3.1 Gen <i>OTOF</i> y sus mutaciones.....	19
3.2 Proteína Otoferlina.....	21
3.3 Otoferlina en el oído interno.....	22
4. <b>Locus DFNB16 (gen <i>STRC</i>)</b> .....	23
4.1 Gen <i>STRC</i> .....	23
4.2 Proteína Estereocilina.....	23
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>1-Pacientes.....</b>	<b>31</b>
❖ Familias incluidas en el estudio.....	31
<b>2-Métodos Generales.....</b>	<b>31</b>
2.1 Obtención de ADN genómico y su análisis.....	31
2.2 Cuantificación del ADN obtenido.....	31
2.3 Diseño de cebadores.....	31
2.4 Amplificación de ADN por PCR.....	32
2.5 Purificación del producto de PCR.....	33
2.6 Secuenciación de ADN.....	33
2.7 Análisis de las secuencias.....	33
2.8 Nomenclatura y análisis de los cambios identificados.....	33
2.9 Ensayos de minisequenciación ( <i>SNaPShot</i> ).....	34
❖ Amplificación y PCR- <i>SNaPShot</i> .....	34

2.10 Genotipado para marcadores moleculares de tipo microsatélite.....	35
2.10.1 Preparación de las muestras para el genotipado.....	35
2.10.2 Análisis de haplotipos.....	35
<b>3 Locus DFNB1 (gen <i>GJB2</i>).....</b>	<b>36</b>
3.1 Ensayo de minisequenciación ( <i>SNaPshot</i> ).....	36
3.1.1 Ensayo 1 de minisequenciación.....	36
3.1.1.1 Amplificación de ADN por PCR.....	36
3.1.1.2 Amplificación por PCR- <i>SNaPshot</i> .....	36
3.1.2 Ensayo 2 de minisequenciación.....	36
3.1.2.1 Amplificación de ADN por PCR.....	36
3.1.2.2 Amplificación por PCR- <i>SNaPshot</i> .....	37
3.2 Secuenciación de la región promotora, exón 1 y exón 2 del gen <i>GJB2</i> .....	37
<b>4 Locus DFNB1 (gen <i>GJB6</i>).....</b>	<b>37</b>
❖ Ensayo para detectar las mutaciones del( <i>GJB6</i> -D13S1830) y del( <i>GJB6</i> -D13S1854).....	37
<b>5 Locus DFNB9 (gen <i>OTOF</i>).....</b>	<b>38</b>
5.1 Ensayo <i>RFLP</i> para detectar la mutación p.(Gln829*).....	38
5.2 Análisis de fragmentos para detectar la mutación c.2905_2923delinsCTCCGAGCGCA.....	39
5.3 Ensayo de minisequenciación ( <i>SNaPshot</i> ). Detección de la mutación IVS35+1G>T.....	39
5.4 Ensayo de minisequenciación ( <i>SNaPshot</i> ). Detección de la mutación p.(Asp1563Asn).....	40
5.5 Análisis de haplotipos.....	40
5.6 Secuenciación del gen <i>OTOF</i> .....	40
<b>6 Locus DFNB16 (gen <i>STRC</i>).....</b>	<b>41</b>
6.1 Detección de deleciones en la región que contiene el gen <i>STRC</i> . Ensayo de PCR múltiple del marcador D15S784.....	41
6.2 Ensayo de detección mediante PCR- <i>AFLP</i> .....	41
6.3 Análisis de haplotipos.....	42
<b>7 Locus DFNB3 (gen <i>MYO15A</i>).....</b>	<b>42</b>
❖ Análisis de haplotipos.....	42
<b>8 Locus DFNB4 (gen <i>SLC26A4</i>).....</b>	<b>42</b>
8.1 Análisis de haplotipos.....	42
8.2 Ensayo <i>RFLP</i> para detectar la mutación p.(Ala310Val).....	43
8.3 Secuenciación del gen <i>SLC26A4</i> .....	43
<b>9 Locus DFNB6 (gen <i>TMIE</i>).....</b>	<b>45</b>
❖ Secuenciación.....	45
<b>10 Locus DFNB7/11 (gen <i>TMCI</i>).....</b>	<b>45</b>
10.1 Análisis de haplotipos.....	45
10.2 Secuenciación.....	45
<b>11 Locus DFNB12 (gen <i>CDH23</i>).....</b>	<b>47</b>

	Páginas
11.1 Análisis de haplotipos.....	47
11.2 Secuenciación.....	47
<b>12 Locus DFNB21 (gen <i>TECTA</i>).....</b>	<b>49</b>
❖ Análisis de haplotipos.....	49
<b>13 Locus DFNB23 (gen <i>PCDH15</i>).....</b>	<b>50</b>
❖ Análisis de haplotipos.....	50
<b>14 Locus DFNB28 (gen <i>TRIOBP</i>).....</b>	<b>50</b>
❖ Análisis de haplotipos.....	50
<b>15 Locus DFNB29 (gen <i>CLDN14</i>).....</b>	<b>50</b>
❖ Secuenciación.....	50
<b>16 Locus DFNB37 (gen <i>MYO6</i>).....</b>	<b>51</b>
❖ Análisis de haplotipos.....	51
<b>17 Locus DFNB59 (gen <i>PJVK</i>).....</b>	<b>51</b>
17.1 Análisis de haplotipos.....	51
17.2 Secuenciación.....	52
<b>18 Locus DFNB67 (gen <i>TMHS</i>).....</b>	<b>52</b>
❖ Secuenciación.....	52
<b>19 Locus DFNB73 (gen <i>BSND</i>).....</b>	<b>53</b>
❖ Secuenciación.....	53
<b>20 Locus DFNB91 (gen <i>SERPINB6</i>).....</b>	<b>53</b>
20.1 Análisis de haplotipos.....	53
20.2 Secuenciación.....	53
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Hipoacusia de tipo DFNB1.....</b>	<b>57</b>
1.1 Cribado por minisequenciación en <i>GJB2</i> .....	57
1.2 Secuenciación de la región promotora, Exón 1 y Exón 2 del gen <i>GJB2</i> .....	58
1.3 Cribado mediante ensayo de detección de dos deleciones en <i>GJB6</i> .....	60
1.4 Correlación genotipo-fenotipo en el locus DFNB1.....	62
<b>2. Hipoacusia de tipo DFNB9.....</b>	<b>63</b>
2.1 Ensayo <i>RFLP</i> para detectar la mutación p.(Gln829*).....	63
2.2 Genotipado. Análisis de fragmentos para detectar la mutación c.2905_2923delinsCTCCGAGCGCA.....	66
2.3 Ensayo de minisequenciación ( <i>SNaPShot</i> ). Detección de la mutación IVS35+1G>T.....	66
2.4 Análisis de haplotipos.....	68
2.5 Correlación Genotipo-Fenotipo.....	71
<b>3. Hipoacusias de tipo DFNB16 (<i>STRC</i>).....</b>	<b>71</b>
3.1 Ensayo de PCR múltiple para la detección de deleciones en el gen <i>STRC</i> .....	71
3.2 Ensayo de detección mediante PCR- <i>AFLP</i> .....	71
3.3 Análisis de haplotipos.....	73
<b>4. Análisis de otros genes.....</b>	<b>74</b>
4.1 Análisis de haplotipos y Secuenciación.....	74

	Páginas
4.2 Secuenciación directa de los genes <i>BSND</i> , <i>TMHS</i> , <i>CLDN14</i> y <i>TMIE</i> .....	77
<b>DISCUSIÓN</b> .....	79
<b>1- Hipoacusia de tipo DFNB1 (<i>locus</i> DFNB1, genes: <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i>)</b> .....	82
<b>2- Hipoacusia de tipo DFNB9</b> .....	87
<b>3- Otros genes de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas</b> .....	90
<b>CONCLUSIONES</b> .....	93
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	97
<b>ARTÍCULOS</b> .....	117

## ABREVIATURAS



- A260:** absorbancia a 260 nanometros
- A280:** absorbancia a 280 nanometros
- aa:** aminoácido
- AFLP:** Polimorfismos en la longitud de fragmentos de amplificación (*Amplification fragment length polymorphism*)
- cM:** centimorgan
- cdNA:** ácido desoxirribonucleico complementario
- ddNTP:** didesoxirribonucleótidos trifosfato
- dNTP:** desoxirribonucleótido trifosfato
- CCE:** célula ciliada externa
- CCI:** célula ciliada interna
- Cen:** centrómero
- CG-RICH:** rico en citosinas y guaninas
- C-ter:** carboxilo terminal
- CNV:** variaciones del número de copia (*Copy Number Variations*)
- dB:** decibelios
- DFN:** sordera (*deafness*)
- DFNA:** *locus* de hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica dominante
- DFNB:** *locus* de hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva.
- DFNX:** *locus* de hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X
- DFNY:** *locus* de hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma Y
- dHPLC:** cromatografía líquida desnaturante de alta resolución (*denaturing High Performance Liquid Chromatography*)
- EDTA:** etilén diamino tetracético.
- EMQN:** *European Molecular Genetics Quality Network*
- FAM:** 6-carboxifluoresceína
- gDNA:** ácido desoxirribonucleico genómico
- GPI:** glicosil-fosfatidil-inositol
- HEX:** hexacloro-6-carboxifluoresceína
- HNSAR:** Hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva
- Hz:** hertzio
- INDEL:** inserción-delección
- kB:** kilo base
- kDa:** kilo Dalton
- LC:** lazo intracelular
- MET:** mecanotransductor
- mM:** milimolar
- Mt:** alelo mutado

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**NGS:** secuenciación de nueva generación

**NMD:** *Nonsense-mediated decay*, degradación de ARNm mediada por codón de parada prematuro

**N-ter:** amino terminal

**OEA:** otoemisiones acústicas

**OMIM:** *Online Mendelian Inheritance in Man*

**ORF:** marco de lectura abierta.

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**PEATC:** Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral

**RFLP:** Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

**SNP:** Polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)

**STS:** marcador no polimórfico (*sequence tagged site*)

**SNaPSHOT:** minisequenciación

**T:** temperatura

**Tel:** telómero

**TM:** dominio transmembranar

**TORCH:** Toxoplasmosis-rubéola-citomegalovirus-herpes

**UTR:** región no traducida (*UnTranslated Region*)

**UTRsfl:** región no traducida de la isoforma corta 1 de la proteína otoferlina.

**wt:** alelo silvestre (*wild type*)

**Ψ :** pseudogén

---

**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 71 y 95 db, debe traducirse como "severa", según convención reconocida por los profesionales del campo de la audiología.

## RESUMEN

## RESUMEN

La hipoacusia es el trastorno sensorial 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 73 *loci* cartografiados y 47 genes identificados. Esta heterogeneidad dificulta el diagnóstico genético-molecular, cuya mejora requiere incrementar nuestro conocimiento sobre la epidemiología genética de las HNSAR, muy poco explorada en la población argentina.

Hemos investigado una cohorte de 117 familias argentinas con HNSAR. Iniciamos el trabajo por la hipoacusia de tipo DFNB1, causada por mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* (conexinas 26 y 30, respectivamente). Mediante secuenciación de *GJB2* y un ensayo de PCR múltiple para la detección de las deleciones de *GJB6* conocidas, hemos elucidado 24 casos (20,51% de los casos de HNSAR en nuestra cohorte). El espectro de mutaciones observado incluye 10 alelos patogénicos. Al menos uno de los seis alelos más frecuentes (c.35delG, p.(Arg143Trp), p.(Val37Ile), c.167delT, del(*GJB6*-D13S1830) y p.(Asn206Ser)) se encuentra en el 100% de los genotipos.

La investigación de la hipoacusia de tipo DFNB9, causada por mutaciones en el gen *OTOF* (otoferlina) permitió elucidar tres casos más (3,26% de los casos de nuestra cohorte). Hemos caracterizado cuatro nuevas mutaciones: c.2153G>A (p.(Trp718\*)), c.3346C>T (p.(Arg1116\*)), c.3480\_3486del (p.(Ile1160Metfs\*10)) y c.4687G>A (p.(Asp1563Asn)). Esta última es la primera mutación conocida que afecta a uno de los residuos de aspartato de un dominio C2 implicados en la unión al calcio.

Además, hemos investigado otros 15 genes, priorizando los cribados de aquellos en los que se han encontrado mutaciones con mayor frecuencia en otras poblaciones, y aquellos cuya frecuencia es menor pero su cribado es menos laborioso por su pequeño tamaño: *MYO15A*, *SLC26A4*, *TMIE*, *TMCI*, *CDH23*, *STRC*, *TECTA*, *PCDH15*, *TRIOBP*, *CLDN14*, *MYO6*, *PJKK*, *TMHS*, *BSND* y *SERPINB6*. Se han estudiado en 8 casos familiares con al menos dos individuos afectados en la misma fratría. Hemos identificado un caso con deleciones de los dos alelos del gen *STRC* (hipoacusia de tipo DFNB16). Además, hemos encontrado un total de 14 variantes de secuencia no patogénicas.

Hemos investigado las correlaciones genotipo-fenotipo en nuestros pacientes elucidados. Las hipoacusias de tipo DFNB1 y DFNB9 son mayoritariamente prelocutivas y profundas. Por su parte, la hipoacusia de tipo DFNB16 es de grado moderado.

Los resultados de este trabajo sientan las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico molecular de HNSAR adaptadas específicamente a la población argentina.

## SUMMARY

Hearing impairment is the most frequent sensory disorder in humans. Autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) is the most frequent subgroup of inherited hearing disorders. ARNSHI is highly heterogeneous, with 73 loci on the genetic map, from which 47 genes have been identified. This heterogeneity hampers the molecular diagnosis, whose improvement needs to increase our knowledge on the genetic epidemiology of ARNSHI, which has been scarcely explored in the Argentinean population.

We have investigated a cohort of 117 Argentinean families with ARNSHI. First we studied the DFNB1 subtype of hearing impairment, which is caused by mutations in the *GJB2* and *GJB6* genes (connexins 26 and 30, respectively). By sequencing *GJB2* and by using a multiplex-PCR assay for the detection of the known *GJB6* deletions, we elucidated 24 cases (20.51% of the ARNSHI cases of our cohort). The spectrum of mutations in our series includes 10 pathogenic alleles. At least one of the six most frequent alleles (c.35delG, p.(Arg143Trp), p.(Val37Ile), c.167delT, del(*GJB6*-D13S1830) and p.(Asn206Ser)) was found in 100% of the genotypes.

Research on the DFNB9 hearing impairment, caused by mutations in the *OTOF* gene (otoferlin), allowed us to elucidate three other cases (3.26 % of the ARNSHI cases of our cohort). We have characterized four novel mutations: c.2153G>A (p.(Trp718\*)), c.3346C>T (p.(Arg1116\*)), c.3480\_3486del (p.(Ile1160Metfs\*10)) and c.4687G>A (p.(Asp1563Asn)). The latter is the first mutation known to affect one of the aspartate residues of a C2 domain involved in calcium binding.

In addition, we investigated 15 other genes, prioritizing the screenings of those in which mutations have been found with higher frequency in other populations, and those whose frequency is not high but their screenings are easy because of their small size: *MYO15A*, *SLC26A4*, *TMIE*, *TMCI*, *CDH23*, *STRC*, *TECTA*, *PCDH15*, *TRIOBP*, *CLDN14*, *MYO6*, *PJVK*, *TMHS*, *BSND* and *SERPINB6*. We studied 8 familial cases with at least two affected siblings. We identified one case with deletion of the two alleles of the *STRC* gene (DFNB16 hearing impairment). In addition, we found 14 non-pathogenic sequence variants.

We investigated the genotype-phenotype correlations in our elucidated patients. The DFNB1 and DFNB9 subtypes of ARNSHI are mainly prelingual and profound. On the contrary, DFNB16 hearing impairment is moderate.

The results of this work set the bases for the development of novel strategies for the molecular diagnosis of ARNSHI, specifically adapted to the Argentinean population.

## INTRODUCCIÓN







## 1. Audición.

### 1.1 Aspectos generales.

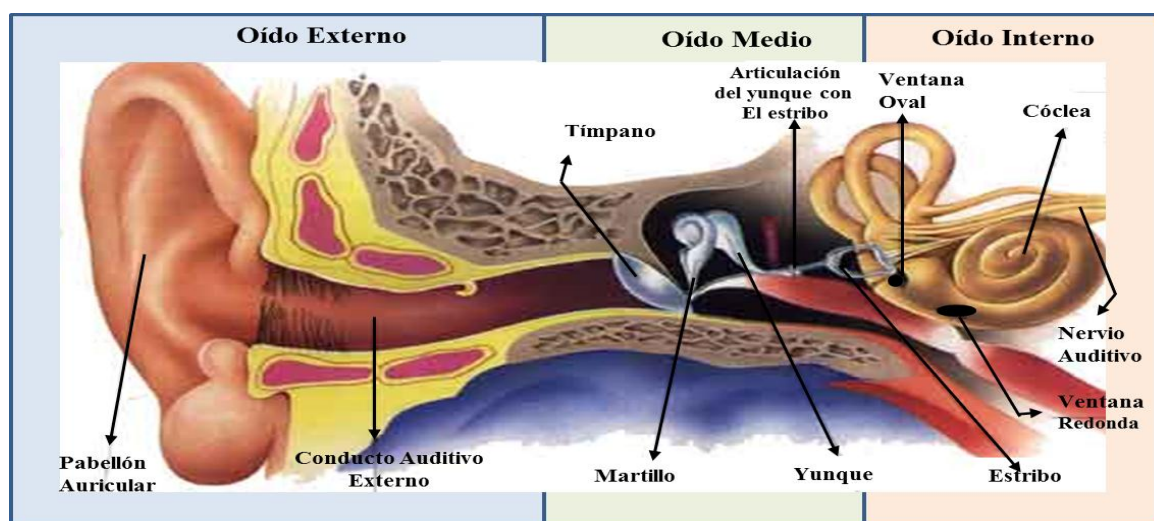
El oído es un órgano sensorial de alta complejidad estructural y funcional. En las últimas tres décadas se han realizado avances muy significativos en el conocimiento de la anatomía, fisiología y biología molecular del oído. Sus alteraciones producen déficit auditivo (hipoacusia o sordera), un trastorno sensorial muy frecuente, que afecta en los países desarrollados a 1 de cada 1000 recién nacidos (Morton y Nance, 2006) y constituye un problema de salud relevante.

### 1.2 Anatomía del oído humano.

El oído humano es un órgano muy complejo, formado por tres segmentos anatómicos consecutivos, claramente diferenciados: oído externo, medio e interno (Tabla 1 y Figura 1).

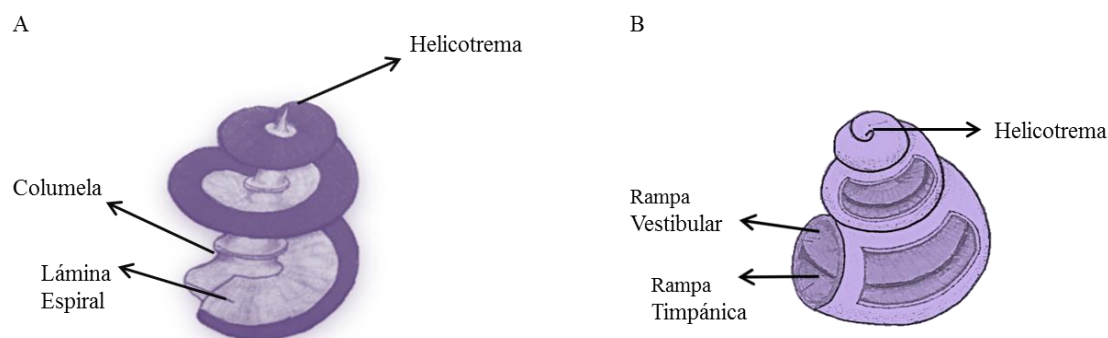
**Tabla 1:** Segmentos anatómicos del oído humano, sus partes anatómicas y sus funciones.

Segmentos anatómicos del oído humano	Partes Anatómicas	Funciones
Oído externo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El pabellón auricular (oreja).</li> <li>• El conducto auditivo externo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recibe las ondas sonoras del exterior.</li> </ul>
Oído medio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La cavidad timpánica.</li> <li>• La cadena osicular: martillo, yunque y estribo (ensamblados entre sí, dentro de una cavidad ósea (hueso temporal); sostenida por ligamentos y dos músculos (el tensor del tímpano y el estapedio)).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La señal sonora del exterior es convertida en estímulos mecánicos (vibraciones).</li> </ul>
Oído interno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El sistema vestibular: los conductos semicirculares y el vestíbulo (sáculo y utrículo).</li> <li>• La cóclea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transforma los estímulos mecánicos (vibraciones) en estímulos eléctricos (impulsos nerviosos).</li> <li>• Sistema vestibular: Sentido del equilibrio.</li> <li>• Cóclea: sentido del oído.</li> </ul>



**Figura 1:** Esquema anatómico del oído. Se pueden diferenciar los tres segmentos anatómicos y las estructuras que comprenden. Adaptado de <http://cuerpohumanocuerpo.blogspot.com.es>.

El oído interno contiene un órgano complejo y finamente regulado, la cóclea. Está formada por un conducto que gira en dos vueltas y media (lámina espiral) sobre un eje central (columna de *Breschet* o columela) y cerrado en su ápice (helicotrema) (Figura 2).

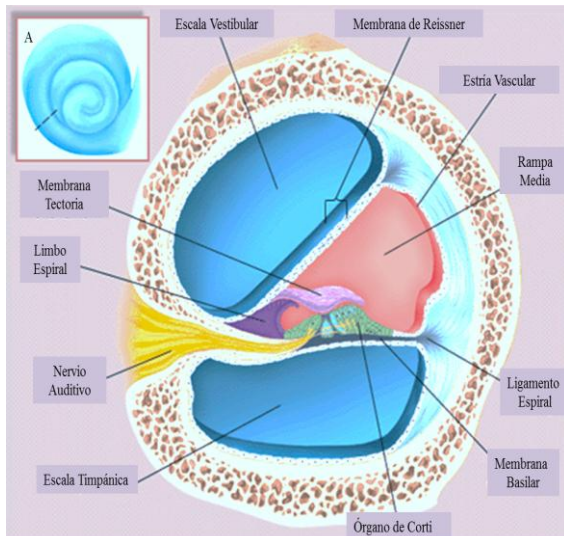


**Figura 2:** Esquema de la estructura interna y externa de la cóclea. Adaptado de [http://anatomiadeloído.blogspot.com.es/2010\\_04\\_01\\_archive.html](http://anatomiadeloído.blogspot.com.es/2010_04_01_archive.html).

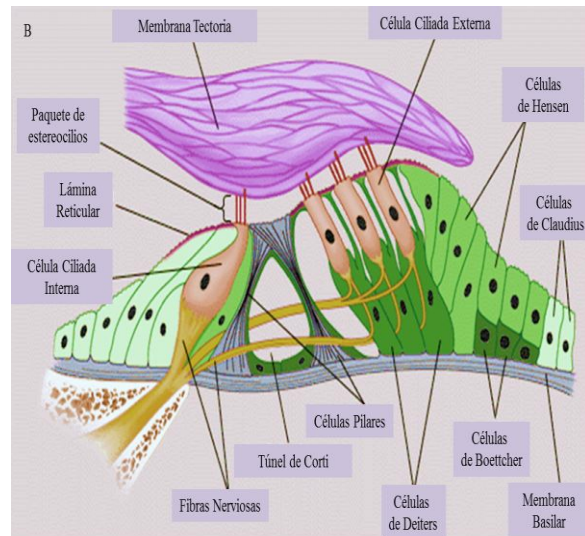
El espacio interior de este conducto se encuentra segmentado parcialmente por la cresta ósea espiral, a partir de la cual se proyectan dos membranas: la **membrana de Reissner** y la **membrana basilar**. Estas membranas delimitan tres compartimentos llenos de líquido. El compartimento superior (**rampa vestibular**), limita con el oído medio a través de la ventana oval, sobre la cual descansa la base del estribo, responsable de transmitir las vibraciones que provienen del exterior. El compartimento intermedio (**rampa media**), delimitado por las dos membranas mencionadas y por la estría vascular, situada en la pared lateral de la cóclea, contiene el epitelio neurosensorial que es responsable de convertir las vibraciones en impulsos nerviosos. Finalmente, el compartimento inferior (**rampa timpánica**) limita con el oído medio a través de la ventana redonda, cerrada por una delgada membrana elástica (membrana timpánica secundaria) (Figura 3A).

La **rampa vestibular** y la **rampa timpánica** se comunican en el ápice del conducto, por el ya mencionado helicotrema. Están rellenas de perilinfa, un líquido con una composición similar a la de otros fluidos extracelulares (rico en sodio y pobre en potasio). Por el contrario, la **rampa media** está rellena de endolinfa, un líquido extracelular atípico (rico en potasio y pobre en sodio), secretado por la estría vascular. Esta peculiaridad, como luego veremos, es esencial para el mecanismo de la audición.

Sobre la región central de la membrana basilar se encuentra el epitelio neurosensorial del oído interno, denominado órgano de Corti (Figura 3B). Está formado por diversas **células de soporte** (células de Claudius; de Hensen; de Deiters...) que sirven de anclaje al otro tipo de células que conforman éste órgano: **las células ciliadas** (internas y externas). El órgano de Corti alberga unas 3.500 células ciliadas internas (CCIs) organizadas en una única hilera (Figura 4A) y alrededor de 12.000 células ciliadas externas (CCEs) dispuestas en tres hileras (Figura 4B). En torno al 90% de las terminaciones aferentes de la cóclea contactan con las CCIs, que son las células sensoriales propiamente dichas (Figura 4A). En cambio, las CCEs solamente reciben el 10% de las terminaciones aferentes. La función de las CCEs es amplificar el estímulo sonoro (Figura 4B) (Maison *et al.*, 2002).



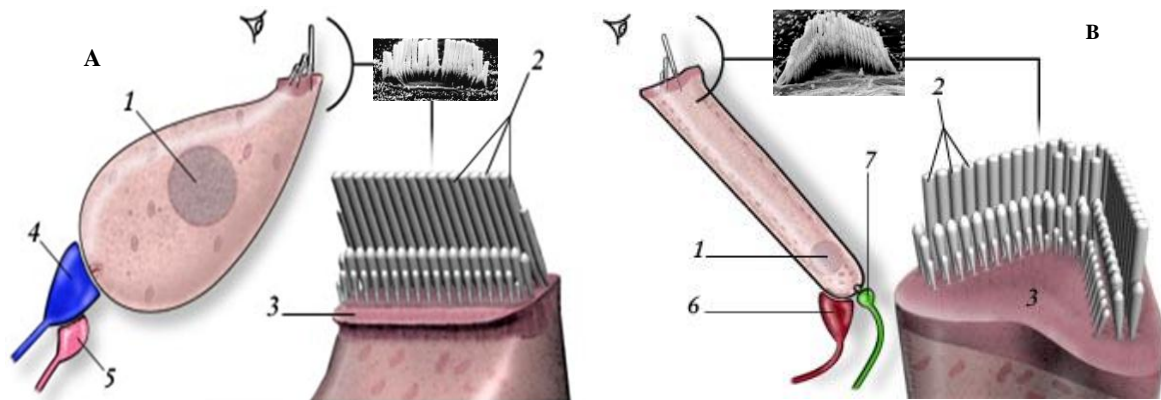
**Figura 3A:** Corte transversal de la cóclea.



**Figura 3B:** Esquema del órgano de Corti.

(Esquemas adaptados de la Enciclopedia Británica, 1997)

Las células ciliadas presentan en su extremo apical estereocilios, que son proyecciones especializadas de la membrana plasmática (de tipo microvellosidad), formadas por un esqueleto de filamentos de actina y miosina que les confiere rigidez. Los estereocilios están anclados al citoesqueleto de la célula a través de la placa cuticular (Figura 4A-B).



**Figura 4:** (A): Esquema de célula ciliada interna y (B): de célula ciliada externa: (1) Núcleo. (2) Estereocilios. (3) Placa cuticular. (4) Fibra radial aferente (tipo I) del nervio auditivo. (5) Fibra lateral eferente. (6) Fibra medial eferente. (7) Fibra espiral aferente (tipo II) del nervio auditivo. (Adaptado de [www.cochlea.org](http://www.cochlea.org)). Micrografía de barrido de la célula ciliada interna y externa (Adaptado de Petit y Richardson, 2009).

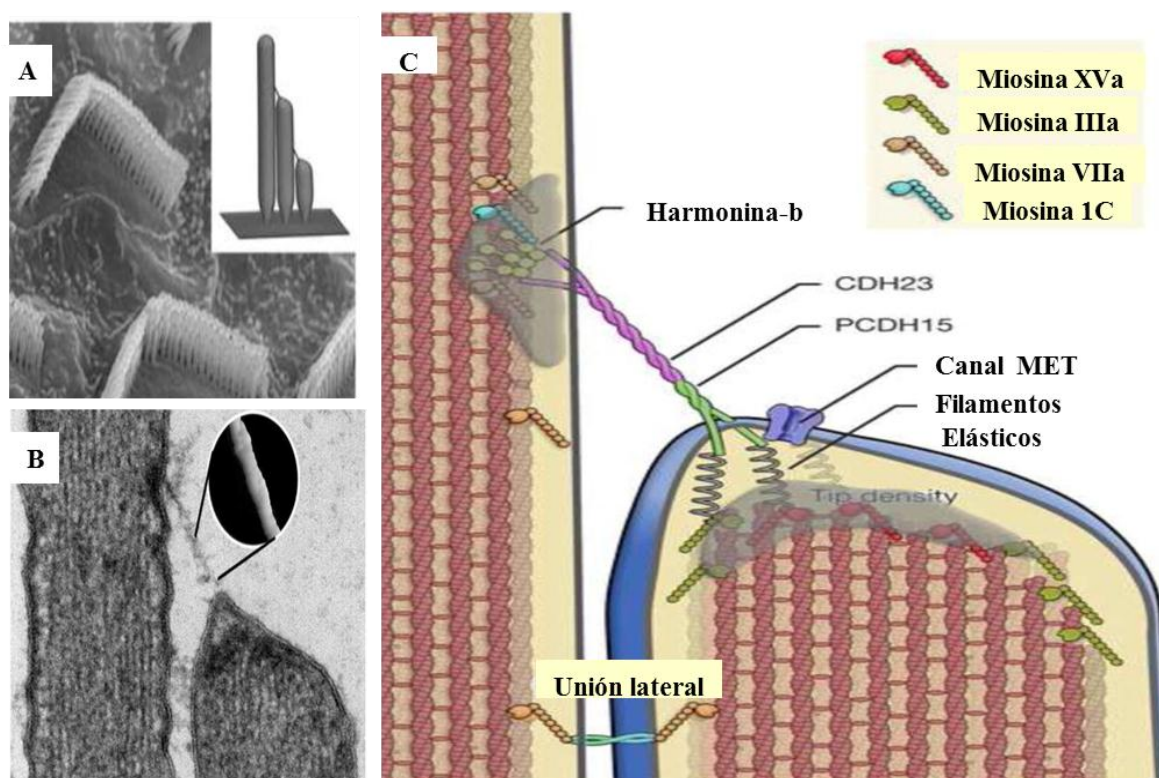
Existen diversos tipos de uniones entre los estereocilios en sus diferentes estadios de maduración, principalmente uniones apicales y uniones laterales.

Las **uniones apicales** (*tip links*) están constituidas por las proteínas cadherina-23 y protocadherina-15. Se trata de proteínas transmembranarias que interaccionan entre sí por sus extensos dominios extracelulares, y cuyos pequeños dominios citoplásmicos se conectan a un complejo entramado de proteínas del citoesqueleto del estereocilio (Sakaguchi *et al.*, 2009;

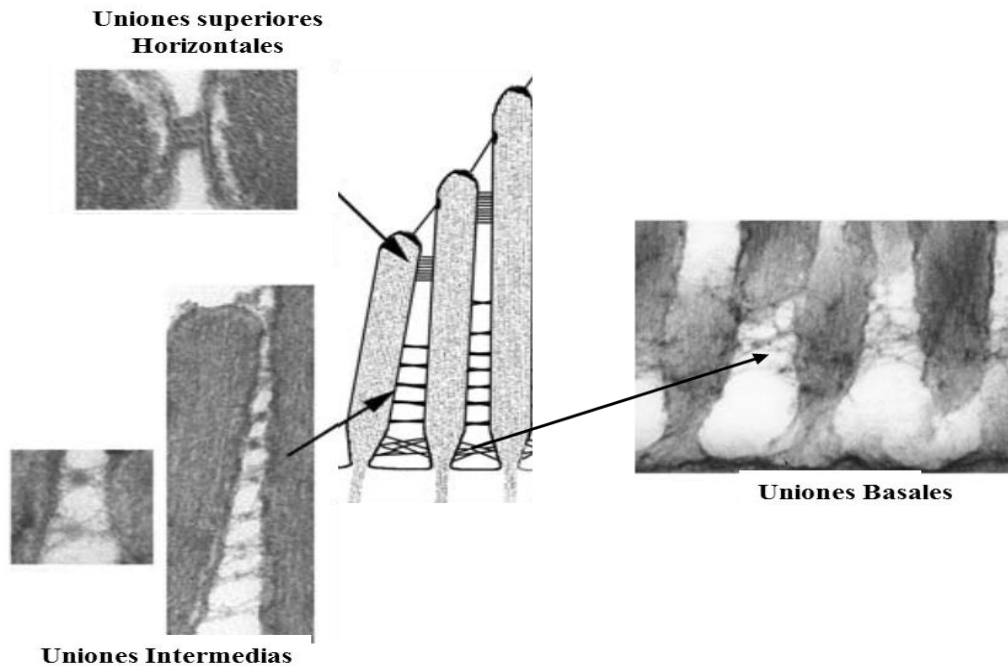
Schwander *et al.*, 2010). Este tipo de unión garantiza el movimiento coordinado del paquete de estereocilios. Asociado a esta unión se piensa que hay un canal mecanotransductor (canal MET), cuya apertura es regulada ante los estímulos mecánicos (Figura 5A-C).

Las **uniones laterales** garantizan la coordinación entre las filas de los estereocilios adyacentes de su misma hilera y con el estereocilio de la hilera superior adyacente. Dentro de este grupo se pueden distinguir diferentes tipos de uniones: uniones superiores horizontales (*horizontal top connectors*), uniones intermedias (*shaft connectors*) y uniones basales (*ankle links*) (Figura 6).

Por encima del órgano de Corti se extiende la membrana tectoria (compuesta por fibras de colágeno y otras proteínas), en estrecho contacto con los estereocilios de mayor longitud de las células ciliadas externas (Figura 3B).



**Figura 5: Uniones apicales en los estereocilios.** (A) Micrografía de barrido de los estereocilios de las CCEs. Forman estructuras organizadas con un patrón escalonado y están conectados entre sí por uniones apicales. (B) Micrografía de barrido de dos estereocilios unidos por el enlace apical. (C) Representación esquemática de dos estereocilios. Ilustra las características estructurales y los principales componentes moleculares que forman parte del complejo de la unión apical. La cadherina-23 (CDH23) y la protocadherina-15 (PCDH15) se insertan en una región densa de la membrana plasmática de los estereocilios formada por numerosas proteínas de anclaje. La tensión de los enlaces apicales produce la apertura de los canales de mecanotransducción (canal MET) (Adaptado de Sakaguchi *et al.*, 2009).



**Figura 6:** Uniones laterales en el paquete de estereocilios de las células ciliadas externas del oído interno. Micrografías electrónicas de los diferentes tipos de uniones laterales: uniones superiores horizontales, uniones intermedias y uniones basales, representadas esquemáticamente en la figura central (Adaptado de Nayak *et al.*, 2007).

### 1.3 Fisiología del oído humano.

En el proceso de la audición, las ondas sonoras canalizadas por el oído externo colisionan con la membrana timpánica y son transformadas en estímulos mecánicos o vibraciones, que se transmiten por la cadena osicular del oído medio. La base del estribo genera presión hacia adentro sobre la ventana oval. En cambio la ventana redonda, es sometida a una presión hacia afuera en el oído interno. Este juego de ventanas hace que las vibraciones se propaguen por el líquido que se encuentra dentro del mismo.

Las vibraciones son transmitidas desde la perilinfa (rampa vestibular) a la endolinfa (rampa media) a través de la delgada membrana de Reissner. A su vez, el movimiento ascendente de la membrana basilar provoca el desplazamiento del paquete de estereocilios de las CCEs respecto a la membrana tectoria. Como consecuencia, se tensan las uniones apicales, lo que provoca la apertura de los canales MET. Los iones potasio presentes en alta concentración en la endolinfa entran en las células ciliadas a favor de gradiente, lo que tiene como resultado la despolarización de las mismas. Las CCEs responden entonces dilatando y contrayendo sus membranas laterales, mecanismo que actúa como amplificador de la señal. Como consecuencia, las CCI sufren a su vez el desplazamiento de sus estereocilios, la apertura de los canales de mecanotransducción y la despolarización de su membrana. Esto produce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. La entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en las CCI desencadena el proceso de exocitosis de vesículas presinápticas y la liberación de neurotransmisores (glutamato) hacia el botón postsináptico del nervio auditivo. De este modo se genera el impulso eléctrico que recorre el nervio (VIII par craneal) hasta llegar a la corteza cerebral.

Las células ciliadas regresan a su estado de equilibrio cuando los iones potasio difunden de las mismas a través de canales de  $\text{K}^{+}$  hasta las células de soporte. Estas últimas se comunican con las

células adyacentes a través de uniones comunicantes (*gap-junctions*) formadas por conexinas que permiten el intercambio de iones. Complejas rutas de reciclaje, que implican a numerosos canales, transportadores y ATPasas, aseguran el retorno del potasio a la endolinfa.

### 1.4 Hipoacusia.

#### 1.4.1 Clasificación de las hipoacusias.

Las hipoacusias se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios:

##### ✚ Según la **etiología de la hipoacusia:**

- **Hipoacusias adquiridas:** producidas por causas ambientales. Entre estas causas encontramos: el trauma acústico, las infecciones bacterianas, víricas o parasitarias (TORCH) y la administración de fármacos ototóxicos. Puede existir una predisposición genética del paciente, que incrementa su susceptibilidad al daño auditivo producido por algunos de estos agentes ambientales.
- **Hipoacusias genéticas:** son ocasionadas por mutaciones en genes cuyos productos están relacionados con el desarrollo, la estructura y la función del oído. En general, se trata de trastornos monogénicos.
  - ▶ Según el **fenotipo** pueden ser:
    - **Sindrómicas:** cuando la pérdida de audición está asociada a otros signos clínicos.
    - **No sindrómicas:** cuando la pérdida de audición no está asociada a otras manifestaciones clínicas.
  - ▶ Según el **patrón de herencia:**
    - **Autosómicas dominantes.**
    - **Autosómicas recesivas.**
    - **Ligadas a los cromosomas X o Y.**
    - **Materno-mitocondriales.**

##### ✚ Según la **localización de la lesión:**

- **Conductivas (o de transmisión):** la hipoacusia ocurre debido a lesiones en el oído externo o en el oído medio, que afectan la eficiencia de la transmisión de las ondas sonoras.
- **Neurosensoriales (o de percepción):** son debidas a daños localizados en el oído interno o en las vías nerviosas auditivas.
- **Mixtas:** son combinación de conductivas y neurosensoriales.

✚ Según la **edad de inicio de la hipoacusia:**

- **Prelocutivas:** la pérdida auditiva se produce con anterioridad a la adquisición del lenguaje (desde el nacimiento hasta los 2 años). Es importante diferenciar que toda hipoacusia congénita (presente en el nacimiento) es prelocutiva, pero no todas las hipoacusias prelocutivas son congénitas.
- **Perilocutivas:** se produce en la etapa de adquisición del lenguaje (desde los 2 años hasta los 5 años).
- **Postlocutivas:** después de la adquisición del lenguaje (a partir de los 5 años).

✚ Según la **simetría:**

- **Unilateral:** la pérdida auditiva afecta a un oído.
- **Bilateral:** la pérdida auditiva afecta a ambos oídos.

✚ Según el **grado de la pérdida auditiva:**

- **Hipoacusia leve:** pérdidas de 21-40 dB.
- **Hipoacusia moderada:** pérdidas de 41-70 dB.
- **Hipoacusia severa:** pérdidas de 71-95 dB.
- **Hipoacusia profunda:** pérdidas mayores de 95 dB.

✚ Según las **frecuencias afectadas por la pérdida auditiva:**

- **Hipoacusias de frecuencias bajas o graves:** frecuencias <500 Hz.
- **Hipoacusias de frecuencias medias:** frecuencias entre 500-2000 Hz.
- **Hipoacusias de frecuencias altas o agudas:** frecuencias > 2000 Hz.

#### 1.4.2 Epidemiología de la hipoacusia.

La hipoacusia o sordera es el trastorno sensorial más frecuente en humanos. En el mundo, más de 70 millones de personas presentan déficit auditivo en alguna etapa de su vida (Tekin, 2001).

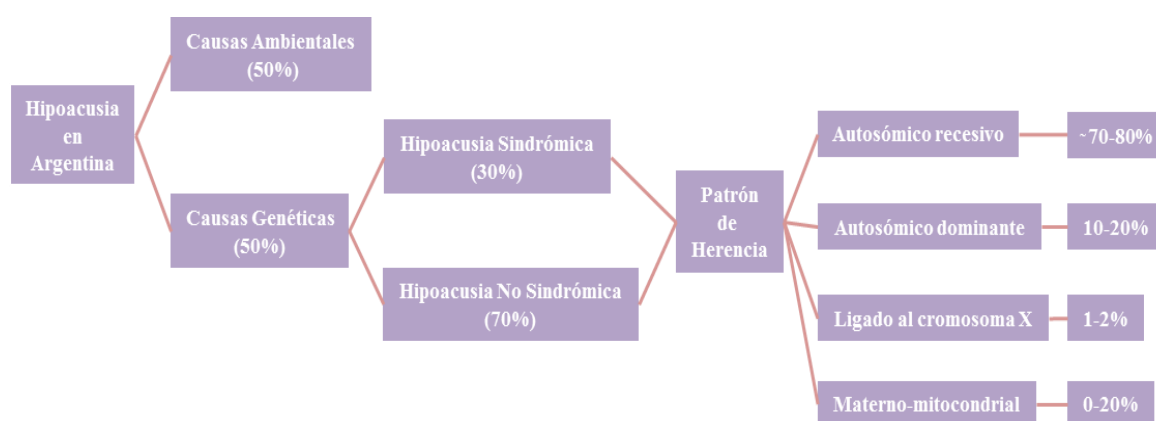
En Argentina, según el Ministerio de Salud ([www.deis.com.ar](http://www.deis.com.ar)), el 18% de las discapacidades son auditivas, de las cuales, el 86,6% de los casos corresponde a pérdida parcial de la audición (hipoacusias) y el 13,4% a la pérdida total (sordera). Aproximadamente 1-3 de cada 1000 recién nacidos padecen una hipoacusia severa o profunda y 3 de cada 1000 niños en edad escolar padece una hipoacusia moderada (45 dB). En Argentina y demás países en vías de desarrollo, las causas ambientales y genéticas se ven equiparadas (50% de los casos, respectivamente). Esto se debe a las elevadas tasas de nacimientos prematuros, bajo peso al nacer, hipoxia o infecciones que pueden ser paliadas con programas adecuados de profilaxis (vacunas y antibióticos).

En cambio, en países más desarrollados, se estima que más del 60% de los casos de hipoacusia se deben a causas genéticas (Morton y Nance, 2006). Se piensa que este porcentaje aumentará en los

próximos años, dado que la contribución relativa de las causas ambientales va disminuyendo gracias a su control sanitario.

Dentro de las hipoacusias genéticas, el 30% de los casos corresponden a hipoacusias sindrómicas mientras que en el 70% de los casos, la hipoacusia es no sindrómica (Petit *et al.*, 2001). Se estima que aproximadamente el 70-80% siguen un patrón de herencia autosómico recesivo; el 10-20%, autosómico dominante y el 1-2%, ligado al cromosoma X. La hipoacusia de herencia materno-mitocondrial está representada en el 0-20% de los casos, según las poblaciones (Figura 7).

La hipoacusia autosómica dominante o de herencia materno-mitocondrial es en general de manifestación postlocutiva, mientras que una pérdida auditiva prelocutiva es mayoritariamente de herencia autosómica recesiva (Robertson y Morton, 1999). Esto parece guardar relación con el hecho de que las mutaciones en las hipoacusias dominantes suelen ser inicialmente compatibles con la audición, de modo que la pérdida auditiva es debida a un proceso acumulativo y degenerativo. En cambio, las mutaciones en las hipoacusias recesivas suelen producir la pérdida total de la proteína funcional (Morton, 2002).



**Figura 7:** Resumen epidemiológico de la hipoacusia prelocutiva.

En la población argentina, los recién nacidos carecían de los controles rutinarios necesarios para detectar la presencia de problemas auditivos en los centros de salud pública. En abril de 2001, en la Ciudad de Buenos Aires, se promulgó la Ley de Hipoacusia (25.415) que fue sancionada y entró en vigencia recientemente a nivel nacional, en julio de 2011. A partir de ahora, a través del **Programa Nacional de Detección Temprana y Atención de la Hipoacusia** del Ministerio de Salud de la Nación, su detección temprana y tratamiento deberá incluirse entre las prestaciones que se consideran obligatorias en las obras sociales y en todas las entidades de medicina prepago e instituciones públicas de salud del país. Un importante avance, que permite de esta forma detectar pérdidas auditivas antes del tercer mes de vida.



### 1.4.3 Problemática del estudio de la hipoacusia hereditaria no sindrómica.

La identificación de genes responsables de hipoacusia no sindrómica es una tarea compleja debido a varios factores. Las familias con hipoacusia hereditaria suelen tener un número pequeño de afectados (muchas veces son casos sin ningún antecedente familiar; otras veces los antecedentes son 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. A esto hay que añadir que las dificultades de comunicación con el entorno oyente hacen muy frecuentes los matrimonios entre sordos, que contribuyen a dificultar o imposibilitar el análisis genético. Además, las características clínicas observadas en los exámenes clínicos ordinarios contribuyen poco a distinguir entre formas de hipoacusia debidas a mutaciones en distintos genes.

Para soslayar estos problemas, se recurrió a realizar análisis de ligamiento en familias grandes, consanguíneas, de poblaciones aisladas geográficamente. Esta estrategia ha permitido la localización e identificación de numerosos genes implicados en la hipoacusia no sindrómica. Más recientemente, se está combinando el análisis genético clásico con la aplicación de las modernas tecnologías de secuenciación masiva. Estos estudios han conducido a cartografiar numerosos *loci* genéticos donde deben residir genes cuyas mutaciones causan hipoacusias no sindrómicas. Muchos de estos genes han sido ya identificados.

Los *loci* de hipoacusias no sindrómicas se nombran con el prefijo **DFN** (*DeaFNess*: sordera) seguidos de un número que refleja el orden cronológico de su descubrimiento: la sigla **DFNA** corresponde a *loci* de hipoacusias de herencia autosómica dominante; **DFNB** a *loci* de hipoacusias autosómicas recesivas y **DFNX**, a *loci* de hipoacusias de herencia ligada al cromosoma X. El nombre del *locus* se utiliza también para denominar al correspondiente subtipo de hipoacusia.

Hasta la fecha, se conocen 124 *loci* (46 *loci* DFNA, 73 *loci* DFNB, 4 *loci* DFNX y 1 *locus* DFNY) y 71 genes implicados en hipoacusias no sindrómicas (19 genes cuyas mutaciones causan hipoacusias de herencia dominante, 38 genes cuyas mutaciones causan hipoacusias recesivas, 9 genes cuyas mutaciones pueden causar hipoacusias tanto dominantes como recesivas, 3 genes de hipoacusias ligadas al X, y 2 genes del ADN mitocondrial) (*Hereditary Hearing Loss Homepage*: <http://hereditaryhearingloss.org>). Estos genes codifican productos que desempeñan diversas funciones en el oído interno: proteínas implicadas en la homeostasis iónica coclear (conexinas, claudinas, canales y transportadores); proteínas del citoesqueleto (miosinas y otras proteínas que se unen a la actina); proteínas de adhesión celular (cadherinas, protocadherinas); proteínas componentes de la membrana tectoria (colágenos, tectorinas, otogelinas...); proteínas implicadas en la transmisión del impulso nervioso (otoferlina); reguladores transcripcionales... (Dror y Avraham, 2009; Duman y Tekin, 2012).

#### 1.4.4 Diagnóstico genético de la hipoacusia no sindrómica.

##### -Los beneficios y la problemática del diagnóstico en la población argentina.

El diagnóstico genético-molecular de las hipoacusias está siendo crecientemente demandado, debido a los beneficios que reporta:

- Las personas con déficit auditivo pueden **conocer la causa** del mismo, lo que suele representar un alivio psicológico para ellos y sus familiares.
- Contribuye a la **detección precoz de la hipoacusia**. De esta forma, el individuo puede recibir **estimulación temprana** para el desarrollo del lenguaje.
- Permite el **asesoramiento genético** del individuo con pérdida de audición y de sus familiares normoyentes.
- En casos de mutaciones de susceptibilidad a agentes ambientales (por ejemplo, la mutación m.1555A>G en el ADN mitocondrial y los antibióticos aminoglucósidos), contribuye a la prevención de la hipoacusia.
- Proporciona información que debe ser tenida en cuenta en la elección de las terapias (por ejemplo, la indicación/contraindicación del implante coclear en casos de neuropatía auditiva).

Sin embargo, el diagnóstico molecular de rutina que se ofrece en la mayoría de los laboratorios, se reduce a un muy pequeño número de los 71 genes implicados. Esta situación se debe a varios factores:

- **La imposibilidad de aplicar técnicas de análisis genéticos convencionales** que dirijan el cribado a genes concretos. En la mayoría de los casos, las familias contienen un número muy bajo de individuos afectados.

- **Conocimiento escaso de las correlaciones genotipo-fenotipo**. Existe aún escasa información sobre si mutaciones en genes concretos producen características clínicas distintivas, que podrían orientar el estudio hacia unos pocos genes del conjunto.

- **Conocimiento escaso de la epidemiología genética**. Es preciso conocer la contribución de cada uno de los genes estudiados y de sus mutaciones a la totalidad de los casos de hipoacusia en una población dada. A la hora de estudiar la población argentina, los estudios de epidemiología genética deben tener en cuenta, además, la gran heterogeneidad de orígenes étnicos.

Ante estos problemas, la alternativa sería secuenciar todos los genes de hipoacusia conocidos en un paciente dado. Sin embargo, el alto coste que tendría el cribado de tan alto número de genes por métodos tradicionales (secuenciación de Sanger), tanto en términos económicos como de tiempo y esfuerzo, imposibilitan esta alternativa. Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva serán la solución a este problema, pero aún son demasiado costosas para su aplicación en el diagnóstico de rutina.

Decidimos investigar la epidemiología genética y las correlaciones genotipo-fenotipo en una cohorte de familias argentinas afectadas por hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas, con el fin de obtener datos fiables que permitan orientar el diagnóstico genético-molecular en dicha

población. Dado el elevado número de genes implicados en este tipo de hipoacusias, hemos priorizado el estudio de aquellos genes cuyas mutaciones son más frecuentes en las poblaciones hasta ahora estudiadas (Tabla 2). A continuación, presentamos con cierto detalle los genes en los que hemos encontrado mutaciones en este trabajo.

**Tabla 2:** Lista de *loci*, genes y sus productos proteicos asociados con hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas que fueron estudiados en este trabajo.

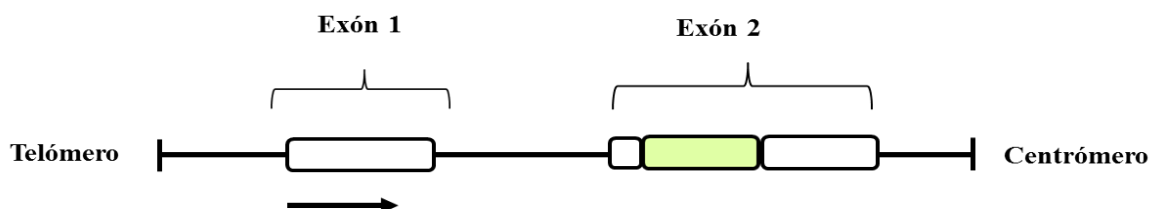
<i>Locus</i>	Localización	Gen	Número de exones	Producto del gen	Modelo Murino	Función Celular	Papel en el oído interno
DFNB1	13q11.12	<i>GJB2</i>	2	Conexina 26		Uniones intercelulares comunicantes	Reciclaje de iones K <sup>+</sup>
		<i>GJB6</i>	6	Conexina 30	<i>Cx30</i> <sup>-/-</sup>		
DFNB3	17p11.2	<i>MYO15A</i>	65	Miosina XVA	<i>Shaker-2 (sh2)</i>	Citoesqueleto	Motilidad en el paquete de estereocilios
DFNB4	7q22.3	<i>SLC26A4</i>	21	Pendrina	<i>Pds</i> <sup>-/-</sup>	Transportador de aniones	Homeostasis de la endolinfa
DFNB6	3p21	<i>TMIE</i>	4	TMIE	<i>Spinner (sr); Circling (cir)</i>	Proteína integral de membrana	¿?
DFNB7/B11	9q21.12	<i>TMC1</i>	24	TMC1	<i>Deafness (dn)</i>	Proteína integral de membrana	¿?
DFNB9	2p.23.1	<i>OTOF</i>	48	Otoferlina	<i>Otof</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Pachanga (Pga)</i>	Exocitosis en la sinápsis auditiva	Fusión de vesículas sinápticas en CCIs
DFNB12	10q22.1	<i>CDH23</i>	69	Cadherina 23	<i>Waltzer (v)</i>	Adhesión celular	Formación del paquete de estereocilios
DFNB16	15q15.3	<i>STRC</i>	27	Estereocilina	<i>Strc</i> <sup>-/-</sup>	Estereocilios	Anclaje a la membrana tectoria
DFNB21	11q22-24	<i>TECTA</i>	23	Tectorina $\alpha$	<i>Tecta</i> <sup>-/-</sup>	Matriz extracelular	Componente estructural de la membrana tectoria
DFNB23	10q21.1	<i>PCDH15</i>	32	Protocadherina 15	<i>ames waltzer (av)</i>	Adhesión celular	Formación del paquete de estereocilios
DFNB28	22q13.1	<i>TRIOBP</i>	23	TRIOBP		Citoesqueleto	Interacción con actina en células ciliadas
DFNB29	21q22.3	<i>CLDN14</i>	3	Claudina 14	<i>Cldn14</i> <sup>-/-</sup>	Uniones intercelulares estrechas	Delimitación de endolinfa y perilinfa
DFNB37	6q13	<i>MYO6</i>	35	Miosina VI	<i>Twist (Twt)</i>	Citoesqueleto	Motilidad en el paquete de estereocilios
DFNB59	2q31.2	<i>PJVK</i>	7	Pejvakina	<i>Dfnb59</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Sirtaki (Ski)</i>	Función desconocida	¿?
DFNB67	6p21.31	<i>TMHS</i>	4	TMHS/LHFPLS	<i>Hurry-scurry (hscy)</i>	Proteína integral de membrana	Conexión de la protocadherina 15 con el canal de mecanotransducción
DFNB73	1p32.1	<i>BSND</i>	4	Barttina		Subunidad accesoria de canales de cloruro	Control del tráfico intracelular
DFNB91	6p25.2	<i>SERPINB6</i>	7	Serpina B6		Inhibidor de proteasas	Protección del contenido lisosomal

## 2. *Locus* DFNB1: genes *GJB2* y *GJB6*.

El *locus* DFNB1 fue el primer *locus* identificado para las hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva. Fue localizado en el cromosoma 13 (región 13q12) por medio del estudio por análisis de ligamiento de dos familias consanguíneas de Túnez (Guilford *et al.*, 1994). El primer gen identificado en este *locus* fue *GJB2* (OMIM 121011, conexina-26) y más tarde se involucró también al gen *GJB6* (OMIM 604418, conexina-30). Estos genes se encuentran entre sí a una distancia de tan solo 35 kb, y sus productos proteicos son componentes esenciales de las uniones intercelulares comunicantes (*gap-junctions*) e intervienen en la homeostasis iónica de la cóclea.

## 2.1 Genes *GJB2* y *GJB6* y sus mutaciones.

El gen *GJB2* (*Gap junction beta-2*) consta de 2 exones y se extiende a lo largo de 5,5 kb (Figura 8). Al primer exón (no codificante) le sigue un intrón de 3179 pb y un segundo exón que contiene completa la región codificante, a partir de la cual se dirige la síntesis de una proteína de 226 residuos de aminoácidos, denominada conexina-26 (Cx26).



**Figura 8:** Esquema de la estructura del gen *GJB2*. La región codificante se indica con una caja verde y las regiones no traducidas (5' y 3'UTRs) con cajas blancas.

Las mutaciones en el gen *GJB2* pueden ser responsables tanto de hipoacusias no sindrómicas autosómicas dominantes (Denoyelle *et al.*, 1998) como de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas (Kelsell *et al.*, 1997). Además existen casos de pérdida de audición asociada con diversos trastornos dermatológicos: queratodermia palmoplantar (OMIM 148350); síndrome de queratitis-ictiosis-sordera (OMIM 148210); síndrome de *Vohwinkel* (OMIM 124500), entre otros. Hasta el 50% de los casos de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas son atribuibles a mutaciones identificadas en la región codificante del gen *GJB2*. En Europa y Medio Oriente dan cuenta del 20-40% de los casos. En Estados Unidos, Brasil, Asia Oriental, Irán, India y Australia, su contribución es algo menor (12-22%), pero sigue siendo una de las causas principales (Kenneson *et al.*, 2002; del Castillo y del Castillo, 2011).

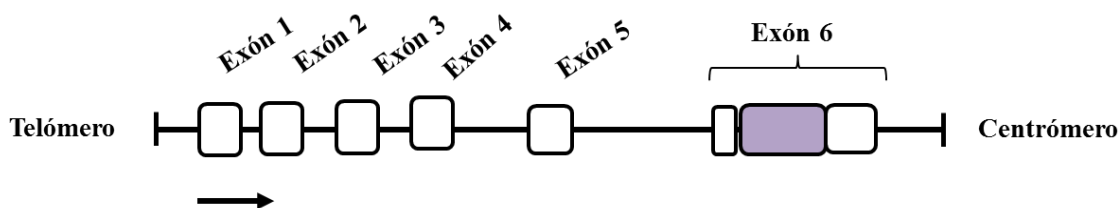
Se han descrito más de un centenar de mutaciones patogénicas en el exón 2 del gen *GJB2* ("*Connexin and Deafness Homepage*": <http://davinci.crg.es/deafness>). La lista incluye mutaciones que generan codones de parada, sustituciones de aminoácidos, pequeñas deleciones, duplicaciones o inserciones. Además, se ha descrito una mutación en el sitio donador de *splicing* del intrón 1 (c.-23+1G>A o IVS1+1G>A) (Denoyelle *et al.*, 1999) y otra mutación en la región promotora (g.-77C>T) (Matos *et al.*, 2007).

En diversos estudios se observó que diferentes mutaciones patogénicas en el gen *GJB2*, presentaban alta frecuencia en poblaciones específicas: la mutación c.167delT, muy frecuente en judíos asquenazíes (Morell *et al.*, 1998); p.(Arg143Trp), en africanos de Ghana (Brobbly *et al.*, 1998); c.235delC y p.(Val37Ile), en poblaciones del Asia Oriental (Yan *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2008); p.(Trp24\*), en India, Pakistán y gitanos europeos; y en República Checa, Hungría, Turquía y Mongolia es frecuente IVS1+1G>A (Seeman y Sakmaryova, 2006; Sirmaci *et al.*, 2006). Asimismo, la mutación c.35delG (p. (Gly12Valfs \*2)) se identificó en aproximadamente, el 85% de los alelos mutados en poblaciones de origen europeo-mediterráneo (Denoyelle *et al.*, 1997; Estivill *et al.*, 1998; Gallo-Terán *et al.*, 2005).

La elevada frecuencia de mutaciones en el gen *GJB2*, ha hecho que su estudio se convierta en la prioridad principal a la hora de realizar el diagnóstico molecular de las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas. Esto reduce tiempo y coste a su estudio y supone un primer paso en el cribado de familias.

Los cribados del gen *GJB2* pusieron de manifiesto que un elevado porcentaje de individuos afectados presentaban solamente una mutación patogénica en la región codificante del gen *GJB2* (afectados con un solo alelo mutado). Estos casos sin elucidar representaban un serio contratiempo en la práctica diagnóstica. Se hipotetizó que podrían existir otras mutaciones en el mismo *locus*, fuera de la región codificante del gen *GJB2*. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, demostraron que, en un gran porcentaje de estos casos, el segundo alelo mutado consistía en una delección que afectaba al vecino gen *GJB6*, sin alcanzar a *GJB2* (del Castillo *et al.*, 2002).

El gen *GJB6* (*Gap junction beta-6*) consta de 6 exones, los 5 primeros de los cuales corresponden a la región 5' no traducida (5'UTR) y el sexto exón codifica la proteína conexina-30 (Cx30), de 261 residuos (Figura 9). Los cuatro primeros exones están sometidos a escisión alternativa (Essenfelder *et al.*, 2005).



**Figura 9:** Esquema de la estructura del gen *GJB6*. La región codificante se indica con una caja violeta y las regiones no traducidas (5' y 3'UTRs), con cajas blancas.

En general, las mutaciones puntuales halladas en el gen *GJB6* están asociadas con hipoacusia no sindrómica o con enfermedades dermatológicas: la mutación p.(Thr5Met) se encontró en una familia italiana con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica dominante (Grifa *et al.*, 1999); en familias de Europa y Asia se identificaron varias mutaciones asociadas con el síndrome de Clouston (OMIM 129500) (Lamartine *et al.*, 2000). En cambio, las mutaciones responsables de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas son grandes delecciones: del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854), muy frecuentes en la población española y otras poblaciones caucásicas (del Castillo *et al.*, 2002; del Castillo *et al.*, 2005) (Figura 10). Su identificación permitió elucidar numerosos casos heterocigotos para una sola mutación patogénica en el gen *GJB2*. La mutación del(*GJB6*-D13S1830), una delección de 309 kb que trunca el gen *GJB6* sin afectar al gen *GJB2*, fue caracterizada por del Castillo y colaboradores en 2002. Esta delección es la segunda mutación más frecuente causante de hipoacusia prelocutiva de tipo DFNB1 en España (8% de los alelos DFNB1 mutados). Además se encontró en altas frecuencias en Francia, Norte de Italia, Reino Unido, Israel, Brasil y, en menor frecuencia, Bélgica, Estados Unidos y Australia (del Castillo *et al.*, 2003).

Posteriormente, se identificó una segunda delección, del(*GJB6-D13S1854*), que abarca 232 kb, y que también trunca el gen *GJB6*, dejando intacto el gen *GJB2* (del Castillo *et al.*, 2005).



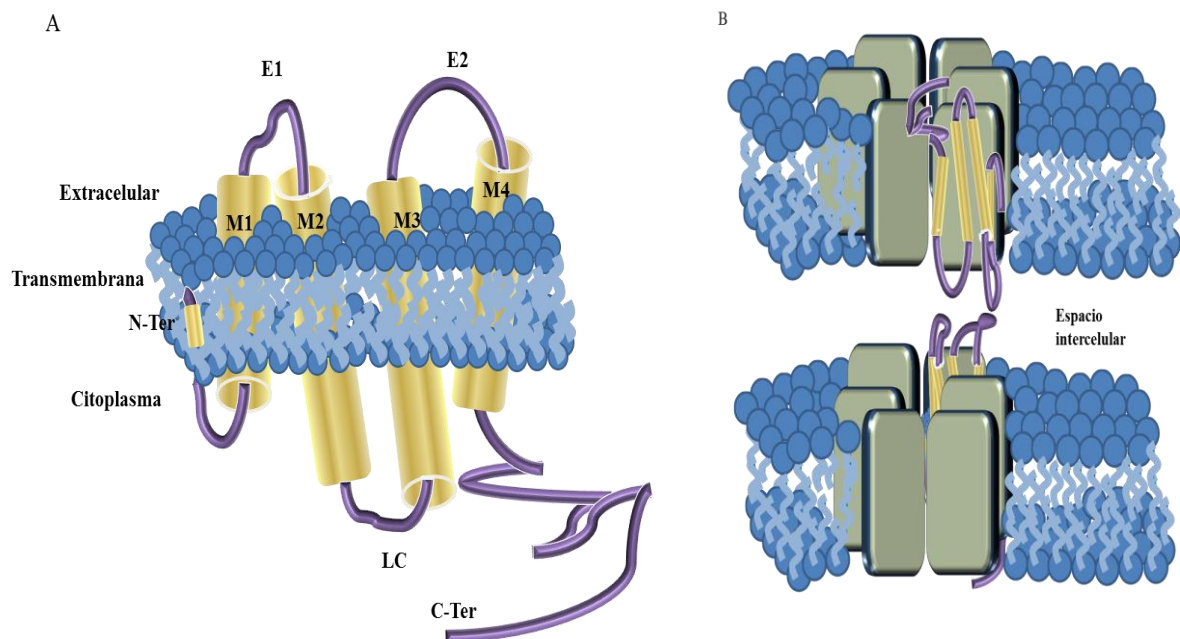
**Figura 10:** Mapa físico de la región del locus DFNB1 en 13q12. Se representan las dos delecciones, del(*GJB6-D13S1830*) y del(*GJB6-D13S1854*).

Estos resultados se interpretaron originalmente sobre la base de una hipotética herencia digénica. El posterior hallazgo de otras dos delecciones que dejan intactos tanto a *GJB2* como a *GJB6* (Wilch *et al.*, 2010; Aguirre, 2009) han apoyado una hipótesis alternativa: las delecciones eliminarían un elemento regulador de tipo *enhancer* (situado a distancia) que sería esencial para la expresión de *GJB2* en el oído interno.

## 2.2 Proteínas Conexinas.

Las conexinas constituyen una gran familia de proteínas integrales de membrana. En humanos se han descrito 21 tipos de conexinas (Sohl y Willecke, 2004) que se clasifican según su peso molecular (en el rango de 26 a 62 kDa) y por la similitud de su secuencia, en tres clases principales: “ $\alpha$ ” (genes *GJA*), “ $\beta$ ” (genes *GJB*) y “ $\gamma$ ” (genes *GJC*).

El monómero de conexina consta de cuatro dominios hidrofóbicos  $\alpha$ -hélice transmembranares (M1-M4); dos lazos extracelulares (E1 y E2) con una secuencia de aminoácidos altamente conservada; un lazo intracelular (LC) altamente variable y sus extremos citoplasmáticos amino y carboxilo, que suelen quedar orientados hacia el citoplasma (Figura 11 A-B).

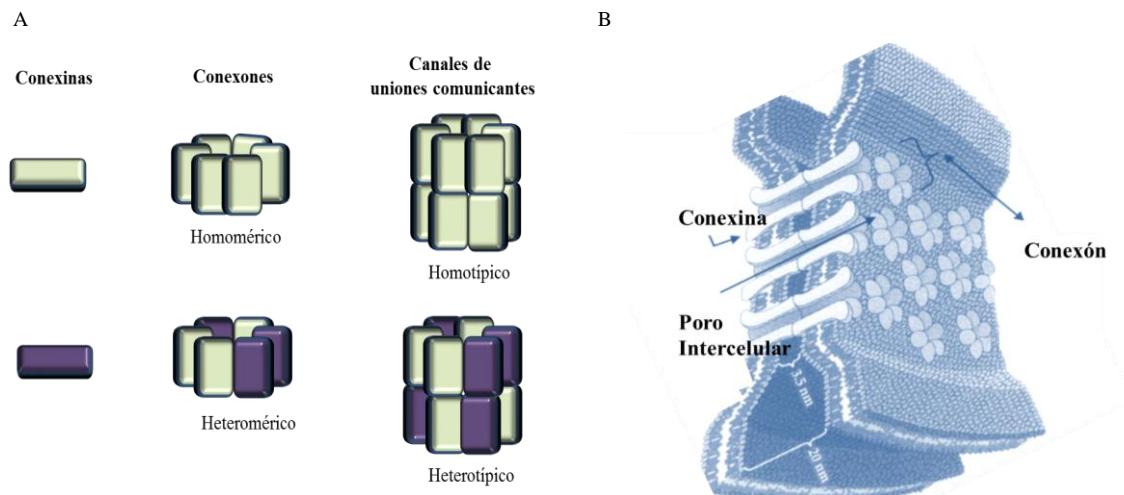


**Figura 11:** (A) Modelo topológico de la conexina 26. Los cilindros representan los dominios transmembranares (M1-M4). Esquema que muestra las interacciones entre conexones por medio de los lazos extracelulares de las conexas que los componen.

Seis monómeros de conexas se agrupan formando un hemicanal o **conexón** (Kumar y Gilula, 1996; Liu *et al.*, 2009). El **conexón** puede ser de tipo homomérico (constituido por el mismo tipo de conexas) o heteromérico (constituido por diferentes tipos de conexas). Mediante el alineamiento y anclaje con el conexón de la célula adyacente, se forma un poro hidrofílico o **canal de unión comunicante** (Figuras 11B y 12A-B). Los **conexones** que unen las dos células adyacentes pueden ser idénticos (canal homotípico) o diferentes (canal heterotípico) (Lee y White, 2009) (Figura 12 A), lo que les confiere propiedades específicas: selectividad por tamaño y carga de las moléculas que atraviesan el canal (Bennett y Zukin, 2004).

Su apertura es regulada por diversos factores (fosforilación, pH, voltaje, otros) (Kelsell *et al.*, 2001). Los canales comunicantes permiten la difusión e intercambio de iones, metabolitos, segundos mensajeros y otras moléculas con tamaño menor de 1 kDa entre los citoplasmas de dos células adyacentes.

La importancia de las uniones comunicantes en la fisiología humana quedó patente cuando se demostró que diversos trastornos hereditarios estaban causados por mutaciones en los genes de las conexas: enfermedades cardíacas, oculares (cataratas), neurológicas, dermatológicas y auditivas (sorderas neurosensoriales) (Kelsell *et al.*, 2001).



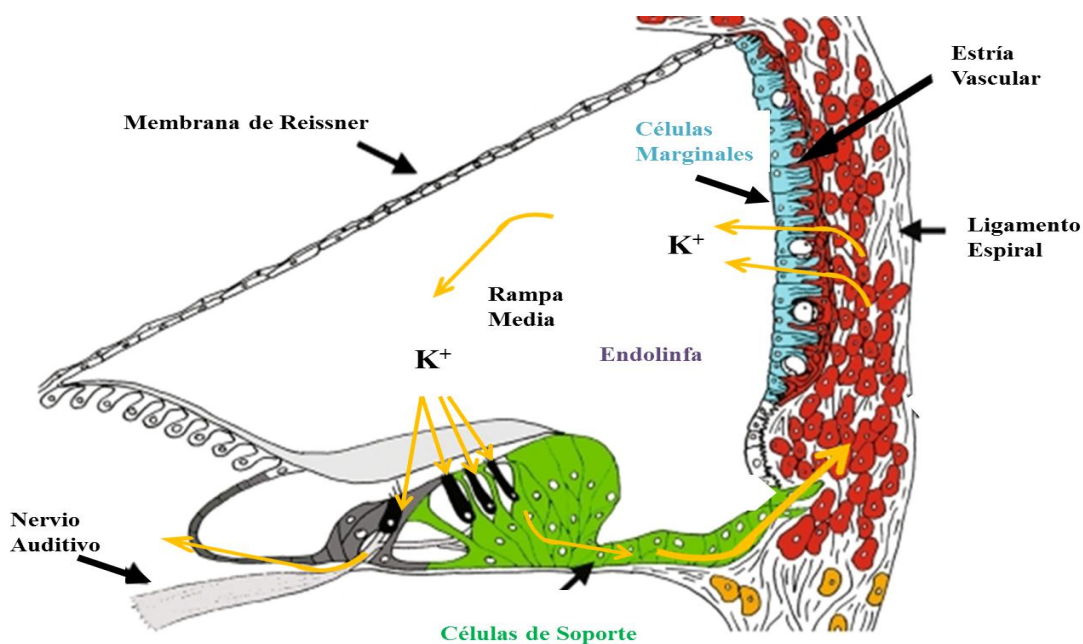
**Figura 12:** (A) Formación de los canales de conexinas. El esquema muestra las diferentes combinaciones de las conexinas que componen los dos hemicanales o conexones. Los conexones pueden ser homoméricos o heteroméricos y los canales intercelulares pueden ser homotípicos o heterotípicos (Adaptado de Lee y White, 2009). (B) Placa de unión comunicante: Muestra la asociación de los conexones que forman los canales entre las membranas plasmáticas de dos células adyacentes (Adaptado de Furshpan y Pooter, 2001).

### 2.3 Conexinas y uniones comunicantes en el oído interno.

En el oído interno se expresan varias especies de conexinas. Entre ellas destacan las conexinas 26 y 30 (Cx26 y Cx30). Ambas se expresan en abundancia en el oído interno y forman parte estructural de las uniones comunicantes que se localizan en la región baso-lateral de las células de soporte del órgano de Corti, en las células del limbo y ligamento espiral de la cóclea (Kikuchi *et al.*, 2000; Forge *et al.*, 2002). El estudio de modelos murinos deficientes en Cx26 y Cx30 ha contribuido en gran medida al entendimiento de la funcionalidad de estas conexinas y de su papel en la patogénesis de las hipoacusias.

Fundamentalmente, su importancia radica en jugar un rol esencial en la ruta de reciclaje del ion potasio, desde las células de soporte hasta las células de la estría vascular (Figura 13). Además, las uniones comunicantes de las células de soporte podrían estar implicadas en la transmisión de señales que coordinan y activan la reparación de las células ciliadas dañadas (Forge *et al.*, 2002).





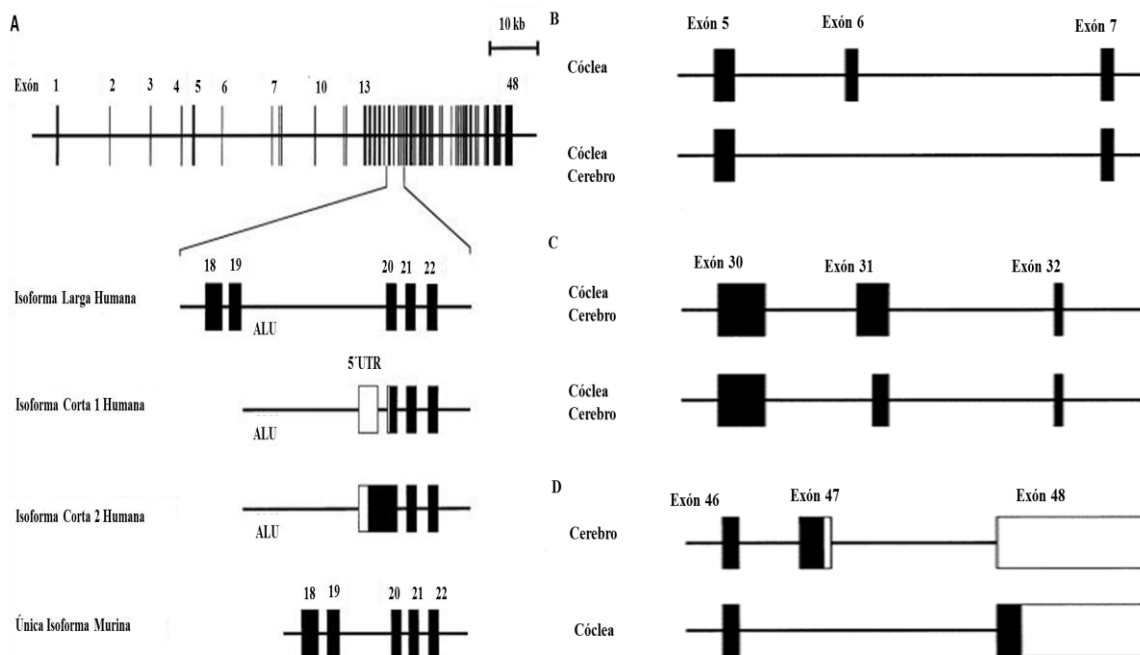
**Figura 13:** Representación esquemática de la sección transversal del conducto coclear. Las flechas de color amarillo representan el flujo de los iones potasio. Existen dos grupos diferentes de células acopladas mediante uniones comunicantes: las redes de células de soporte del órgano de Corti (red lateral, en verde; red medial, en gris) y la red de tejido conectivo (roja) que se compone de los fibrocitos del ligamento espiral, junto a las células basales y células intermedias de la estría vascular. Las células marginales de la estría vascular (azul claro) están aisladas eléctricamente de la red de tejido conectivo. (Adaptado de Jagger *et al.*, 2010).

### 3. Locus DFNB9 (gen *OTOF*).

El locus DFNB9 fue identificado por análisis de ligamiento en dos familias consanguíneas del Líbano y Turquía con hipoacusia no sindrómica prelocutiva y profunda. Fue localizado en el cromosoma 2 (2p22-23), en un intervalo crítico delimitado por los marcadores D2S158 y D2S174 (Chaib *et al.*, 1996, Leal *et al.*, 1998; Yasunaga *et al.*, 1999). Dentro de esta región se encontraron mutaciones en el gen *OTOF*, que codifica la proteína otoferlina.

#### 3.1 Gen *OTOF* y sus mutaciones.

El gen *OTOF* (OMIM 603681) contiene 48 exones codificantes. Existe un exón adicional alternativo (denominado 5'UTRs1) que se encuentra entre los exones 19 y 20. A partir del gen *OTOF* se generan diversos tipos de transcritos, que dan lugar a diferentes isoformas de la proteína, largas o cortas. Los transcritos con inicio en el exón 1 dan lugar a isoformas largas, mientras que los transcritos de las isoformas cortas se inician en el exón 5'UTRs1. Además, hay diversidad de isoformas cortas y largas debido a escisión alternativa de exones (Figura 14 A-D).



**Figura 14:** Estructura exón-intrón del gen *OTOF* y procesamiento de exones (*splicing*) alternativo. (A) Representación esquemática de la estructura intrón-exón (arriba) y detalle de las regiones genómicas comprendidas entre los exones 18-22 en humanos y en ratón (abajo). (B-D) Procesamiento alternativo de los exones 6, 31 y 47 del gen *Otof* en la cóclea y cerebro de ratones. (B) Procesamiento alternativo del exón 6: puede estar presente o ausente en las isoformas largas. Las isoformas con exón 6 están presentes en el oído interno. (C) Procesamiento alternativo del exón 31: existen dos variantes del exón 31, una larga y otra corta. (D) Procesamiento alternativo del exón 47: el exón 47 puede estar presente o ausente. En la isoforma de cerebro; el codón de terminación se encuentra dentro de este exón, y el exón 48 contiene la parte 3'UTR. En la isoforma coclear, cuando el exón 47 se encuentra ausente, el exón 48 contiene una región que se traduce y otra parte que constituye la 3'UTR. Los intrones están representados con líneas horizontales y los exones mediante cajas. Las regiones codificantes se indican con cajas negras y las regiones no traducidas (5' y 3'UTRs) con cajas blancas. (Adaptado de Yasunaga *et al.*, 2000).

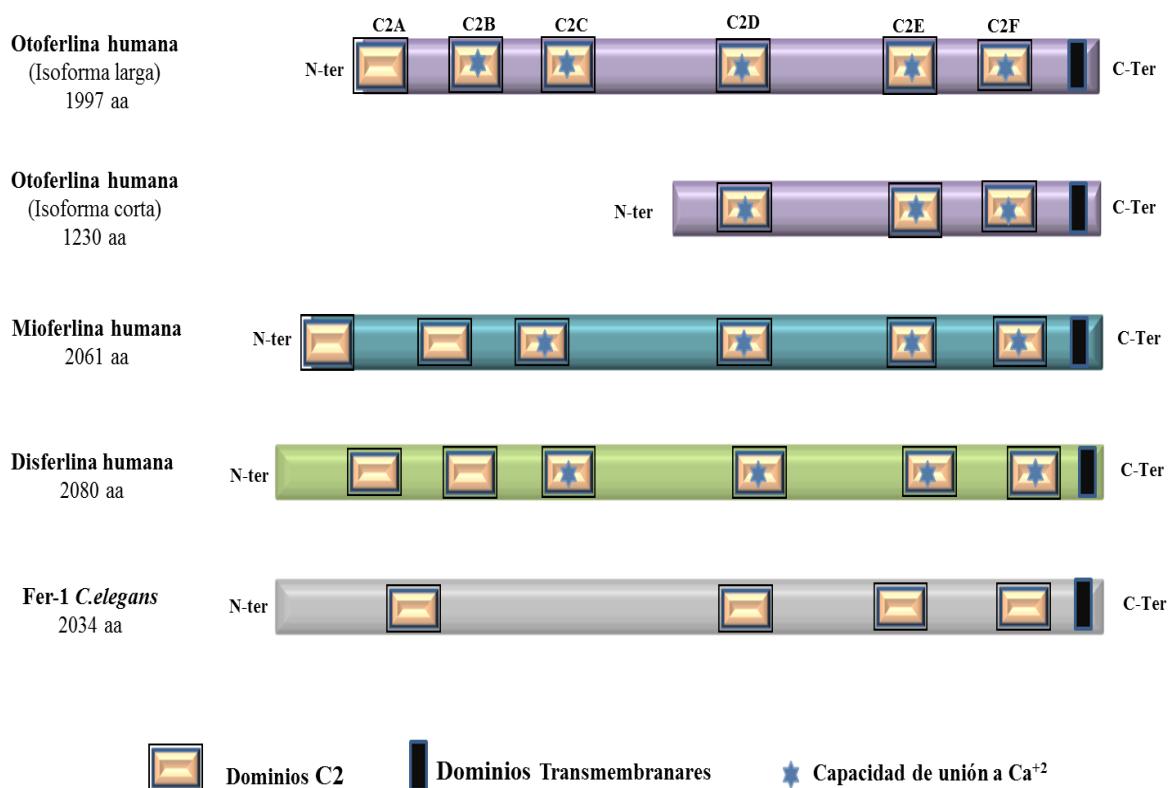
Las mutaciones en el gen *OTOF* son responsables de hipoacusias no sindrómicas neurosensoriales prelocutivas severas o profundas de herencia autosómica recesiva (Yasunaga *et al.*, 1999; Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2003 y 2008). Hasta la fecha han sido descritas más de 90 mutaciones patogénicas (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008; Mahdieh *et al.*, 2012). La mutación *nonsense* p.(Gln829\*) es la tercera causa genética más frecuente de sordera prelocutiva en la población española, después de c.35delG en *GJB2* y del(*GJB6*- D13S1830) en el locus DFNB1 (Migliosi *et al.*, 2002). La mutación patogénica IVS35+1G>T en el gen *OTOF* afecta al sitio de procesamiento (*splicing*) del transcrito. Esta mutación se ha encontrado en dos familias argentinas y una española (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008).

Es preciso destacar que la hipoacusia DFNB9, debida a mutaciones en el gen *OTOF*, cumple con los criterios clínicos de la neuropatía auditiva (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2003; Varga *et al.*, 2003; Leibovici *et al.*, 2008). Este es el término utilizado para describir la discapacidad auditiva neurosensorial caracterizada por la distorsión grave de los potenciales evocados auditivos del tronco cerebral (PEATC), mientras que las otoemisiones acústicas (OEA) no están alteradas (Starr *et al.*,

1996). Esta combinación de resultados en las pruebas de PEATC y OEA indica que el defecto está causado por una lesión primaria situada en las células ciliadas internas, en el nervio auditivo o en la sinapsis entre ambos (Cone-Wesson y Rance, 2000; Starr *et al.*, 2000; Strenzke *et al.*, 2009). La neuropatía auditiva causada por mutaciones en *OTOF* es de tipo presináptico.

### 3.2 Proteína Otoferlina.

La otoferlina es una proteína citosólica con un dominio transmembranar altamente hidrofóbico, localizado en el extremo C-terminal. Dada la gran variedad de isoformas de dicha proteína, haremos referencia a la isoforma larga (NM\_194248, isoforma a), que codifica un polipéptido de 1997 residuos aminoacídicos (Figura 15). La secuencia de la isoforma larga presenta similitud con la del factor de espermatogénesis *fer-1* de *C. elegans* (2034 aa) (Achanzar y Ward, 1997) y con las de dos proteínas humanas: la mioferlina (de 2061 aa) (Davis *et al.*, 2000) y la disferlina (de 2080 aa) (Bashir *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998), ambas implicadas en distrofias musculares (Figura 15). La isoforma larga de la otoferlina presenta 6 dominios C2 (C2A-C2F), mientras que las isoformas cortas presentan sólo tres dominios C2 (Yasunaga *et al.*, 1999; Varga *et al.*, 2006) (Figura 15). Los dominios C2A y C2B carecen de algunos de los 5 residuos de ácido aspártico, que están presentes en cada uno de los cuatro dominios restantes (C2C-C2F) y que tienen la capacidad de unirse a calcio (Chaib *et al.*, 1996; Yasunaga *et al.*, 1999; Yasunaga *et al.*, 2000).

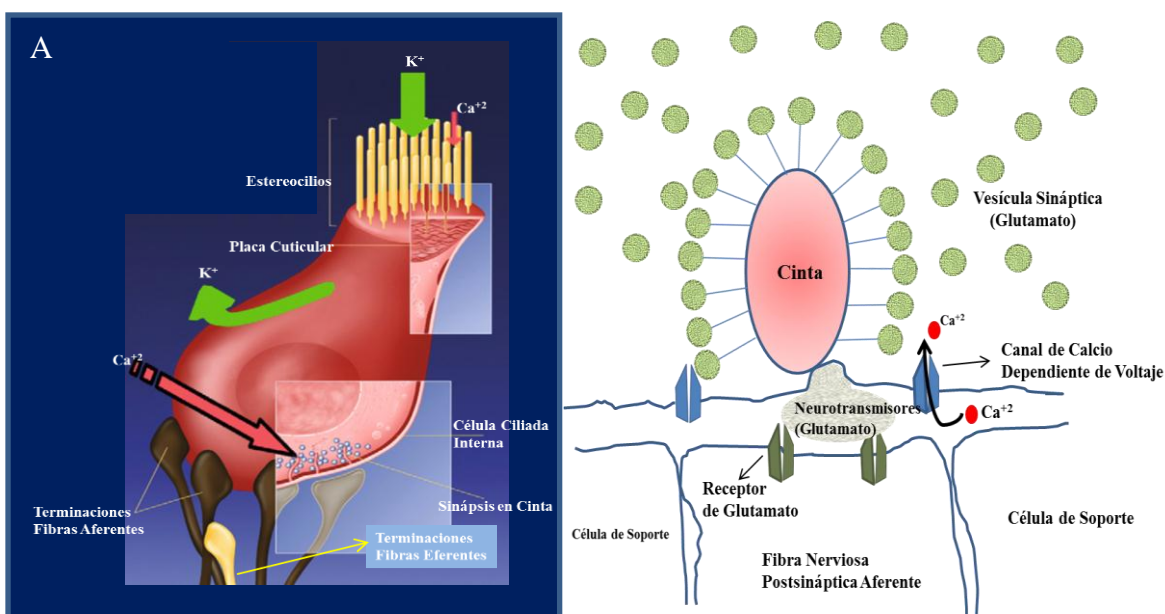


**Figura 15:** Representación esquemática de la otoferlina (isoforma larga y corta), mioferlina y disferlina humana y la proteína *fer-1* de *C. elegans*. Los seis dominios C2 de otoferlina (isoforma larga) se representan con rectángulos amarillos y se designan: C2A (aa 1-97); C2B (aa 254-352); C2C (aa 417-528); C2D (aa 960-1067); C2E (aa 1493-1592) y C2F (aa 1733-1863). Los dominios C2 con capacidad de unión a calcio se representan con una estrella azul (Adaptado de Yasunaga *et al.*, 2000).

Las proteínas con dominios C2 interactúan con fosfolípidos y proteínas. Además, están implicadas en el acoplamiento de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática de la célula y/o su fusión (Rizo y Südhof, 1998).

### 3.3 Otoferlina en el oído interno.

En base a estos datos y teniendo en cuenta que la otoferlina se expresa en las células ciliadas internas y células ciliadas vestibulares de tipo I en el oído interno (Yasunaga *et al.*, 1999), se piensa que esta proteína participa en el tráfico vesicular de las sinapsis que forman las células ciliadas internas con neuronas aferentes del nervio auditivo (Yasunaga *et al.*, 1999; Yasunaga *et al.*, 2000; Parsons, 2006; Robert, 2006, Chantal *et al.*, 2007) (Figura 16 A). La sinapsis que tiene lugar en el oído interno es diferente a la sinapsis convencional y se denomina sinapsis en cinta. Se caracteriza por presentar una estructura ovoidea densa de electrones sobre la que se anclan las vesículas sinápticas (Figura 16 B). Se cree que este tipo de especialización es necesaria para la liberación rápida y precisa de las vesículas sinápticas durante el inicio del estímulo y mientras continúa el mismo. Otra particularidad de esta sinápsis es carecer de las proteínas sinaptotagminas I y II, importantes para la unión al  $Ca^{+2}$ . En la cóclea, la proteína propuesta para desempeñar dicha función es la otoferlina.



**Figura 16:** (A) Esquema de la célula ciliada interna y su innervación aferente y eferente. La deflexión del paquete de estereocilios genera la apertura de canales de  $K^+$ , despolarización de la célula y apertura de canales de  $Ca^{+2}$  próximos a la zona activa de la sinapsis en cinta. El calcio se une a los dominios C2 de la otoferlina (Adaptado de Leivovici *et al.*, 2008). (B) Esquema de la sinapsis en cinta. Se genera la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática presináptica. Se liberan por exocitosis los neurotransmisores (glutamato) hacia los receptores localizados en el botón postsináptico de las fibras aferentes del nervio auditivo. (Adaptado de Fuchs *et al.*, 2003)

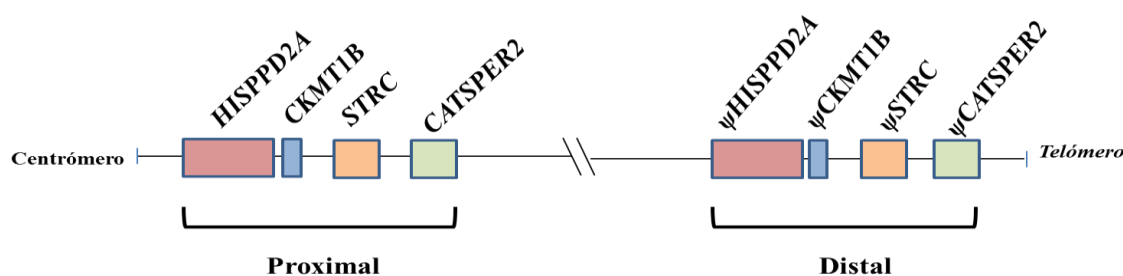
#### 4. Locus DFNB16 (gen *STRC*).

El locus DFNB16 (OMIM 603720) se localiza en el cromosoma 15 (15q15.3) en un intervalo crítico delimitado por los marcadores D15S994 y D15S132 (Villamar *et al.*, 1999). El gen responsable de la hipoacusia DFNB16 es *STRC*, que codifica la estereocilina (Verpy *et al.*, 2001).

##### 4.1 Gen *STRC*.

El gen *STRC* (OMIM 606440) contiene 29 exones, y codifica la estereocilina, una proteína de 1809 residuos aminoacídicos. El gen se encuentra duplicado en tándem en una orientación telómero-centrómero a una distancia menor de 100 kb (Figura 17).

En 2001, Verpy y colaboradores decidieron reconstruir la secuencia específica de cada copia, utilizando la técnica de "paseo génico". Las secuencias de gen y pseudogén son idénticas en un 99.6%. Se concluyó que ambas copias son idénticas desde el exón 1 al 15 (incluidos los 14 primeros intrones), pero difieren desde el intrón 15 al exón 29. La diferencia más significativa que se encontró fue la existencia de un codón de parada prematuro en el exón 20 del pseudogén (Verpy *et al.*, 2001). Hay que señalar que el cromosoma 15 es uno de los siete cromosomas humanos con elevadas tasas de duplicaciones en tándem (Zody *et al.*, 2006).

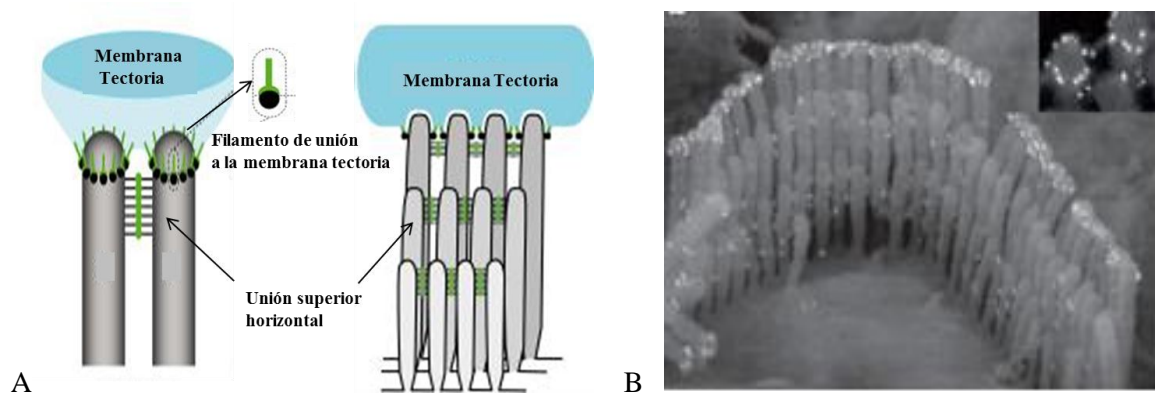


**Figura 17:** Representación esquemática de la región cromosómica 15q15, duplicada en tándem. Se puede observar la localización proximal del gen *STRC* y distal del pseudogén  $\psi$ *STRC*. Se representan con el símbolo ( $\psi$ ) los pseudogenes localizados en la región distal del cromosoma (Adaptado de Zhang *et al.*, 2007).

##### 4.2 Proteína Estereocilina.

La estereocilina, que presenta un péptido señal, es secretada al espacio extracelular, quedando anclada a la membrana plasmática de las células ciliadas mediante un motivo GPI (glicosil-fosfatidilinositol) (Richardson *et al.*, 2011).

La estereocilina se expresa principalmente en las células ciliadas vestibulares y en las células ciliadas externas de la cóclea. En las CCEs, la estereocilina forma parte de las uniones horizontales superiores (*top connectors*) enlazando los estereocilios de su misma hilera entre sí y con los estereocilios adyacentes. Asimismo, bordea a modo de corona los extremos apicales de los estereocilios de mayor longitud (Figura 18 A-B), nexo fundamental para unirlos a la membrana tectoria (Verpy *et al.*, 2011).



**Figura 18:** (A) Representación esquemática de la estereocilina en el paquete de estereocilios y su interacción con la membrana tectoria. Se puede observar la presencia de estereocilina en las uniones superiores y en estrecha interacción de los estereocilios más altos con la membrana tectoria. (B) Inmunodetección de estereocilina en el paquete de estereocilios de las células ciliadas externas maduras. Micrografía electrónica de barrido. Se puede observar la distribución de la estereocilina en forma de corona alrededor de los estereocilios de mayor longitud y su presencia en las uniones horizontales superiores (Adaptado de Verpy *et al.*, 2008).

A partir de estudios en ratones *Strc*<sup>-/-</sup>, se concluyó que la estereocilina es un componente fundamental para el anclaje del estereocilio mayor de la CCE a la membrana tectoria, y que es indispensable para la formación de uniones laterales que mantienen la cohesión del paquete de estereocilios de las CCEs y necesarios para activar las uniones apicales (*tips links*) (Verpy *et al.*, 2011).

## OBJETIVOS

Nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1- Describir el espectro de mutaciones en el locus DFNB1 (genes *GJB2* y *GJB6*, conexinas 26 y 30, respectivamente) y determinar la frecuencia de las mismas en una cohorte de 117 casos argentinos de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva.
- 2.- Identificar nuevos casos de hipoacusia de tipo DFNB9, causada por mutaciones en el gen *OTOF*, para ampliar nuestro conocimiento sobre el espectro de mutaciones en este gen.
- 3.- Investigar la presencia de mutaciones en un grupo de 15 genes (*MYO15A*, *SLC26A4*, *TMIE*, *TMCI*, *CDH23*, *STRC*, *TECTA*, *PCDH15*, *TRIOBP*, *CLDN14*, *MYO6*, *PJVK*, *TMHS*, *BSND* y *SERPINB6*) implicados en hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas, en 8 casos familiares con al menos dos individuos afectados en la misma fratría, como forma de explorar la contribución de dichas mutaciones a este tipo de trastornos en la población argentina.
- 4- Estudiar las correlaciones genotipo-fenotipo (edad de inicio, grado, lateralidad, evolución de la hipoacusia, etc) en nuestros pacientes con mutaciones en los genes estudiados.



## PACIENTES Y MÉTODOS





## 1. Pacientes.

### • Familias incluidas en el estudio.

Reunimos una colección de 117 familias argentinas con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva. Estas familias (un total de 619 individuos) provenían de 5 provincias del país (Buenos Aires, Entre Ríos, La Pampa, San Juan y San Miguel de Tucumán), gracias a la colaboración de especialistas argentinos (otorrinolaringólogos, foniatras, médicos genetistas, biólogos...) y contactos locales en cada una de las provincias (hospitales, clínicas, extraccionistas, padres...).

Los 117 casos se clasificaron en dos grupos: familiares o múltiples, cuando la familia está integrada por más de un individuo afectado (69 casos de nuestra colección); y casos esporádicos o simples, en los que el caso índice es el único individuo de la familia con pérdida auditiva (48 casos de nuestra colección). Según la edad de inicio de la hipoacusia, se clasificaron en tres grupos: hipoacusias prelocutivas, cuando la pérdida auditiva se produce antes de la adquisición del lenguaje (84%); perilocutivas, desde los 2 años hasta los 5 años (4%) y postlocutivas, cuando se manifiestan después de los 5 años (12%). Según el grado de la hipoacusia se diferenciaron en cuatro grupos: leve (3%), moderada (10%), severa (15%) y profunda (72%).

Se excluyeron aquellos casos que presentaban otros signos clínicos además de la hipoacusia. Asimismo, se excluyeron aquellos casos en donde se sospechó que la hipoacusia se debía a una causa ambiental. Se obtuvieron datos sobre la historia clínica de los casos índices (fecha de nacimiento, edad de inicio, lateralidad y grado de la hipoacusia, antecedentes familiares, origen étnico de padres y/o abuelos del paciente). El correcto estado de la audición de los familiares normoyentes fue confirmado mediante estudios audiométricos. Previamente a la extracción de las muestras de sangre necesarias para el estudio, se obtuvieron los correspondientes documentos de consentimiento informado.

## 2. Métodos Generales.

### 2.1 Obtención de ADN genómico y su análisis.

Las muestras de sangre periférica (10-20 ml) de cada uno de los individuos estudiados se recolectaron en tubos con EDTA 5mM como anticoagulante.

### 2.2 Cuantificación del ADN obtenido.

Una vez obtenido el ADN genómico se determinó su concentración por medición de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ), y su pureza se estableció a partir de la relación  $A_{260}/A_{280}$  en un espectrofotómetro *NanoDrop* (v3.1.0 ND-1000, *Thermo Scientific*).

### 2.3 Diseño de cebadores.

Las parejas de cebadores se diseñaron en nuestro laboratorio con los programas bioinformáticos *OLIGO 6* (Molecular Biology Insights, Inc., EEUU) y *Primer 3* ([http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)).

## 2.4 Amplificación de ADN por PCR.

Para amplificar los fragmentos de ADN por reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el siguiente protocolo:

Reactivos	Concentraciones	Volúmenes
H <sub>2</sub> O	----	6,35 µl
Tampón de FastStar Taq DNA Polimerasa (Roche)	10X	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	(10, 15, 20, 25) mM	1,5 µl
dNTPs	1,25mM	2 µl
Cebador directo	10µM	1 µl
Cebador inverso	10µM	1 µl
FastStar Taq DNA Polimerasa (Roche)	5U/ µl	0,15 µl
ADN genómico	20-40 ng/ µl	1,5 µl
		<b>Vr = 15 µl</b>

Se utilizaron diversos programas de amplificación (Figura 19). Todas las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Los productos amplificados fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% o 2%, según se indique.

### Programa 1

Desnaturalización inicial.....95°C.....5'  
 Desnaturalización.....94°C.....30'' }  
 Hibridación.....T °C.....30'' } x30 ciclos  
 Extensión.....72°C.....30'' }  
 Extensión Final.....72°C.....7'  
 Conservación.....12°C

### Programa 2

Desnaturalización inicial.....95°C.....5'  
 Desnaturalización.....94°C.....40'' }  
 Hibridación .....Ti °C → Tf °C.....40'' } touchdown  
 Extensión.....72°C.....30'' } x 5 ciclos  
 Desnaturalización.....94°C.....40'' }  
 Hibridación .....Tf °C.....40'' } x 25 ciclos  
 Extensión.....72°C.....30'' }  
 Extensión final.....72°C.....7'  
 Conservación.....12°C

### Programa 3

Desnaturalización inicial.....95°C.....5'  
 Desnaturalización.....95°C.....50'' } touchdown  
 Hibridación .....Ti °C → Tf °C.....40'' } x 5 ciclos  
 Extensión.....72°C.....1'' }  
 Desnaturalización.....95°C.....50'' }  
 Hibridación .....Tf °C.....50'' } x 25 ciclos  
 Extensión.....72°C.....1'' }  
 Extensión Final.....72°C.....5'  
 Conservación.....12°C

### Programa 4

Desnaturalización inicial.....95°C.....5'  
 Desnaturalización.....94°C.....40'' }  
 Hibridación .....T °C.....40'' } x 30 ciclos  
 Extensión.....72°C.....40'' }  
 Extensión Final.....72°C.....7'  
 Conservación.....12°C

### Programa 5

Desnaturalización inicial.....95°C.....6'  
 Desnaturalización.....94°C.....40'' } x 30 ciclos  
 Hibridación .....T °C.....40'' }  
 Extensión final.....72°C.....5'  
 Conservación.....12°C

### Programa 6

Desnaturalización inicial.....95°C.....5'  
 Desnaturalización.....94°C.....40'' } touchdown  
 Hibridación .....Ti °C → Tf °C.....40'' } x 5 ciclos  
 Extensión.....72°C.....40'' }  
 Desnaturalización.....94°C.....40'' }  
 Hibridación .....Tf °C.....40'' } x 25 ciclos  
 Extensión.....72°C.....40'' }  
 Extensión final.....72°C.....7'  
 Conservación.....12°C

**Figura 19:** Programas de PCR utilizados en este trabajo para la amplificación de los diferentes fragmentos de ADN genómico. La temperatura de hibridación de los cebadores se indicó con 'T'. El *touchdown* consistió en una rampa descendente entre la temperatura de hibridación de inicio (T<sub>i</sub>) y final (T<sub>f</sub>), a razón de 1°C por ciclo (Don *et al.*, 1991).

## 2.5 Purificación del producto de PCR.

Se utilizó el *kit* comercial *ExoSAP-IT* (USB Corporation). Dicho *kit* proporciona un método enzimático (*Exonuclease I / Shrimp Alkaline Phosphatase*) que elimina el exceso de cebadores y nucleótidos de la reacción PCR para evitar que interfieran con la reacción de secuenciación. Las condiciones y el programa que se utilizaron fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen	<b>Programa 7</b>
Producto de PCR	5 µl	Activación de la enzima....37°C....15'
<i>ExoSAP-IT</i>	2 µl	Inactivación de la enzima...80°C....15'
		Conservación.....12°C

## 2.6 Secuenciación de ADN.

Para la secuenciación de los productos PCR purificados se utilizó el *kit* comercial: *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) que contiene ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, y ddNTPs marcados con diferentes fluoróforos bajo las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen	<b>Programa 8</b>
H <sub>2</sub> O	12,5 µl	Desnaturalización inicial...94°C.... 3'
Tampón Big Dye (5X)	2,25 µl	Desnaturalización.....96°C...10''
Premix BigDye 1.1	1,75 µl	Hibridación.....50°C.....5''
Cebador (10 µM)	1 µl	Extensión final.....60°C.....4'
Producto PCR purificado	2,5 µl	Conservación.....12°C
	V <sub>T</sub> = 20 µl	

} 25 ciclos

Los productos de la secuenciación se purificaron por el método acetato-etanol, se resolvieron en un secuenciador automático ABI PRISM 3130 de cuatro capilares (Applied Biosystems), y los resultados se analizaron con el programa informático *Sequencing Analysis v.5.1.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## 2.7 Análisis de las secuencias.

Se utilizaron con diferentes programas bioinformáticos:

✚ **Para analizar una única secuencia:**

- ChromasLite* v2.1 (Technelysium Pty Ltd).
- FinchTV* v1.4 (Perkin Elmer) (<http://www.geospiza.com>).

✚ **Para analizar más de una secuencia del mismo fragmento:**

- DNASTAR* v5.3 (*DNASTAR* Inc., *University of Sussex*).

## 2.8 Nomenclatura y análisis de los cambios identificados.

- ✚ La nomenclatura de las nuevas variantes de secuencia descritas en este trabajo fue verificada con el programa informático *Mutalyzer*, de acceso gratuito en internet (<http://mutalyzer.nl>) (Wildeman *et al.*, 2008).

- ✚ El alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos en las diferentes especies se realizó con el programa bioinformático *ClustalW2*, disponible de forma gratuita en internet: (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).
- ✚ El grado de conservación de los residuos afectados por mutaciones de sustitución de aminoácidos (*missense*) se determinó con los programas bioinformáticos *ConSeq* (Berezin *et al.*, 2004) y *ConSurf* (Ashkenazy *et al.*, 2010), ambos de acceso gratuito en internet: (<http://conseq.tau.ac.il/>) y (<http://consurf.tau.ac.il/>).
- ✚ La predicción de los posibles efectos patogénicos de cambios por sustitución de aminoácidos (mutaciones *missense*) se realizó con el programa *Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2)* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei *et al.*, 2010) y *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)* (<http://sift.jcvi.org/>) (Ng y Henikoff., 2001).

### 2.9 Ensayos de minisequenciación (*SNaPShot*).

El método de minisequenciación (*SNaPShot*) se empleó para la búsqueda de mutaciones puntuales en el ADN. Se basa en la extensión de un cebador no marcado, que termina por su extremo 3' en el nucleótido inmediatamente anterior al *SNP* en estudio. En presencia de didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorescencia (**G**: azul, **C**: negra, **T**: roja y **A**: verde), la *AmpliTaq* ADN polimerasa aumenta la longitud del cebador en un nucleótido (añade un solo ddNTP), complementario al molde de ADN en estudio. Se utilizó el *kit* comercial *ABI PRISM SNaPShot Multiplex* (Applied Biosystems).

#### ❖ Amplificación y PCR-*SNaPShot*.

Para realizar el ensayo se procedió de la siguiente manera:

- **Amplificación de ADN por PCR** (apartado 2.4). Se utiliza una pareja de cebadores sin marcar. Las condiciones y programa utilizado se indican en cada caso.
- **Purificación del producto de PCR** (apartado 2.5).
- **Amplificación por PCR-*SNaPShot***.

Reactivos	Volumen	<b>Programa de Elongación</b>
H <sub>2</sub> O	3 µl	
Mezcla <i>SNaPShot</i>	3 µl	
Cebador marcado (0.4 µM)	1 µl	
Producto PCR purificado	3 µl	
V <sub>t</sub> = 10 µl		} x 25 ciclos

- **Purificación del producto de PCR-*SNaPShot***. Se utilizó el *kit* comercial *SAP (USB Corporation)*. Dicho *kit* emplea la enzima *SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)* para eliminar los ddNTPs sobrantes de la reacción. Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes:

Reactivos	Volumen	Programa de Incubación
Tampón <i>SAP</i> (10X)	1,2 µl	37°C...60'
<i>SAP</i>	1 µl	75°C...15'
Producto de PCR <i>SNaPShot</i>	10 µl	12°C
Vt = 12,2 µl		

- **Análisis de las muestras.** Se mezclaron 4 µl del producto de la reacción anterior, 8 µl de formamida y 0,6 µl del marcador de peso molecular *LIZ* 120 (GeneScan™120 *LIZ*, Applied Biosystems). Se incubó a 95°C durante 5 minutos. Se realizó electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI PRISM* 3130 (Applied Biosystems). Las variantes de secuencia se identificaron por el ddNTP añadido en la elongación específica y por la longitud del cebador que se haya empleado en la reacción de minisequenciación.

## 2.10 Genotipado para marcadores moleculares de tipo microsatélite.

Los microsatélites están constituidos por repeticiones consecutivas de 1 a 6 nucleótidos y son utilizados como marcadores genéticos altamente polimórficos. Para los estudios de segregación se emplearon microsatélites descritos en la literatura (Dib *et al.*, 1996). Se seleccionaron aquellos que se encontrasen cercanos a cada uno de los genes estudiados. Para su detección, un cebador de cada pareja de oligonucleótidos fue marcado con un fluoróforo: **6FAM** o **HEX** (Sigma Aldrich) en el extremo 5'. Las amplificaciones de ADN por PCR se realizaron en un volumen final de 15 µl con MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM final (en caso contrario, se especifica) y se utilizó el programa de PCR nº5 (apartado 2.4).

### 2.10.1 Preparación de las muestras para el genotipado.

Varios marcadores amplificados independientemente se reunieron para su genotipado conjunto. Según la intensidad de las bandas en un gel de agarosa (1,5%), se mezclaron diferentes cantidades de los productos de PCR de los diferentes marcadores de un mismo individuo y se añadió H<sub>2</sub>O hasta llegar a un volumen final de 12 µl. De ésta mezcla, se tomó 1 µl y se añadieron 12 µl de formamida y 0,2 µl del marcador de peso molecular GeneScan-500-ROX (Applied Biosystems). Posteriormente, las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C por 5 minutos. Se determinó la emisión fluorescente y el tamaño de los productos de amplificación en un analizador genético *ABI PRISM* 3130 (Applied Biosystems), basado en electroforesis capilar.

### 2.10.2 Análisis de haplotipos.

Se empleó el programa bioinformático *Cyrillic* 2.02 (<http://www.cyrillicsoftware.com>) para la construcción de los árboles genealógicos en los que se muestran los resultados del análisis de haplotipos de cada familia.



### 3. Locus DFNB1 (gen *GJB2*).

Se utilizaron dos ensayos de minisequenciación para la detección múltiple de las mutaciones más frecuentes en el gen *GJB2* en la población española.

#### 3.1 Ensayos de minisequenciación (*SNaPShot*).

##### 3.1.1 Ensayo 1 de minisequenciación.

El ensayo 1 permite la detección de las mutaciones c.35delG, p.(Trp24\*), p.(Glu47\*) y p.(Trp77Arg), que se encuentran en el exón 2 del gen *GJB2*. Los procedimientos de dicho ensayo se describen en el apartado 2.9.

##### 3.1.1.1 Amplificación de ADN por PCR.

Los cebadores, las condiciones y el programa de PCR utilizados para el fragmento de 471 pb que contiene las cuatro mutaciones en estudio se detallan en la [Tabla 3](#).

**Tabla 3:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados en la amplificación de molde para el ensayo 1 de minisequenciación.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 2	PROSNAP-1A	CAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCCT	471 pb	15mM	<b>Programa 2</b> Tr: 62°C
	PROSNAP-1B	GATGCGGACCTTCTGGGTTTT			

##### 3.1.1.2 Amplificación por PCR-*SNaPShot*.

Los cebadores utilizados para la detección de las cuatro mutaciones en el gen *GJB2* se describen en la [Tabla 4](#).

**Tabla 4:** Cebadores utilizados en el ensayo 1 de minisequenciación.

Mutación	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'
c.35delG	Inversa	AGTGTGTTGTTTCACACCCCC
p.(Trp24*)	Inversa	CGAAAAATGAAGAGGACGGTGAGC
p.(Glu47*)	Inversa	GGTGTGTCAGACAAAGTCGGCCTGCT
p.(Trp77Arg)	Directa	CACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTA

##### 3.1.2 Ensayo 2 de minisequenciación.

El ensayo 2 fue diseñado para la detección de las mutaciones IVS1+1G>A, c.439G>A (p.(Glu147Lys)) y c.617A>G (p.(Gln206Ser)). En este caso se amplificaron dos fragmentos en una PCR múltiple. Los pasos seguidos en dicho ensayo se describen en el apartado 2.9.

##### 3.1.2.1 Amplificación de ADN por PCR.

El primer fragmento corresponde a un amplicón de 185 pb en el exón 1 del gen *GJB2*, y el segundo fragmento corresponde a un amplicón de 389 pb en el exón 2 del gen *GJB2*. Las condiciones y los cebadores utilizados se detallan en la [Tabla 5](#).

**Tabla 5:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los fragmentos que contienen las tres mutaciones del gen *GJB2* en estudio.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 1	PROSNAP-3A	CGCGCTCCTCTCCCCGACTCG	185 pb	10mM	<b>Programa 2</b> T <sub>r</sub> : 67°C
	PROSNAP-3B	CCTCCCCGCGCCAGGTTCT			
Exón 2	PROSNAP-2A	GGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAA	389 pb		
	PROSNAP-2B	GTTGCCTCATCCCTCTCATGCTGTCT			

### 3.1.2.2 Amplificación por PCR *SNaPShot*.

En la [Tabla 6](#) se detallan los cebadores empleados en la reacción de minisequenciación del Ensayo 2.

**Tabla 6:** Cebadores utilizados en la reacción de minisequenciación del ensayo 2.

Mutación	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'
IVS1+1G>A	Directa	GCGCTTCCTCCCGACGCAG
p.(Glu147Lys)	Inversa	ATAGAAGACGTACATGAAGGCGGCTT
p.(Gln206Ser)	Directa	TTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGA

### 3.2 Secuenciación de la región promotora, exón 1 y exón 2 del gen *GJB2*.

Para la secuenciación de la región promotora del gen *GJB2*, de los 2 exones y de sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, fueron utilizados los cebadores diseñados durante este estudio que se detallan en la [Tabla 7](#). Para la amplificación de los fragmentos de ADN y su posterior secuenciación se siguieron las condiciones descritas en los apartados 2.4-2.7. El fragmento correspondiente a la región promotora y exón 1 requirió la adición de 3 µl de tampón *CG-RICH* (Roche), dado que contenía una región muy rica en citosinas y guaninas.

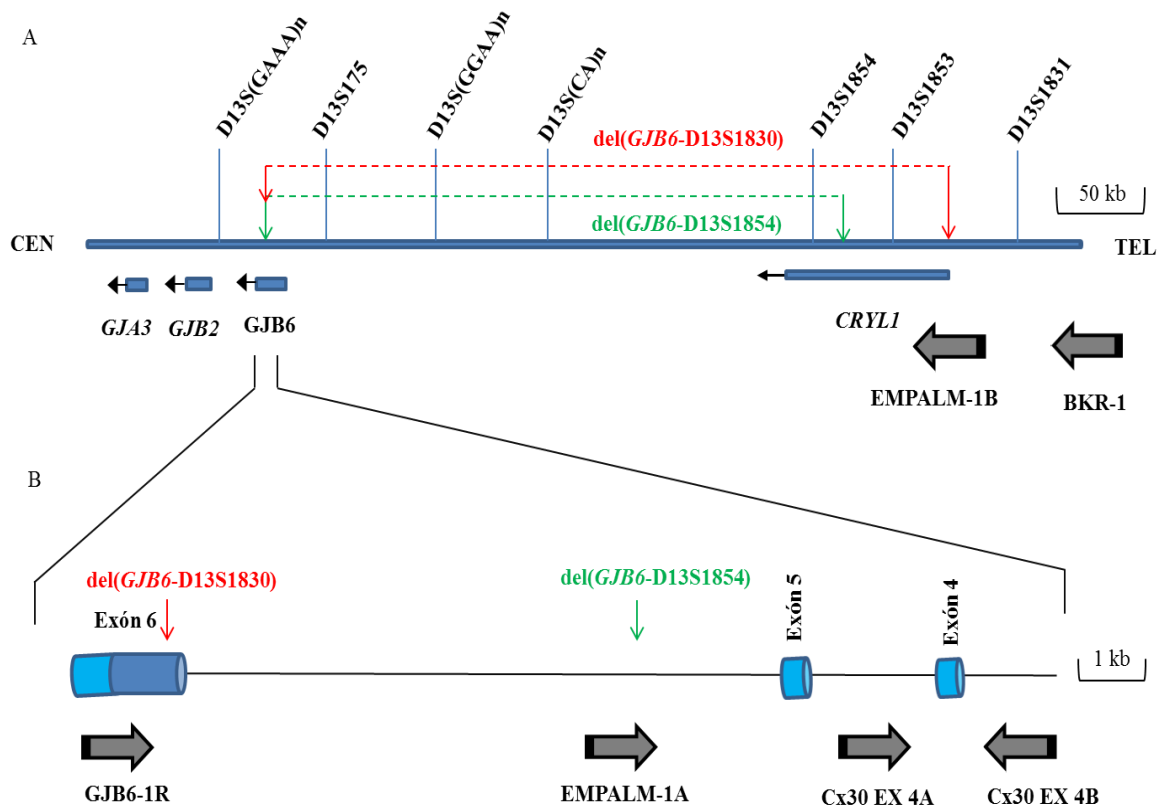
**Tabla 7:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de la región promotora, exón 1 y exón 2 del gen *GJB2* y sus respectivas regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Promotor y Exón 1	<i>GJB2</i> -P1	GGGGCTCAAAGGAAGACTAGGA	499 pb	15mM	<b>Programa 4</b> T: 62°C
	<i>GJB2</i> -P2	AAGGACGTGTGTTGGTCCAG			
Exón 2	<i>GJB2</i> -1A	TGCTTGCTTACCCAGACTCA	486 pb		<b>Programa 4</b> T: 60°C
	<i>GJB2</i> -1B	GCGGACCTTCTGGGTTTT			
	<i>GJB2</i> -2A	GCCTACCGGAGACATGAGAA	490 pb		
	<i>GJB2</i> -2B	GGGAAATGCTAGCGACTGAG			

### 4. Locus *DFNB1* (gen *GJB6*).

#### ❖ Ensayo para detectar las mutaciones del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854).

Para la detección de las dos deleciones que se encuentran en el gen *GJB6* (13q12) se empleó un ensayo de PCR "múltiple" (del Castillo *et al.*, 2005). El ensayo se basó en la amplificación combinada de los fragmentos de ADN que contienen el empalme de los puntos de rotura de cada deleción ([Figura 20](#)). Además, se coamplificó el exón 4 del gen *GJB6* que sirvió como control de eficacia de la PCR y para distinguir los homocigotos de los heterocigotos para las deleciones mencionadas, ya que ambas eliminan dicho exón.



**Figura 20:** (A) Posición de los marcadores moleculares respecto al gen *GJB6*. Se muestran las 2 deleciones descritas: *del(GJB6-D13S1830)* de 309 kb y *del(GJB6-D13S1854)* de 232 kb, representadas con líneas de puntos rojos y verdes, respectivamente. (B) Localización de los cebadores utilizados en el ensayo de detección múltiple. Los cebadores *GJB6-1R* y *BKR-1* se utilizaron para la amplificación del empalme del punto de rotura de la mutación *del(GJB6-D13S1830)*; la pareja de cebadores *EMPALM-1A* y *EMPALM-1B* amplificaron el empalme de los puntos de rotura de la mutación *del(GJB6-D13S1854)* y los cebadores *Cx30 Ex4A* y *Cx30 Ex4B*, el exón 4 del gen *GJB6* (Adaptado de del Castillo *et al.*, 2005).

La amplificación de los cebadores se realizó según lo indicado en el apartado 2.4 y en la [Tabla 8](#). Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

**Tabla 8:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para detectar dos deleciones en el gen *GJB6*.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 4	<i>Cx30 Ex4A</i>	CGTCTTGGGGGTGTGCTT	333 pb	15mM	Programa 2
	<i>Cx30 Ex4B</i>	CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA			
<i>del(GJB6-D13S1830)</i>	<i>GJB6-1R</i>	TTTAGGGCATGATTGGGGTGATT	460 pb		
	<i>BKR1</i>	CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT			
<i>del(GJB6-D13S1854)</i>	<i>EMPALM-1A</i>	TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT	564 pb		
	<i>EMPALM-1B</i>	CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT			

## 5 Locus DFNB9 (gen *OTOF*).

### 5.1 Ensayo *RFLP* para detectar la mutación p.(Gln829\*).

Se amplificó el exón 22 y sus regiones intrónicas flanqueantes. Las condiciones de amplificado fueron las indicadas en el apartado 2.4 y se utilizaron los cebadores indicados en la [Tabla 9](#).

**Tabla 9:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar el exón 22 del gen *OTOF*.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 22	<i>OTOF</i> -EX22-A	GCCCGAGCTGTCCCCCAGTTG	253 pb	10mM	<b>Programa 3</b> Tf : 64°C
	<i>OTOF</i> -EX22-B	AGCCTCCTGATTGAGCCCCCTGAT			

El producto amplificado (253 pb) fue digerido con la enzima de restricción *Bfa*I en las condiciones recomendadas por el fabricante (Fermentas). Los fragmentos de la digestión se revelaron en un gel de agarosa al 3% (3 partes de agarosa Seakem® GTG® (Lonza) y 1 parte de agarosa Nusieve® GTG® (Lonza). El fragmento silvestre (*wt*) carece de un sitio *Bfa*I. La mutación p.(Gln829\*) crea un sitio de restricción, lo que genera 2 fragmentos (uno de 129 pb y otro de 124 pb).

### 5.2 Análisis de fragmentos para detectar la mutación c.2905\_2923delinsCTCCGAGCGCA.

La detección de la mutación c.2905-2923delinsCTCCGAGCGCA (p.(Ala969Leufs\*30)) correspondiente a una delección de 19 nucleótidos (5'-GCCCGCAGCCTCTTTGCC-3') y una inserción de 11 nucleótidos (5'-CTCCGAGCGCA-3') ubicada en el exón 25 del gen *OTOF*, se realizó mediante determinación del tamaño de los productos amplificados (el fragmento amplificado con la mutación tiene 8 (es decir, 19-11) nucleótidos menos que el fragmento normal). Se procedió según se indica en el apartado 2.10.1. Los cebadores correspondientes se indican en la [Tabla 10](#), (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2003).

**Tabla 10:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar el exón 25 del gen *OTOF*.

Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
<i>OTOF</i> -EX25 A2	GACCCCTCACTCGAAGCCTCAC	(260-280) pb	10mM	<b>Programa 3</b> Tf: 63°C	6 FAM
<i>OTOF</i> -EX25 B2	TCCAGTCCCCACAGGCTCACA				

### 5.3 Ensayo de minisequenciación (*SNaPShot*) para la detección de la mutación IVS35+1G>T.

La mutación IVS35+1G>T, localizada en el intrón 35 del gen *OTOF*, afecta el sitio de procesamiento de los transcritos. Se amplificó un fragmento molde de 232 pb. Las condiciones y los cebadores utilizados se detallan en la [Tabla 11](#) (Migliosi *et al.*, 2002).

**Tabla 11:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar el exón 35 del gen *OTOF* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 35	<i>OTOF</i> -EX35A	GGCCTTCCTGCTCTGCTCATTT	232 pb	15mM	<b>Programa 2</b> Tf: 62°C
	<i>OTOF</i> -EX35B	CGCCCCACACACCCTAGAA			

La reacción de minisequenciación se realizó como se describe en el apartado 2.9.1. El cebador empleado se describe en la [Tabla 12](#).

**Tabla 12:** Secuencia del cebador utilizado en la reacción de minisequenciación para detectar la mutación IVS35+1G>T del gen *OTOF*.

Mutación	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'
IVS35+1G>T	Inversa	ACCCTAGAAGGGTCTGCTCCTAGGCTCTCA

#### 5.4 Ensayo de minisequenciación (*SNaPShot*) para la detección de la mutación p.(Asp1563Asn).

Se amplificó un fragmento molde de 283 pb. Las condiciones y los cebadores utilizados se detallan en la [Tabla 13](#).

**Tabla 13:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar el exón 39 del gen *OTOF* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 39	<i>OTOF</i> -EX39-A	CTCCCACCCTAGCCAATCCTTAA	283 pb	15mM	Programa 2 T <sub>f</sub> : 62°C
	<i>OTOF</i> -EX39-B	TGGAGGCAAAGCAGGCACACT			

La reacción de minisequenciación se realizó como se describe en el apartado 2.9. El cebador empleado se describe en la [Tabla 14](#).

**Tabla 14:** Secuencia del cebador utilizado en la reacción de minisequenciación para detectar la mutación p.(Asp1563Asn) en el exón 39 del gen *OTOF*.

Mutación	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'
p.(Asp1563Asn)	directa	CATGCTGACGGTGGCTGTGTAT

#### 5.5 Análisis de haplotipos.

El estudio se realizó mediante el genotipado para cuatro marcadores de tipo microsatélite próximos al gen *OTOF*, en la región 2p23.1, en el siguiente orden: cen-D2S174-D2S2350-*OTOF*-D2S2223-D2S158-tel (Dib et al., 1996). Se procedió como se indica en el apartado 2.10.1. Los cebadores y condiciones empleadas se muestran en la [Tabla 15](#).

**Tabla 15:** Marcadores microsatélites de la región cromosómica 2p23.1 (*locus* DFNB9).

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D2S174	Directa	AGGCTGAATCCCACCTCC	(203-221) pb	10mM	Programa 5	HEX
	Inversa	TTAGAGCACACATGGTCACTCC				
D2S2350	Directa	CCTTCTGATGGGGGAG	(88-100) pb	15mM		6FAM
	Inversa	TGGCCCTATGTAGTCTCTTT				
D2S2223	Directa	CACTGCGCCTAGCCTC	(182-200) pb	10mM		6FAM
	Inversa	GGCGATTTATGAATAATCCTGC				
D2S158	Directa	CCACCATATCCAGTCTGAGC	(266-278) pb	10mM		6FAM
	Inversa	ATGAAACAACCAACTGAGAATA				

#### 5.6 Secuenciación del gen *OTOF*.

Para la secuenciación de los 48 exones del gen *OTOF* y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores detallados previamente (Migliosi *et al.*, 2002; Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2003). Para la amplificación y purificación de los fragmentos de ADN se siguieron

las condiciones descritas en los apartados 2.4 y 2.5, respectivamente. Posteriormente, se procedió según se indica en el apartado 2.6 para la reacción de secuenciación del fragmento en estudio.

## 6. Locus DFNB16 (gen *STRC*).

### 6.1 Detección de deleciones en la región que contiene el gen *STRC*. Ensayo de PCR múltiple del marcador D15S784.

Para detectar la presencia o ausencia del marcador D15S784 se utilizaron las condiciones y cebadores detallados en la [Tabla 16](#).

**Tabla 16:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la amplificación del exón 4 del gen *GJB6* y del marcador D15S784.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
DFNB1	<i>GJB6</i> -Ex4A	CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT	333 pb	15 Mm	<b>Programa 2</b> Tr: 58°C
	<i>GJB6</i> -Ex4B	CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA			
DFNB16	D15S784 A	GAGACCCTGTCTCAAAACAC	168 pb		
	D15S784 B	GAGGAATGACTGAAATGATT			

Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

### 6.2 Ensayo de detección mediante PCR-AFLP.

La comparación de secuencias entre el gen *STRC* y su pseudogén reveló que el gen contiene una secuencia de 31 nucleótidos (28 nucleótidos anterior al inicio del exón 23) que no está presente en su pseudogén. Un ensayo de PCR-AFLP (siglas en inglés de *Amplified Fragment Length Polymorphism*), desarrollado en nuestro laboratorio, permite distinguir la presencia o ausencia de este trecho de secuencia.

Para el ensayo PCR-AFLP se utilizó una pareja de cebadores que amplifican el gen *STRC* (228 pb) y el pseudogén *STRC* (197 pb) simultáneamente ([Tabla 17](#)). Las condiciones utilizadas para la amplificación de los fragmentos de ADN se describen en el apartado 2.4.

**Tabla 17:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para detectar presencia o ausencia del gen *STRC* y de su pseudogén.

Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
<i>AFLP</i> -Ex23A	TGGCATCTCCAATCACTTCTTGTTTC	15mM	<b>Programa 1</b> T: 63°C
<i>AFLP</i> -Ex23B	AATGTCCCTCGTACATCTGCACAA		

Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

### 6.3 Análisis de haplotipos.

Para el análisis de haplotipos se utilizaron cuatro marcadores microsatélites próximos al gen *STRC* (15q15.3) en el siguiente orden: cen-D15S780-D15S778-*STRC*-D15S1039-D15S126-tel. El genotipado se llevó a cabo como se indica en el apartado 2.10.1 y los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 18](#).

**Tabla 18:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites en el *locus* DFNB16.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D15S780	Directa	AAATTTGCAAGTTGGACAGAA	(128-134) pb	10mM	Programa 5 T: 54°C	6FAM
	Inversa	CTGATTGGAAGTTCCGTGTG				
D15S778	Directa	TGCATTCCAGCCACTGACAG	(172-188) pb	15mM	Programa 5 T: 56°C	HEX
	Inversa	GGGATTACAGGTGCATGAGCT				
D15S1039	Directa	TGCCGGTAGTAACATCTG	(257-275) pb	10mM	Programa 5 T: 56°C	HEX
	Inversa	CCAAGGATAAAGTATTTGTGTC				
D15S126	Directa	GTGAGCCAAGATGGCACTAC	(188-198) pb	15mM	Programa 5 T: 56°C	6FAM
	Inversa	GCCAGCAATAATGGGAAGTT				

### 7. Locus DFNB3 (gen *MYO15A*).

#### ❖ Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cinco marcadores moleculares de tipo microsatélite próximos al gen *MYO15A*, en la región 17p11.2, en el siguiente orden: cen-D17S953-D17S2196-D17S1794-(*MYO15A*-D17S2207)-D17S1871-tel. Los cebadores y condiciones de PCR correspondientes se muestran en la [Tabla 19](#).

**Tabla 19:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del *locus* DFNB3.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D17S953	Directa	ACTATCCGCCAATACA	(119-131) pb	15mM	Programa 1 T: 56°C	HEX
	Inversa	AAGGGCTTGCTTTGAC				
D17S2196	Directa	CCAACATCTAGAATTAATCAGAATC	(139-163) pb	15mM	Programa 1 T: 52°C	HEX
	Inversa	ATATTTCAATATTGTAACCAGTCCC				
D17S1794	Directa	GGTAGAGATGGGTTTCACCA	(179-189) pb	15mM	Programa 1 T: 56°C	HEX
	Inversa	GTGTGTCCAGACTTTGACGA				
D17S2207	Directa	TATTCTTACCACCTCCCCTG	(135-155) pb	15mM	Programa 1 T: 60°C	6FAM
	Inversa	CAGGACCTGCTAGTGCAGG				
D17S1871	Directa	CGTGGCCTATTATGAGACTTC	(168-176) pb	15mM	Programa 1 T: 60°C	6FAM
	Inversa	GATTTAGGTAGGGTTCTCCAG				

### 8 Locus DFNB4 (gen *SLC26A4*).

#### 8.1 Análisis de haplotipos.

El estudio se realizó mediante el genotipado para cuatro marcadores moleculares de tipo microsatélite próximos al gen *SLC26A4*, en la región 7q31, en el siguiente orden: cen-D7S2420-D7S496-(*SLC26A4*-D7S2459)-D7S692-tel. Los cebadores y condiciones empleadas se muestran en la [Tabla 20](#).

**Tabla 20:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del *locus* DFNB4.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D7S2420	Directa	CCTGTATGGAGGGCAAATA	(240-292) pb	15mM	Programa 5 T: 58°C	6FAM
	Inversa	AAATAATGACTGAGGCTCAAAAACA				
D7S496	Directa	AACAACAGTCAACCCACAAT	(129-141) pb			HEX
	Inversa	GCTATAACCTCATAANAAACCAAAA				
D7S2459	Directa	AAGAAGTGCATTGAGACTCC	(140-152) pb		6FAM	
	Inversa	CCGCCTTAGTAAAACCC				
D7S692	Directa	CTGATGATTGCTATAGATATTCATC	(161-171) pb		Programa 5 T: 60°C	HEX
	Inversa	TGTAACACTTTTGTAGAAGAACCT				

### 8.2 Ensayo *RFLP* para detectar la mutación p.(Ala310Val).

Se amplificó el fragmento correspondiente a los exones 7 y 8 y sus regiones intrónicas flanqueantes, utilizando los cebadores y las condiciones de amplificado que se indican en la [Tabla 21](#).

**Tabla 21:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar el amplicón (exón 7-8) del gen *SLC26A4*.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 7-8	PS-EX7A	TGTGTGTGTGTGCGTGTGT	567 pb	20Mm	Programa 1 T: 58°C
	PS-EX8B	CTGTTTGCTTATGGTTGTTTCTTC			

El producto amplificado (567 pb) fue digerido con la enzima de restricción *MaeIII* en las condiciones recomendadas por el fabricante (Fermentas). Los fragmentos de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa al 3% (3 partes de agarosa Seakem® GTG® (Lonza) y 1 parte de agarosa Nusieve® GTG® (Lonza). El fragmento silvestre (*wt*) carece de un sitio *MaeIII*. La mutación p.(Ala310Val) crea un sitio de restricción, lo que genera 2 fragmentos (uno de 230 pb y otro de 337 pb).

### 8.3 Secuenciación del gen *SLC26A4*.

Para la amplificación de los fragmentos de ADN se siguieron las condiciones descritas en el apartado 2.4, cuyo protocolo fue modificado según se indica en las [Tablas 22 y 23](#). Posteriormente se purificaron los productos de PCR (apartado 2.5). Las condiciones que se utilizaron para la reacción de secuencia fueron las descritas en el apartado 2.6 y su análisis, según se indica en los apartados 2.7 y 2.8. Para la secuenciación de los 20 exones codificantes del gen *SCL26A4* y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores detallados en la [Tabla 23](#).



**Tabla 22:** Condiciones utilizadas para amplificar los fragmentos de ADN correspondientes al gen *SLC26A4*.

Reactivos	Concentraciones	Volúmenes
H <sub>2</sub> O	----	6,48 µl
Tampón de FastStar Taq DNA Polimerasa (Roche)	10X	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	15 o 20 mM	1,5 µl
dNTPs	1,25mM	2,4 µl
Cebador directo	10µM	0,6 µl
Cebador inverso	10µM	0,6 µl
FastStar Taq DNA Polimerasa (Roche)	5U/ µl	0,12 µl
ADN genómico	20-40 ng/ µl	1,8 µl
		<b>Vr = 15 µl</b>

**Tabla 23:** Cebadores y condiciones de PCR para el amplificado de los exones y regiones intrónicas flanqueantes en el gen *SLC26A4*.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR								
Exón 2	PS- Ex2A	TTCTGTCTCCTCGCTCTTCCCCTCC	340 pb	20mM	<b>Programa 1</b> T: 62°C								
	PS- Ex2B	CCGCACCCACTCTCGCC											
Exón 3	PS- Ex3A	TGCAAATGGTGTGACTGAG	242 pb		20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C							
	PS- Ex3B	AACTCCTGCTGGAGACCAGA											
Exón 4	PS- Ex4A	AAGTTGAGGACTTCTGCATAC	232 pb				20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C					
	PS- Ex4B	GCCAAAACACTTTAAACATGA											
Exón 5	PS- Ex5A	ACCCTATGCAGACACATTGA	366 pb						20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C			
	PS- Ex5B	TTCCAGGAAATTACTTTGTTTT											
Exón 6	PS- Ex6A	AGCTTGATGTAATATTTCCAGAGAG	288 pb								20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C	
	PS- Ex6B	GGAATGAACAGTGACCCATC											
Exón 7-8	PS- Ex7A	TGTGTGTGTGTGCGTGTGT	567 pb	20mM									<b>Programa 1</b> T:58°C
	PS- Ex8B	CTGTTGTCTTATGGTTGTTCTTC											
Exón 9	PS- Ex9A	GGAAAAAGGATGGTGGTCAA	246 pb		15mM	<b>Programa 1</b> T: 60°C							
	PS- Ex9B	TTTCCAGCCCTATAAAACCAGT											
Exón 10	PS- Ex10A	CGAAGGCTTGGCAAAGATTCA	223 pb		20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C							
	PS- Ex10B	CCATTCTCGACTTGTCTC											
Exón 11-12	PS- Ex11A	GAAGACACAAGGAGAAGGA	436 pb		20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C							
	PS- Ex12B	GTGATATGGCAGGAAGCATAT											
Exón 13	PS- Ex13A	TCACATGATGGTACCTGATACATT	234 pb		15mM	<b>Programa 1</b> T: 60°C							
	PS- Ex13B	AAAATGGTATAAGGAAGCTCAGAG											
Exón 14	PS- Ex14A	GGCTCTTTAGTAGCTGTTGTTTT	196 pb	15mM	<b>Programa 1</b> T: 60°C								
	PS- Ex14B	GTAAACCCAAGTCCAGCAA											
Exón 15	PS- Ex15A	CCTTGCTAAGTAGCCAGAAATG	254 pb	20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C								
	PS- Ex15B	TTGGACCCCAAGTAAATACTTGT											
Exón 16	PS- Ex16A	CCTTTGAGAAATAGCCTTCCAG	228 pb	20mM	<b>Programa 1</b> T: 62°C								
	PS- Ex16B	AAAGGAAATAATTTAAGGGGG											
Exón 17	PS- Ex17A	TTTGATATGAATGGTTGAAAGATT	343 pb	20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C								
	PS- Ex17B	ATTGCCAAAGCTCCAAATG											
Exón 18	PS- Ex18A	TCCTGAGCAAGTAACTGAATGC	190 pb	20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C								
	PS- Ex18B	GAAAGGGCTACGGGAAAGT											
Exón 19	PS- Ex19A	GGAACAAACAAACATTGTG	216 pb	20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C								
	PS- Ex19B	AGAAAAGATACATCTGTAGAAAGG											
Exón 20	PS- Ex20A	TGGGTGATGCTATTCTATTTTC	225 pb	20mM	<b>Programa 1</b> T:58°C								
	PS- Ex20B	CCCTGACAGTCTTAATCAGAT											

**Tabla 23:** Continuación.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 21	PS- Ex21A	AAGATAATGCAGACTTAAGGAGA	145 pb	15mM	<b>Programa 1</b> T: 53°C
	PS- Ex21B	CATTGAGGAAGTTTGTCTT			

## 9. Locus DFNB6 (gen *TMIE*).

### ❖ Secuenciación.

Para la secuenciación de los 4 exones del gen *TMIE* y sus regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores especificados en la [Tabla 24](#).

**Tabla 24:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *TMIE* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 1	<i>TMIE</i> -1A	CCCACCCACCTCAGTGT	497 pb	25mM	<b>Programa 2</b>
	<i>TMIE</i> -1B	CCGGGAGACTGGATCTCTCAG			
Exón 2	<i>TMIE</i> -2A	GGGCTGAGTGTGCTGAGA	374 pb		
	<i>TMIE</i> -2B	GGGGAGTTTGTGTGGATCAG			
Exón 3	<i>TMIE</i> -3A	GGGTCCACAGGGTTTTGTC	390 pb		
	<i>TMIE</i> -3B	GGAGCAGAGGAACAGGGTGAC			
Exón 4	<i>TMIE</i> -4A	GGGCTCTCCCTCAGGACAG	316 pb		
	<i>TMIE</i> -4B	TGGGCTCAGTTCCCTCTC			

## 10. Locus DFNB7/11 (gen *TMCI*).

### 10.1 Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cuatro marcadores de tipo microsatélite próximos al gen *TMCI* (9q21.12) en el siguiente orden: cen-D9S166-D9S1799-(*TMCI*-D9S1876)-D9S175-tel. Los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 25](#).

**Tabla 25:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del locus DFNB7/11.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D9S166	Directa	AAATCATGCAATTCATTTCA	(232-261) pb	15mM	<b>Programa 5</b> T: 58°C	6FAM
	Inversa	TCCTAATTCAGTGGGAAAAC				HEX
D9S1799	Directa	TTGCCAACTATTTTAGCCC	(139-178) pb			
	Inversa	TGCAGTTTCAATCCACATC				6FAM
D9S1876	Directa	GATGTACCCAGAGAAGTCTCG	(132-152) pb			
	Inversa	AGTGGTTACCATTTACCCAAG				HEX
D9S175	Directa	GTAATGTGCTAAATACCAGAGTTG	(200-230) pb			
	Inversa	CCCTTACCTAGAATGCC				

### 10.2 Secuenciación.

Para la secuenciación de los 24 exones del gen *TMCI* y regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores especificados en la [Tabla 26](#).

**Tabla 26:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *TMC1* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR			
1	<i>TMC1</i> -1A	TTTTCTGATTTCACCGAAGACCTA	317 pb	10mM	<b>Programa 2</b> Tf: 63°C			
	<i>TMC1</i> -1B	ATCCTAACTGGGGGAGATTTCTGTA						
2	<i>TMC1</i> -2A	TTTGGGCTCTGCCTCTTGTAAAT	261 pb	15mM				
	<i>TMC1</i> -2B	CATGGTGAACCCTGCCTCTACT						
3	<i>TMC1</i> -3A	TCCAAGTCCCCTCCAAATGAAT	402 pb					
	<i>TMC1</i> -3B	TCACAGCCCTGTCTGCAATAT						
4	<i>TMC1</i> -4A	GCATTCTTGGCTATTCTTGTCTG	362 pb					
	<i>TMC1</i> -4B	TAGGCACCAAAACGTGCTAAT						
5	<i>TMC1</i> -5A	GCAGGGAGAAGTGTGTGGATGT	241 pb					
	<i>TMC1</i> -5B	CCCCAAAAGAGGGAACAAAAA						
6	<i>TMC1</i> -6A	AATCGTGCTCATTTTGGCAAGT	419 pb			20mM		
	<i>TMC1</i> -6B	TCAGCAAGCAATCAAGGGAACA						
7	<i>TMC1</i> -7A	TCACGATGTGGAGAATTGCTAGACT	353 pb			15mM	<b>Programa 2</b> Tf: 59°C	
	<i>TMC1</i> -7B	AGTGATCTTCTT CAGCATTGGAAC						
8	<i>TMC1</i> -8A	TCATGCTTATGGGTCCTAATGTT	318 pb					
	<i>TMC1</i> -8B	AGAAAATCAATATCAGGGAAAGTGT						
9	<i>TMC1</i> -9A	TCACCTCCTTTTATCCCTTATGTT	444 pb					
	<i>TMC1</i> -9B	CCCCTTCACTTCCAGAGAATGA						
10	<i>TMC1</i> -10A	TGGAGAACAGGGAAACAAGTGAA	422 pb					
	<i>TMC1</i> -10B	TGACGAAAGCAGGCATAAACAAA						
11	<i>TMC1</i> -11A	TTGTTGTGTTGCTTTGATCTCTCTT	315 pb				20mM	
	<i>TMC1</i> -11B	TGGGCACCATTTTGAAGGTTAA						
12	<i>TMC1</i> -12A	TGCTGGTGGTCCCCTGAACT	401 pb				15mM	<b>Programa 2</b> Tf: 63°C
	<i>TMC1</i> -12B	GAGGCCGTGGGTTT CAGAATAA						
13	<i>TMC1</i> -13A	TGATCTTTTCTTTGAGTTGCTCTT	437 pb					
	<i>TMC1</i> -13B	AGCATTGGTCTGACCCCATGA						
14	<i>TMC1</i> -14A	TTTTGTTGCTATTTCCCCTATCTCA	278 pb					
	<i>TMC1</i> -14B	CCAGATGGAATGCCTCCAATTT						
15	<i>TMC1</i> -15A	TGTTTGTGTTGTTTTCATGGATACAG	341 pb					
	<i>TMC1</i> -15B	GGGCAGGATAGGGGATAGGTAAA						
16	<i>TMC1</i> -16A	GCCTAGCTCAGAATCTTCCAAAAT	312 pb					
	<i>TMC1</i> -16B	ACAACACTCTTATGGCAAGGACAA						
17	<i>TMC1</i> -17A	CCAGTCTCAAGTTTGCCAGAAAT	377 pb					
	<i>TMC1</i> -17B	GCCAGCACACAGTCAACATTCA						
18	<i>TMC1</i> -18A	CCAACACTAGGACCATTTGAAGACA	274 pb					
	<i>TMC1</i> -18B	CCTCTGTGAGAAACACCCAAGAAT						
19	<i>TMC1</i> -19A	TTGTTGCTGAAGGGAAGTAATTGA	225 pb					
	<i>TMC1</i> -19B	TGGGAGGCTTTTCTGTAAGTGATAA						
20	<i>TMC1</i> -20A	TTGGAAAAGAAGCATGATGTCAAAT	387 pb					
	<i>TMC1</i> -20B	CTCCACCCCGAAAAGAACAC						
21	<i>TMC1</i> -21A	CATGAGGTCAAAGTGT CAGCAAGT	540 pb					
	<i>TMC1</i> -21B	ACAGCCAGGAAGAACATCACAGA						
22-23	<i>TMC1</i> -22A	TCATTTCCCATGCTGATATTT CATAA	486 pb					
	<i>TMC1</i> -23B	TAAAAAGGTGGAAGGT AAGGATTGT						
24	<i>TMC1</i> -24A	ATTGTCCAAATGTGCTCTACTTTCC	608 pb					
	<i>TMC1</i> -24B	TGAACTTAGAGGAAAAAGGGTGAAA						

## 11. Locus DFNB12 (gen *CDH23*).

### 11.1 Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cinco marcadores moleculares de tipo microsatélite próximos al gen *CDH23*, en la región (10q22.1), en el siguiente orden: cen-D10S1759-(D10S1650-*CDH23*-D10S1694)-D10S218-tel. Los cebadores y condiciones correspondientes se muestran en la [Tabla 27](#).

**Tabla 27:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para los marcadores microsatélites del locus DFNB12.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo		
D10S1759	Directa	TGCACAACCTGGGGAAACT	(150-192) pb	10mM	Programa 5 T: 58°C	HEX		
	Inversa	TGGGCACGCTCACACT				6FAM		
D10S1650	Directa	GAAGCCTGTGGTCTAATGAG	(104-148) pb			20mM	Programa 5 T: 55°C	HEX
	Inversa	TTCTGGCCTCTGCAGC						6FAM
D10S1694	Directa	CCTGTCTGGCCAGGTA	(121-161) pb	10mM	Programa 5 T: 55°C	HEX		
	Inversa	AGTAGGGGTGCTGCTGA				6FAM		
D10S218	Directa	AAGAAGGCCAGCATAAAGTT	(239-248) pb	20mM		Programa 5 T: 55°C	HEX	
	Inversa	ACGTTGTGCCAAGACTCTCT					6FAM	

### 11.2 Secuenciación.

Para la secuenciación de los 69 exones y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes del gen *CDH23* (10q22.1), se utilizaron los cebadores especificados en la [Tabla 28](#).

**Tabla 28:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *CDH23* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	
Exón 2	<i>CDH23</i> -2A	TCCCAGCCCCAGT TCTCTCT	254 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -2B	AGCCCCAACACCCTCCAG				
Exón 3	<i>CDH23</i> -3A	GCTGCCTGCCGACCTACT	440 pb		20mM	Programa 4 T: 64°C
	<i>CDH23</i> -3B	ACTGAGT GCCCTGTCCCTG				
Exón 4	<i>CDH23</i> -4A	TCTGCTCTCTCCCTTGGCTAC	237 pb	15mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -4 B	CGTCTTCCCCAGTGTCT				
Exón 5-6	<i>CDH23</i> -5/6A	CCTCCC GCCCATTTAG	545 pb	20mM	Programa 4 T: 64°C	
	<i>CDH23</i> -5/6B	CCCAACTGCTCTCCCAAC				
Exón 7	<i>CDH23</i> -7A	GAGAATGGGCTTTGAGGGACT	347 pb	10mM	Programa 2 T: 60°C	
	<i>CDH23</i> -7B	CCGTCACTCTCTTCCAGGGT				
Exón 8	<i>CDH23</i> -8A	ATGGGTGTGTGTGCGT	376 pb	25mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -8B	GGAGGAGCCAAGGAGGAG				
Exón 9	<i>CDH23</i> -9A	CTGATGCCTGAGCCCTTG	306 pb	10mM	Programa 4 T: 64°C	
	<i>CDH23</i> -9B	AGAGCCTGAGATGCCTACTGG				
Exón 10	<i>CDH23</i> -10A	TAATGCCAGAGAGGAGCC	348 pb	20mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -10B	GAGAGCACGGAAGCGAAGT				
Exón 11	<i>CDH23</i> -11A	TTGTGGT GAGGATTAGATGGGAT	363 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -11B	GGATGGGTGGTGGTCTG				
Exón 12	<i>CDH23</i> -12A	GCCTCTGCTCCTCCATTTG	299 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -12B	CTACCCTACCCTCGCCTCC				
Exón 13	<i>CDH23</i> -13A	TAGCAGAATCAGCAGCCATCC	463 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -13B	TTTGGGGTGCCTCCTTC				
Exón 14	<i>CDH23</i> -14A	CTGCTTCTGACCCGCTCCTA	363 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -14B	AGCCACAGGACCCAGCAC				
Exón 15	<i>CDH23</i> -15A	CAGGGCAAGT GAAAGGGAAG	450 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	<i>CDH23</i> -15B	CAAGCAAGTACAGGGAGAAGGC				

Tabla 28: Continuación.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR		
Exón 16	CDH23 -16A	AGTCTTCCCCACCTCCC	280 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C		
	CDH23 -16B	CGCCTCATCCCCACAAG					
Exón 17	CDH23 -17A	AGCCATAAAGTCTCTGCCCAAA	329 pb				
	CDH23 -17B	CAGGGACAGCCAAGGAGGT					
Exón 18	CDH23 -18A	TAGCCTGACTCCTTGGTGCC	231 pb				
	CDH23 -18B	CATCCTGGGTGCCGTGA					
Exón 19	CDH23 -19A	AGGGATGTCGCAACAGGC	393 pb				
	CDH23 -19B	CAAAAGTCAAAGGAGGGGACC					
Exón 20	CDH23 -20A	TCTTCCCTCGCTCTCTCTCT	320 pb				
	CDH23 -20B	CCCCTTGCTCATCTCACAAA					
Exón 21	CDH23 -21A	GCATCTGAGCACTTTTCCCC	299 pb				
	CDH23 -21B	AGAGTCCACCAGCCCCATAG					
Exón 22	CDH23 -22A	CCTCTCGGACCCCCTAC	513 pb				
	CDH23 -22B	GGTGCTCTAGGAGTCACTACTGG					
Exón 23	CDH23 -23A	GCCTTCTTCTGTCCGTTTTCT	364 pb			15mM	
	CDH23 -23B	TCCCTCCACATCTCCAGAGC					
Exón 24	CDH23 -24A	AAGTGTGGCTTGGCAGGG	420 pb			10mM	Programa 4 T: 64°C
	CDH23 -24B	AATAGACAGCAGTGGGGACAT					
Exón 25	CDH23 -25A	TGGAGACGCTGCTCTGGA	322 pb				
	CDH23 -25B	TACCTGCCCCACCTAGT					
Exón 26	CDH23 -26A	CAGCACAGCCTCCCCTCCT	355 pb				
	CDH23 -26B	GCCCTTCTCCTACTGGCATCT					
Exón 27	CDH23 -27A	GGCTAGGGCAGATGGGGC	416 pb				
	CDH23 -27B	CACAGCACCTTCCAGAGCAGC					
Exón 28	CDH23 -28A	GATGCGTGAAGGGAAGGAAA	217 pb	Programa 4 T: 63°C			
	CDH23 -28B	TTTGGCAGCCTAGAGAAGCTCT					
Exón 29	CDH23 -29A	AGAAGACCCGAGCCTCC	429 pb	Programa 4 T: 64°C			
	CDH23 -29B	GCACCTGTCAACGAACCC					
Exón 30	CDH23 -30A	CCCAGGAAAGCAGTGACCA	385 pb	Programa 4 T: 63°C			
	CDH23 -30B	CATCCCAGCAGCCCCTC					
Exón 31	CDH23 -31A	GGGGTATGGGTGTGGCAG	673 pb				
	CDH23 -31B	CAGCCTCCAACTCCTGAGC					
Exón 32-33	CDH23 -32/33A	TGGAAAAGTGGCAGAATGA	589 pb		15mM		
	CDH23 -32/33B	TGGGAGAGGTGGGAAGGT C					
Exón 34	CDH23 -34A	TCTGAGGGT T T GCTGATGTTCC	378 pb		20mM		
	CDH23 -34B	TGCTTGGT GATGGGGT G					
Exón 35	CDH23 -35A	TCCCCCTTGGCTTGACCT	291pb		15mM		
	CDH23 -35B	GCTGATGGACAGGCTCTCTCC					
Exón 36	CDH23 -36A	CCAAATGCTCCCCTGAC	361 pb		10mM		
	CDH23 -36B	AGCCACAGTCCCCTCCAT					
Exón 37	CDH23 -37A	GCTCACAGAATGTTGCTGCTA	474 pb		15mM		
	CDH23 -37B	ATCTTGTCCCCTCACTCGGA					
Exón 38	CDH23 -38A	AGCCAGGAGAACAGCCA	426 pb		10mM		
	CDH23 -38B	TGAGTGCCCCACAGTTTC					
Exón 39	CDH23 -39A	CTAGGGGTGGCAGTGGTT	370 pb		15mM		
	CDH23 -39B	GGGGTCTTGGATTTAGGCATT					
Exón 40	CDH23 -40A	TTATCAGGTCATTTACAGAGG	480 pb		10mM		
	CDH23 -40B	CAGATTATAGGGTGTCTCGCC					
Exón 41	CDH23 -41A	TGTGACGAGTGGGCTTGC	400 pb				
	CDH23 -41B	CTGGATGTGGCGAGAGGT C					
Exón 42	CDH23 -42A	CCCTTGGCGAACCTCCTC	384 pb				
	CDH23 -42B	CAGATGGTGGCAGCAGAAAA					
Exón 43	CDH23 -43A	AGACCCTGCCGACCCAC	371 pb				
	CDH23 -43B	TGCTCACTCCAAAGCCTGTG					
Exón 44	CDH23 -44A	CCAAATCCCCAACCTCCCA	324 pb	15mM			
	CDH23 -44B	ATCCTTCCCCTCCCAC					

Tabla 28: Continuación.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	
Exón 45	CDH23 -45A	TCCCTCCCCTCTCATCCATC	310 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	CDH23 -45B	GCCCTCAATCCAGCAGTCTG				
Exón 46	CDH23 -46A	TCTTGCCCTGTCTTCCCACC	385 pb	15mM		
	CDH23 -46B	TGCCCATCTTCTCCCCACT				
Exón 47	CDH23 -47A	AAAGAAAATGCTGTCAAGGCTG	674 pb	20mM		Programa 4 T: 62°C
	CDH23 -47B	GAAAGGAGAAAAGAAGGGGGAA				
Exón 48	CDH23 -48A	GGGGACCGTCATCCTTTG	428 pb	15mM		
	CDH23 -48B	GCTCTATGTAGCCATCACCACC				
Exón 49	CDH23 -49A	TGGAACAGCAAGTGAGCACA	563 pb	20mM		
	CDH23 -49B	GGCATCTGGAATCTGGCAT				
Exón 50	CDH23 -50A	CTGCCTGACCACCCTCCT	450 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	CDH23 -50B	CAGCCCTAGAACTCACTGATGC				
Exón 51	CDH23 -51A	TTCTTGGGGTCTTTGGG	379 pb	20mM		
	CDH23 -51B	TTTGGTGGCTGCTCAGTCTC				
Exón 52	CDH23 -52A	CTCCAGAGCCATAACAGCA	386 pb	15mM		
	CDH23 -52B	AGCCATTGTAACCCATCCAGT				
Exón 53-54	CDH23 -53/54A	TGCCTGTCCTTCTCTATCCA	726 pb	20mM		
	CDH23 -53/54B	AGCCAAGTTTCCCCACCTTTA				
Exón 55-56	CDH23 -55/56A	GGGAGGAGAGAAGAGGGACA	891 pb	10mM	Programa 4 T: 64°C	
	CDH23 -55/56B	TGGTGTGCCTTTTTTTTTTTCA			Programa 4 T: 62°C	
Exón 57-58	CDH23 -57/58A	CACCTACAAAAGTCACTGCCCA	699 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	CDH23 -57/58B	TCAACTCTGAGCCACCTTG				
Exón 59	CDH23 -59A	ACGCTTACCAAGGCTGAG	341 pb	10mM		
	CDH23 -59B	CCCCCAGATGACAGTCCAT				
Exón 60	CDH23 -60A	GATGTGCCACCTACCCC	393 pb	10mM		
	CDH23 -60B	CTTCTCCCTCCACTGCCC				
Exón 61	CDH23 -61A	TGGTCTCAGCAAACATTC A	317 pb	10mM		
	CDH23 -61B	GTGTCCCCTCCCCTACTCC				
Exón 62-63-64	CDH23 -62-64A	AACTTTGGAGGCTTGAGGCA	666 pb	10mM	Programa 4 T: 63°C	
	CDH23 -62-64B	GGT GAGGGAGGATGGGGT				
Exón 65	CDH23 -65A	GCTGGGACCTGGAGTG	366 pb	10mM		
	CDH23 -65B	GAGGGTGAAGGGAGGGTG				
Exón 66-67	CDH23 -66/67A	GGGAAATGGCAGGATGT	572 pb	10mM		
	CDH23 -66/67B	CTGTGTCTCTGGAGTGGGG				
Exón 68	CDH23 -68A	T AAGGGCAGGGCTCAGGAGT	372 pb	10mM		
	CDH23 -68B	CAGCAGGACAGCAAGAGACAGA				
Exón 69	CDH23 -69Aa	GCCTGCTGCGGTAGGAGC	810 pb	10mM		
	CDH23 -69Ab	GTGCTTGCGGGGTGG				
	CDH23 -69Ba	GT AAGGAGGGTCACTGGGG	567 pb	10mM		
	CDH23 -69Bb	CTGAAGGTGCGCTCTGCT				

## 12. Locus DFN21 (gen *TECTA*).

### ❖ Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cuatro marcadores de tipo microsatélite próximos al gen *TECTA* (11q22-24) en el siguiente orden: cen-D11S925-(*TECTA*-D11S4089)-D11S4107-D11S4167-tel. Los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 29](#).

**Tabla 29:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del *locus* DFNB21.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D11S925	Directa	AGAACCAAGGTCGTAAGTCCTG	(172-199) pb	15mM	Programa 1 T: 56°C	HEX
	Inversa	TTAGACCATTATGGGGGCAA				
D11S4089	Directa	ATTCCTAGTTCCCTCATAAACTG	(199-213) pb			6FAM
	Inversa	TAATCAAAGGCTGTAGTGAATTGG				
D11S4107	Directa	TCATTCTACAAGACTAGCATTACC	(172-212) pb			HEX
	Inversa	GCTTGATCATGGTGTATTATCTT				
D11S4167	Directa	TCCCCACCTGCCTGAG	(97-112) pb			6FAM
	Inversa	TGTTGACCAAAATGTTGTTATGC				

### 13. *Locus* DFNB23 (gen *PCDH15*).

#### ❖ Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cuatro marcadores moleculares de tipo microsatélite próximos al gen *PCDH15*, en la región (10q21.1), en el siguiente orden: cen-D10S567-D10S107-*PCDH15*-D10S1124-D10S1226-tel. Los cebadores y condiciones de PCR correspondientes se muestran en la [Tabla 30](#).

**Tabla 30:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para los marcadores microsatélites del *locus* DFNB23.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D10S567	Directa	AAAATTACAATACATCTTTNATCCC	(192-208) pb	20mM	Programa 5 T: 58°C	6FAM
	Inversa	ATATAAATCAGTCTTTTCCAGGACA				
D10S107	Directa	GAATCCATAGCTGTACTCCA	(155-167) pb	15mM		6FAM
	Inversa	AATTGTCTATGGTCCAGCA				
D10S1124	Directa	CCATGGAGCATGTCTTATTT	(197-235) pb	20mM		HEX
	Inversa	CCACAGATTGTGAAAGATGAC				
D10S1226	Directa	AGCCACCAGAGGAAGTAAGG	(125-149) pb	20mM		HEX
	Inversa	AGTGCTGCCAAAAGAAATTG				

### 14. *Locus* DFNB28 (gen *TRIOBP*).

#### ❖ Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cuatro marcadores de tipo microsatélite próximos al gen *TRIOBP* (22q13.1) en el siguiente orden: cen-D22S466-D22S1045-*TRIOBP*-D22S1156-D22S272-tel. Los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 31](#).

**Tabla 31:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del *locus* DFNB28.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D22S426	Directa	TGAAACCAACAACACCTAA	(215-225) pb	15mM	Programa 5 T: 56°C	6FAM
	Inversa	CCCATCTAGGACCCCA				
D22S1045	Directa	GCTAGATTTTCCCGATGAT	(140-158) pb			HEX
	Inversa	ATGTAAAGTGCTCTCAAGAGTGC				
D22S1156	Directa	TGAGGTAGTCACACGAGGCA	(130-162) pb			6FAM
	Inversa	AATCACTGGGCTCCGAGG				
D22S272	Directa	GAGTTTTGTTGCTGGCAC	(132-150) pb			HEX
	Inversa	AATGCACGACCCACCTAAAG				

### 15. *Locus* DFNB29 (gen *CLDN14*).

#### ❖ Secuenciación.

Para la secuenciación de los 3 exones del gen *CLDN14* y sus regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores especificados en la [Tabla 32](#).

**Tabla 32:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *CLDN14* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 1	<i>CLDN-1Aa</i>	AAAGGCTGAGAAGCTGAGTTAC	499 pb	15mM	<b>Programa 4</b> T: 58°C
	<i>CLDN-1Ab</i>	GGACGGAGTATTTGAGAGAAAA			
	<i>CLDN-1Ba</i>	AGCCACCTCCTCTCATGCTA	334 pb	20mM	<b>Programa 4</b>
	<i>CLDN-1Bb</i>	AGGGCTTCCAAAACAGATGA			
Exón 2	<i>CLDN-2A</i>	AGGCTTAGGGGAAGCTCTGA	321 pb	10mM	
	<i>CLDN-2B</i>	GACGCTCTTGCACTGTTCTG			
Exón 3	<i>CLDN-3Aa</i>	AAAAACTTGGTTTCGGTGACA	598 pb	15mM	<b>Programa 4</b> T: 60°C-45''
	<i>CLDN-3Ab</i>	GTTGGTGGTCCAGGAGACG			
	<i>CLDN-3Ba</i>	GGCACCTCTTCATCCTG	499 pb		<b>Programa 4</b> T: 59°C
	<i>CLDN-3Bb</i>	GACATTTCTCGCATTCACA			
	<i>CLDN-3Ca</i>	AGGGGTTCCAGCACAAAGTT	362 pb		<b>Programa 4</b> T: 60°C
	<i>CLDN-3Cb</i>	AGTGGGCTCTGACTGTGGTT			

## 16. Locus DFNB37 (gen *MYO6*).

### ❖ Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cinco marcadores moleculares de tipo microsatélite próximos al gen *MYO6*, en la región 6q13, en el siguiente orden: cen-D6S1596-D6S1622-*MYO6*-D6S1659-D6S1031-D6S1589. Los cebadores y condiciones de PCR correspondientes se muestran en la [Tabla 33](#).

**Tabla 33:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del locus DFNB37.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D6S1596	Directa	GACCTCCCCAGTCACA	(175-225) pb	15mM	<b>Programa 1</b> T: 58°C	HEX
	Inversa	CCATCACCTTACAGTTACCA				
D6S1622	Directa	GTGTATCTTAGAATGATGGCATCTT	(192-212) pb			
	Inversa	TTATGTGACAAAGCACCAACTAT				6FAM
D6S1659	Directa	AGCTGAGATGGTGCCACTG	(163-203) pb			
	Inversa	CCAATGGTAGGCCAATCC				HEX
D6S1031	Directa	CCTGATGGTCATGTGTCTGA	(251-266) pb			
	Inversa	CGCTCATTTTATCTACCTAACC		HEX		
D6S1589	Directa	CCCTCCACATACAGTGAAAG	(170-188) pb			
	Inversa	ATGCTTGCTTCAGCCAAT		6FAM		

## 17. Locus DFNB59 (gen *PJKV*).

### 17.1 Análisis de haplotipos.

Se estudiaron cuatro marcadores de tipo microsatélite próximos al gen *PJKV* (2q31.2) en el siguiente orden: cen-D2S148-*PJKV*-D2S324-D2S2310-D2S2173-tel. Los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 34](#).



**Tabla 34:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del *locus* DFNB59.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D2S148	Directa	CTTATGCTAAAGTGTAAGGGTATCT	(180-200) pb	15mM	<b>Programa 5</b> T: 58°C	6FAM
	Inversa	ATGAAGGAATACTGGCTTGT				
D2S324	Directa	TTACCCACCGGGACAGT	(264-275) pb		<b>Programa 5</b> T: 60°C	HEX
	Inversa	CAGCAAATGCTTCTAGGTCA				
D2S2310	Directa	CGACTTGAGTAGACGCACTATTC	(244-260) pb		<b>Programa 5</b> T: 58°C	6FAM
	Inversa	GCATCTAAACTGTGAAATGAGC				
D2S2173	Directa	GGAGACAGAGAGTTTACATTTGAG	(201-243) pb		<b>Programa 5</b> T: 60°C	HEX
	Inversa	GCCACACTTCTCTGAATC				

### 17.2 Secuenciación.

Para la secuenciación de los 7 exones del gen *PJVK* y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores especificados en la [Tabla 35](#).

**Tabla 35:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *PJVK* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 1	<i>PJVK</i> -1A	CTAGGCCGCGAGTTCTTTGTCCTTAG	457 pb	15mM	Programa 4
	<i>PJVK</i> -1B	TGTAATGGCGTTTGCCTGGGA			
Exón 2	<i>PJVK</i> -2A	GCAGAGGCAGGGAATTATACAGT	551 pb	20mM	
	<i>PJVK</i> -2B	ACAAACTTTTGGCATTGTTAATCTT			
Exón 3	<i>PJVK</i> -3A	TGGTGAGTCATGTTGCCTTTCT	418 pb	15mM	
	<i>PJVK</i> -3B	CAACCTCAATGTTTTAAGCATTCTT			
Exón 4	<i>PJVK</i> -4A	CTGACTATTAGGATTGCCTTGATTT	390 pb	15mM	
	<i>PJVK</i> -4B	CAGCTCTTTCATCAGAACATTCA			
Exón 5	<i>PJVK</i> -5A	TTGTTTTGGTAGGATTATAGGAAA	286 pb	25mM	
	<i>PJVK</i> -5B	GAGAGCACATGCCCTAATGAAT			
Exón 6	<i>PJVK</i> -6A	TCATCACCCCATCAAACAATAA	242 pb	15mM	
	<i>PJVK</i> -6B	GAATAGAAAACCTCATGTGTTAAGC			
Exón 7	<i>PJVK</i> -7A	GCTGTTGCATTATGTATTTTTCA	410 pb	20mM	
	<i>PJVK</i> -7B	TGTGGCACAACCTGCACCTAA			

### 18. *Locus* DFNB67 (gen *TMHS*).

#### ❖ Secuenciación.

Para la secuenciación de los 4 exones del gen *TMHS* y sus regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores especificados en la [Tabla 36](#).

**Tabla 36:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *TMHS* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 1	MHbis-A	GCTGGGGAGTGACCTGCTTCTA	690 pb	25mM	<b>Programa 6</b> T: 63°C
	MHbis-B	GTCTTTTCTGCCTCTGCCATTTT			
Exón 2	MH2-A	AAGGAGAAGGGAGGTGACAACA	419 pb	25mM	Programa 4
	MH2-B	AGAGGACTGGCTAAGATGAACC			
Exón 3	MH3-A	GGGAGACAATCATGCGATACAG	349 pb	15mM	
	MH3-B	CAGTGGGGTGTGGTCCTCT			
Exón 4	MH4-A	GGATTACAGGCGTGAACCACTG	189 pb	25mM	
	MH4-B	CCAGGAACAAGGAAACTTGAA			

## 19. Locus DFNB73 (gen *BSND*).

### ❖ Secuenciación.

Para la secuenciación de los 4 exones del gen *BSND* y regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron los cebadores que se muestran en la [Tabla 37](#).

**Tabla 37:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *BSND* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR
Exón 1	<i>BSND</i> -1A	GCTGGGTGTGGGTCCGTTGAA	540 pb	15mM	<b>Programa 6</b> Tr: 63°C
	<i>BSND</i> -1B	AGAGCAGAGAGAAGACCGAGTCAA			
Exón 2	<i>BSND</i> -2A	GCCCCCTACCTGGTCAA	227 pb	20mM	
	<i>BSND</i> -2B	CCTCCCTCTCACTCTCCTCAGTCA			
Exón 3	<i>BSND</i> -3A	GCCGGGGAGAACACTGGTGT	472 pb	15mM	
	<i>BSND</i> -3B	TGTCCCACACCCTCCACTGC			
Exón 4	<i>BSND</i> -4A	GGCCGGGAAGGTGGATTA	689 pb		
	<i>BSND</i> -4B	AGTCATCATCCCCTCCCTGTGTATT			

## 20. Locus DFNB91 (gen *SERPINB6*).

### 20.1 Análisis de haplotipos.

Se estudiaron tres marcadores de tipo microsatélite próximos al gen *SERPINB6* ubicados en la región cromosómica 6p25, en el siguiente orden: cen-D6S344-*SERPINB6*-D6S1617-D6S1668-tel. Los cebadores y condiciones de PCR correspondientes se muestran en la [Tabla 38](#).

**Tabla 38:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los marcadores microsatélites del locus DFNB91.

Microsatélite	Cadena	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	Fluoróforo
D6S344	Directa	CTCCAGCCTGGGTCACTA	(139-159) pb	15mM	<b>Programa 4</b> T: 56°C	6FAM
	Inversa	CTAATGCATGACAATAATTTTCCA				6FAM
D9S1617	Directa	TGCAAAACAGGCACACATAC	(101-123) pb			HEX
	Inversa	TTAATCAATTTTCTGCAAAGATAAA	(136-154) pb			
D9S1668	Directa	GTATAGCCAAGTCTTCCAA				
	Inversa	GGTNCCATTTATTGAGATT				

### 20.2 Secuenciación.

Para la secuenciación de los 7 exones del gen *SERPINB6* y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes se diseñaron los cebadores especificados en la [Tabla 39](#).

**Tabla 39:** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para amplificar los exones del gen *SERPIN6* y sus regiones intrónicas flanqueantes.

Localización	Cebador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño	[MgCl <sub>2</sub> ]	Condiciones de PCR	
Exón 1	<i>SERPIN6</i> -1Aa	GCTGTTTCATCAGCAAAGTCT	300 pb	10mM	<b>Programa 4</b> T: 58°C	
	<i>SERPIN6</i> -1Ab	TCCCGGGTCTCGAGCTAC				
	<i>SERPIN6</i> -1Ba	GGCCCTGACTGTGGTCAAA	483 pb			
	<i>SERPIN6</i> -1Bb	GAGGCTCCGGAAGGGAAC				
Exón 2	<i>SERPIN6</i> -2A	ATCGGCGGTGACTGTCGGTAA	376 pb	15mM	<b>Programa 4</b> T: 63°C	
	<i>SERPIN6</i> -2B	CCACACCCTGCAATACTGCACA				
Exón 3	<i>SERPIN6</i> -3B	CGCCAGCCTCGGATAGAT	499 pb			
	<i>SERPIN6</i> -3B	AGCTGCCTGACAAGATGCTGACA				
Exón 4	<i>SERPIN6</i> -4A	AGTAGGCCGTTGGTGTTCATCATT	392 pb	20mM		
	<i>SERPIN6</i> -4B	GGAAACAGGGAGAAATCAGAGAGAA				
Exón 5	<i>SERPIN6</i> -5A	CCCAGCCGATTCTGATGTGT	347 pb	15mM		
	<i>SERPIN6</i> -5B	AGGCCACCCAATGGATGTCAA				
Exón 6	<i>SERPIN6</i> -6A	GGCCAGCTCCGACACATTTGT	326 pb			
	<i>SERPIN6</i> -6B	TTAAACGGCTGACCGCAAAGT				
Exón 7	<i>SERPIN6</i> -7Aa	GCACCCTGGGTCTTAAAGTCT	399 pb		15mM	<b>Programa 4</b> T: 60°C
	<i>SERPIN6</i> -7Ab	CTTGCTGTGCTGGATGAAGA				
	<i>SERPIN6</i> -7Ba	GTGGAGGTCAATGAGGAAGG	485 pb			
	<i>SERPIN6</i> -7Bb	TGTCTGCCACAATGAAGTC				

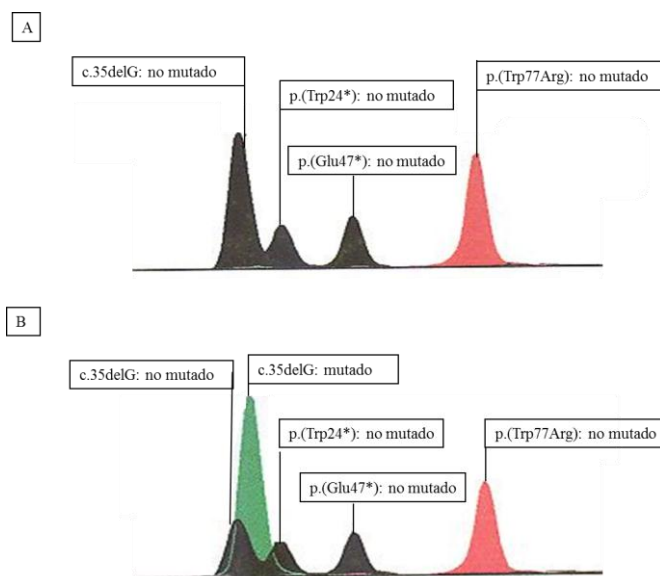
## RESULTADOS

## 1 Hipoacusia de tipo DFNB1.

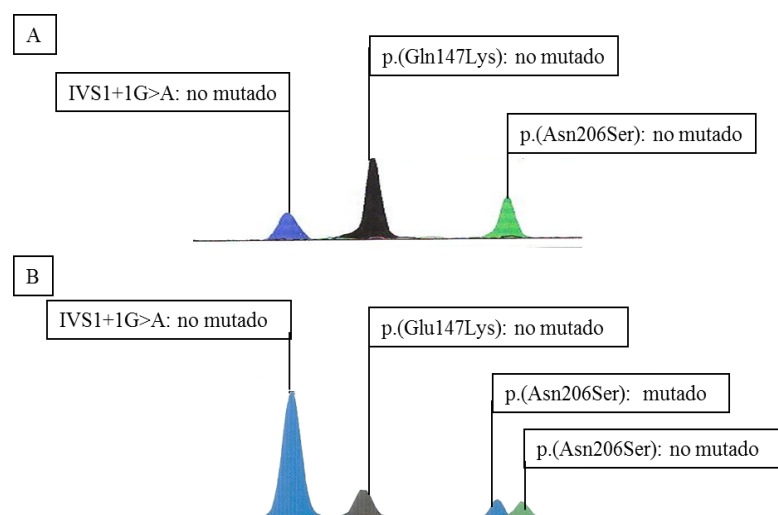
Los estudios genéticos realizados en esta tesis se iniciaron con el cribado de los genes *GJB2* y *GJB6* en 117 probandos argentinos (69 de casos familiares y 48 de casos esporádicos) no relacionados entre sí, con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva.

### 1.1 Cribado por minisequenciación en *GJB2*.

Dado que se esperaba cierta coincidencia en los espectros mutacionales de las poblaciones española y argentina, comenzamos el estudio aplicando dos ensayos de minisequenciación diseñados para detectar las siete mutaciones en *GJB2* que son más frecuentes en España. Se comenzó analizando 78 casos (43 familiares y 35 esporádicos). El **ensayo 1** incluyó las mutaciones: c.35delG, p.(Trp24\*), p.(Glu47\*), p.(Trp77Arg); y el **ensayo 2**: p.(Asn206Ser), p.(Glu147Lys) e IVS1+1G>A. Se identificaron 14 casos con mutaciones patogénicas: 4 casos (3 familiares y 1 esporádico) con 2 alelos mutados y 10 casos (6 familiares y 4 esporádicos) con 1 alelo mutado. En las Figuras 25 y 26 se observa un ejemplo de los resultados obtenidos en los **ensayos 1 y 2** de minisequenciación, respectivamente.



**Figura 25:** (A) Individuo no mutado para las cuatro mutaciones del ensayo 1 de minisequenciación. (B) Individuo con un alelo mutado c.35delG. Referencia de los picos: negro (citosina), rojo (timina) y verde (adenina).



**Figura 26:** (A) Individuo no mutado para las tres mutaciones del ensayo 2 de minisequenciación. (B) Individuo con un alelo mutado p.(Asn206Ser). Referencia de los picos: azul (guanina), negro (citosina) y verde (adenina).

Se encontraron sólo dos (c.35delG y p.(Asn206Ser)) de las 7 mutaciones patogénicas incluidas en los dos ensayos. Ante este resultado y, teniendo en cuenta además el elevado número de casos en los que encontramos una sola mutación, decidimos reinvestigar estos 78 casos e investigar los 39 casos restantes mediante secuenciación.

## 1.2 Secuenciación de la región promotora, Exón 1 y Exón 2 del gen *GJB2*.

De los 117 casos argentinos, se confirmaron por secuencia los 4 casos con dos alelos mutados hallados en los ensayos de minisequenciación. Asimismo, se elucidaron 16 casos adicionales con dos alelos mutados y 12 casos con un solo cambio patogénico (Tabla 42). En dicha Tabla, se detalla la procedencia de abuelos maternos y paternos de los casos índices. Obsérvese que en su gran mayoría son de origen europeo, principalmente de España e Italia.

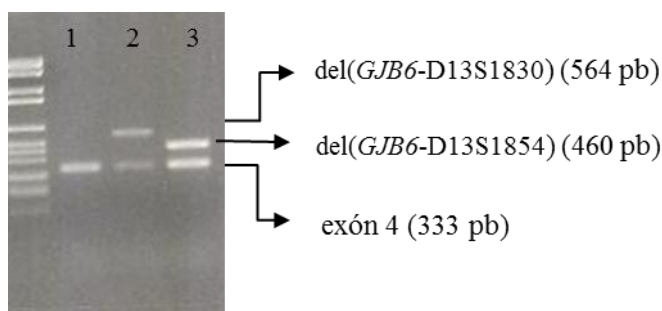
Tabla 42: Genotipos de los casos índice en los que se encontraron mutaciones patogénicas en el locus DENB1.

N° de caso	Código del Caso índice	cDNA		Proteína		Método de detección	Procedencia geográfica de abuelos maternos y paternos
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2		
1	ARS 3-1	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	EM1 + Sec	Francia/Italia
2	ARS 6-1	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	EM1 + Sec	España/Escandinavia/Italia/Polonia
3	ARS 7-1	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	EM1 + Sec	Italia
4	ARS 19-1	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	EM1 + Sec	España/Italia
5	ARS 41-10	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	Sec	Argentina/España
6	ARS 82-1	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	Sec	España/Italia
7	ARS 95-1	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	Sec	Argentina
8	ARS 120-1	c.35delG	c.35delG	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Gly 12Valfs*2)	Sec	Italia
9	ARS 10-2	c.35delG	c.109G>A	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Val37Ile)	Sec	España/Italia
10	ARS 42-1	c.35delG	c.167delT	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Leu56AArgfs*26)	EM1 + Sec	Polonia (Asquenazí)
11	ARS 46-1	c.35delG	c.167delT	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Leu56AArgfs*26)	EM1 + Sec	España
12	ARS 109-1	c.35delG	c.167delT	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Leu56AArgfs*26)	Sec	España/Italia
13	ARS 55-1	c.35delG	c.313_326del	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Lys105Glyfs*5)	EM1 + Sec	Alemania/España/Lituania/Siria
14	ARS 67-1	c.35delG	c.427C>T	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Arg143T rp)	EM1 + Sec	Argentina
15	ARS 54-1	c.35delG	c.645delT	p.(Gly 12Valfs*2)	p.(Arg216Aspfs*18)	EM1 + Sec	España
16	ARS 70-1	c.59T>C	c.109G>A	p.(Ile20Thr)	p.(Val37Ile)	Sec	España
17	ARS 40-1	c.109G>A	c.427C>T	p.(Val37Ile)	p.(Arg143T rp)	Sec	España
18	ARS 76-1	c.109G>A	c.617A>G	p.(Val37Ile)	p.(Asn206Ser)	EM2 + Sec	Italia
19	ARS 20-1	c.167delT	c.427C>T	p.(Leu56AArgfs*26)	p.(Arg143T rp)	Sec	España
20	ARS 45-1	c.427C>T	c.551G>C	p.(Arg143T rp)	p.(Arg184Pro)	Sec	España/Italia
21	ARS 1-1	c.35delG	del(GJB6-D13S1830)	p.(Gly 12Valfs*2)	del(GJB6-D13S1830)	EM1 + Sec + Del	Italia
22	ARS 34-1	c.35delG	del(GJB6-D13S1830)	p.(Gly 12Valfs*2)	del(GJB6-D13S1830)	EM1 + Sec + Del	España/Italia
23	ARS 112-1	c.35delG	del(GJB6-D13S1830)	p.(Gly 12Valfs*2)	del(GJB6-D13S1830)	Sec + Del	Argentina
24	ARS 17-1	c.617A>G	del(GJB6-D13S1830)	p.(Asn206Ser)	del(GJB6-D13S1830)	EM2 + Sec + Del	España
25	ARS 59-1	c.35delG	?	p.(Gly 12Valfs*2)	?	EM1 + Sec	España
26	ARS 16-1	c.101T>C	?	p.(Met34Thr)	?	Sec	Argentina/España
27	ARS 58-1	c.101T>C	?	p.(Met34Thr)	?	Sec	España
28	ARS 61-1	c.101T>C	?	p.(Met34Thr)	?	Sec	Argentina/Italia
29	ARS 102-1	c.101T>C	?	p.(Met34Thr)	?	Sec	?
30	ARS 94-1	c.269T>C	?	p.(Leu90Pro)	?	Sec	Argentina
31	ARS 66-1	c.427C>T	?	p.(Arg143T rp)	?	Sec	?
32	ARS 49-1	c.476A>T	?	p.(Asp159Val)	?	Sec	Italia/Rusia

Número de acceso para el gen *GJB2* a nivel de c.DNA: NM\_004004.5. Del: ensayo para las deleciones de(GJB6-D13S1830) y del(GJB6-D13S1854). EM1 y EM2: ensayo 1 y 2 de minisequenciación, respectivamente. Sec: secuenciación de la región codificante.

### 1.3 Cribado mediante ensayo de detección de dos deleciones en *GJB6*.

Se utilizó el ensayo de PCR múltiple para la detección de las deleciones en el gen *GJB6* (del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854)) (Figura 27). Se realizó en los 97 casos argentinos que quedaban sin elucidar, de los cuales, 12 eran portadores heterocigotos de un solo alelo mutado inequívocamente patogénico en el gen *GJB2*. Mediante este ensayo se encontraron 4 casos heterocigotos para la mutación del(*GJB6*-D13S1830), lo que permitió elucidar cuatro de los casos con un solo alelo *GJB2* mutado (3 individuos heterocigotos para la mutación c.35delG y 1 caso heterocigoto para la mutación p.(Asn206Ser)) (Tabla 42).



**Figura 27:** Ensayo de PCR múltiple para la detección combinada de las mutaciones del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854). (1) Individuo no portador. (2) Individuo heterocigoto para del(*GJB6*-D13S1854). (3) Individuo heterocigoto para del(*GJB6*-D13S1830). Los tamaños de los productos de PCR correspondientes a los empalmes de los puntos de rotura de las deleciones y al exón 4 del gen *GJB6* están indicados en el margen derecho.

En resumen, se encontraron mutaciones patogénicas en un total de 32 casos. De ellos, en 24 casos se encontraron los dos alelos mutados (17 familiares y 7 esporádicos) y en 8 casos (6 familiares y 2 esporádicos) solamente se encontró un único alelo mutado, en el *locus* DFNB1 (Tabla 43).

**Tabla 43:** Casos DFNB1 elucidados y sin elucidar en la cohorte estudiada.

<i>Locus</i> DFNB1	Casos			
	Familiares	%	Esporádicos	%
DFNB1-2 alelos mutados	17	24,64	7	14,58
DFNB1-1 alelo mutado	6	8,69	2	4,17
No DFNB1	46	66,67	39	81,25
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>100</b>

Las mutaciones patogénicas encontradas en los casos con dos alelos mutados se relacionan en la Tabla 44. Se observó que los seis alelos mutados más frecuentes en la población argentina eran: c.35delG, p.(Arg143Trp), p.(Val37Ile), c.167delT, del(*GJB6*-D13S1830) y p.(Asn206Ser) que representaban el 92% del total (Tabla 44).



**Tabla 44:** Mutaciones patogénicas encontradas en nuestra serie de pacientes. Se resaltan en verde las 6 mutaciones más frecuentes encontradas en este trabajo.

Mutaciones			N° de alelos	(% )	Referencias
cDNA	Proteína	Dominio			
c.35delG	p.(Gly12Valfs*2)		26	54,17	Zelante <i>et al.</i> , 1997
c.427C>T	p.(Arg143Trp)	M3	4	8,33	Broby <i>et al.</i> , 1998
c.109G>A	p.(Val37Ile)	M1	4	8,33	Kelley <i>et al.</i> , 1998
c.167delT	p.(Leu56Argfs*26)		4	8,33	Zelante <i>et al.</i> , 1997
del( <i>GJB6</i> -D13S1830)			4	8,33	del Castillo <i>et al.</i> , 2002
c.617A>G	p.(Asn206Ser)	M4	2	4,17	Kenna <i>et al.</i> , 2001
c.59T>C	p.(Ile20Thr)	N-terminal	1	2,08	Loffler <i>et al.</i> , 2001
c.313_326del	p.(Lys105Glyfs*5)		1	2,08	Denoyelle <i>et al.</i> , 1999
c.551G>C	p.(Arg184Pro)	E2	1	2,08	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
c.645delT	p.(Arg216Aspfs*18)		1	2,08	Prasad <i>et al.</i> , 2000

<b>Total</b>	48	100
--------------	----	-----

**M1:** dominio transmembranar 1; **E2:** dominio extracelular. **N-terminal:** extremo amino terminal.

El estudio molecular reveló también tres variantes no patogénicas (polimorfismos) (Tabla 45).

**Tabla 45:** Polimorfismos identificados en el gen *GJB2*.

Mutaciones no patogénicas		N° de alelos		N° rs (dbSNP)	Referencias
cDNA	Proteína	Familiares	Esporádicos		
c.79G>A	p.(Val27Ile)	11 / 138	16 / 96	2274084	Kelley <i>et al.</i> , 1998
c.478G>A	p.(Gly160Ser)	1 / 138	0 / 96	34988750	Scott <i>et al.</i> , 1998
c.503A>G	p.(Lys168Arg)	1 / 138	0 / 96	200104362	Samanich <i>et al.</i> , 2007

El resumen de los genotipos encontrados se muestra en la Tabla 46. Hay que destacar que el 100% de los genotipos hallados presentó al menos uno de los 6 alelos mutados más frecuentes (sombreados en verde).

**Tabla 46:** Genotipos de los casos con dos alelos mutados en el locus *DFNB1*.

<i>Locus DFNB1</i>		
Genotipos	Nro de casos	%
c.35delG/c.35delG	8	33,33
c.35delG/c.167delT	3	12,50
c.35delG/del( <i>GJB6</i> -D13S1830)	3	12,50
c.35delG/p.(Val37Ile)	1	4,17
c.35delG/c.313_326del	1	4,17
c.35delG/p.(Arg143Trp)	1	4,17
c.35delG/c.645delT	1	4,17
p.(Ile20Trp)/p.(Val37Ile)	1	4,17
p.(Val37Ile)/p.(143Trp)	1	4,17
p.(Val37Ile)/p.(Asn206Ser)	1	4,17
c.167delT/p.(Arg143Trp)	1	4,17
p.(Arg143Trp)/p.(Arg184Pro)	1	4,17
p.(Asn206Ser)/del( <i>GJB6</i> -D13S1830)	1	4,17
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100</b>

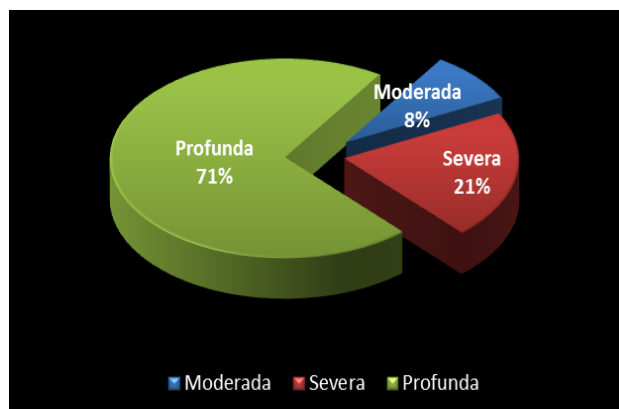
#### 1.4 Correlación genotipo-fenotipo en el locus DFNB1.

Para estudiar la correlación genotipo-fenotipo se reunió información sobre la edad de inicio, el grado y lateralidad de la hipoacusia de los 24 pacientes con dos alelos mutados en el locus DFNB1 (Tabla 47).

**Tabla 47:** Fenotipos de los pacientes con dos alelos DFNB1 mutados.

Nº de caso	Caso índice	Genotipo		Fenotipo			
		Alelo 1	Alelo2	Edad Inicio	Grado Hipoacusia	Lateralidad	Antecedente
1	ARS 3-1	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Esporádico
2	ARS 6-1	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
3	ARS 7-1	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
4	ARS 19-1	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
5	ARS 41-10	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
6	ARS 82-1	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Severa	Bilateral	Familiar
7	ARS 95-1	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
8	ARS 120-1	c.35delG	c.35delG	Prelocutiva	Severa	Bilateral	Familiar
9	ARS 10-2	c.35delG	p.(Val37Ile)	Prelocutiva	Severa	Bilateral	Familiar
10	ARS 42-1	c.35delG	c.167delT	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
11	ARS 46-1	c.35delG	c.167delT	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
12	ARS 109-1	c.35delG	c.167delT	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
13	ARS 55-1	c.35delG	c.313_326del	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
14	ARS 67-1	c.35delG	p.(Arg143Trp)	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Esporádico
15	ARS 54-1	c.35delG	c.645delT	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Esporádico
16	ARS 70-1	p.(Ile20Thr)	p.(Val37Ile)	Prelocutiva	Moderada	Bilateral	Esporádico
17	ARS 40-1	p.(Val37Ile)	p.(Arg143Trp)	Prelocutiva	Severa	Bilateral	Esporádico
18	ARS 76-1	p.(Val37Ile)	p.(Asn206Ser)	Prelocutiva	Moderada	Bilateral	Familiar
19	ARS 20-1	c.167delT	p.(Arg143Trp)	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
20	ARS 45-1	p.(Arg143Trp)	p.(Arg184Pro)	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Esporádico
21	ARS 1-1	c.35delG	del( <i>GJB6</i> -D13S1830)	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
22	ARS 34-1	c.35delG	del( <i>GJB6</i> -D13S1830)	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Esporádico
23	ARS 112-1	c.35delG	del( <i>GJB6</i> -D13S1830)	Prelocutiva	Profunda	Bilateral	Familiar
24	ARS 17-1	p.(Asn206Ser)	del( <i>GJB6</i> -D13S1830)	Prelocutiva	Severa	Bilateral	Familiar

La hipoacusia era bilateral y se manifestó con anterioridad a la adquisición del lenguaje en los 24 casos estudiados (100%). El grado de hipoacusia en las familias estudiadas varía de moderada a profunda (Figura 28), aunque es mayoritaria la forma profunda (17/24 casos, 71%).



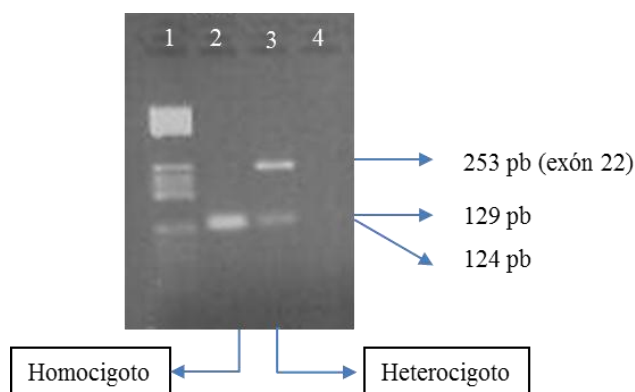
**Figura 28:** Grado de hipoacusia.

## 2 Hipoacusia de tipo DFNB9.

En los 93 casos no DFNB1 (52 familiares y 41 esporádicos) se procedió al estudio del *gen OTOF*. Se comenzó la búsqueda por las mutaciones encontradas en dicho gen en unos pocos casos argentinos de un estudio anterior: p.(Gln829\*), IVS35+1G>T y c.2905-2923delins CTCCGAG-CGCA (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008).

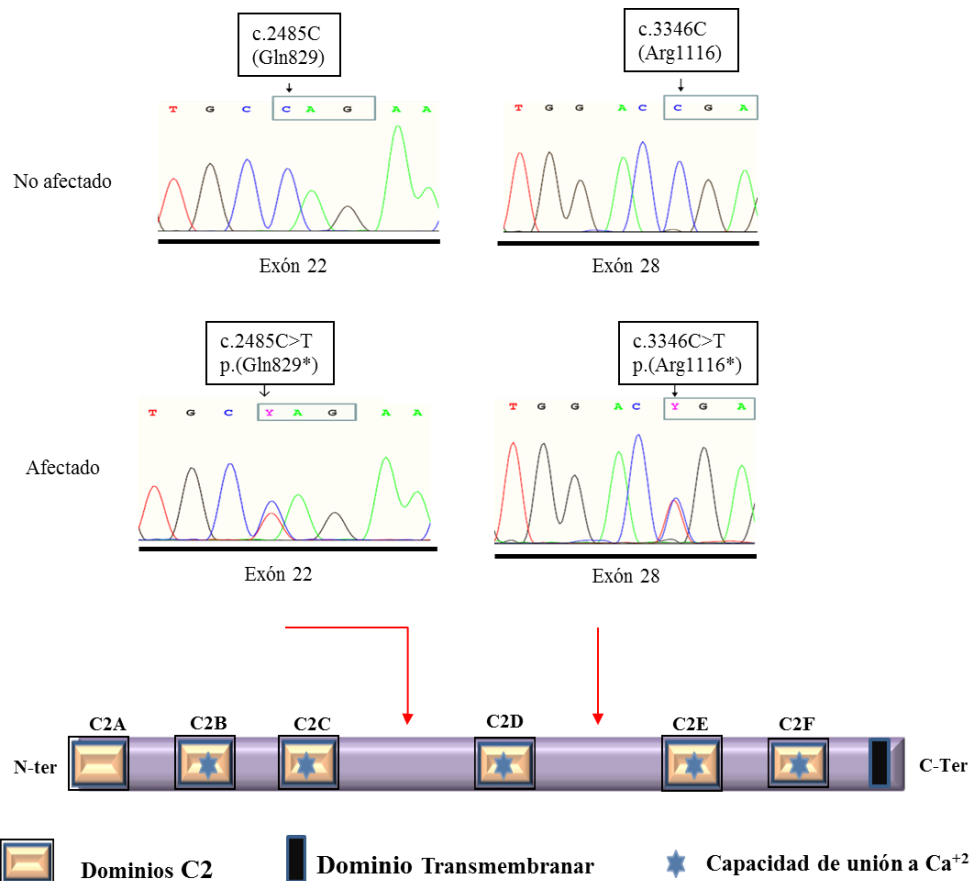
### 2.1 Ensayo *RFLP* para detectar la mutación p.(Gln829\*).

Para la detección de la mutación p.(Gln829\*) se empleó un ensayo de restricción enzimática con la enzima *BfaI* (apartado 5.1 de "Pacientes y Métodos" y Figura 29). Se encontró la mutación p.(Gln829\*) en heterocigosis en el probando de un caso familiar (caso ARS 97).



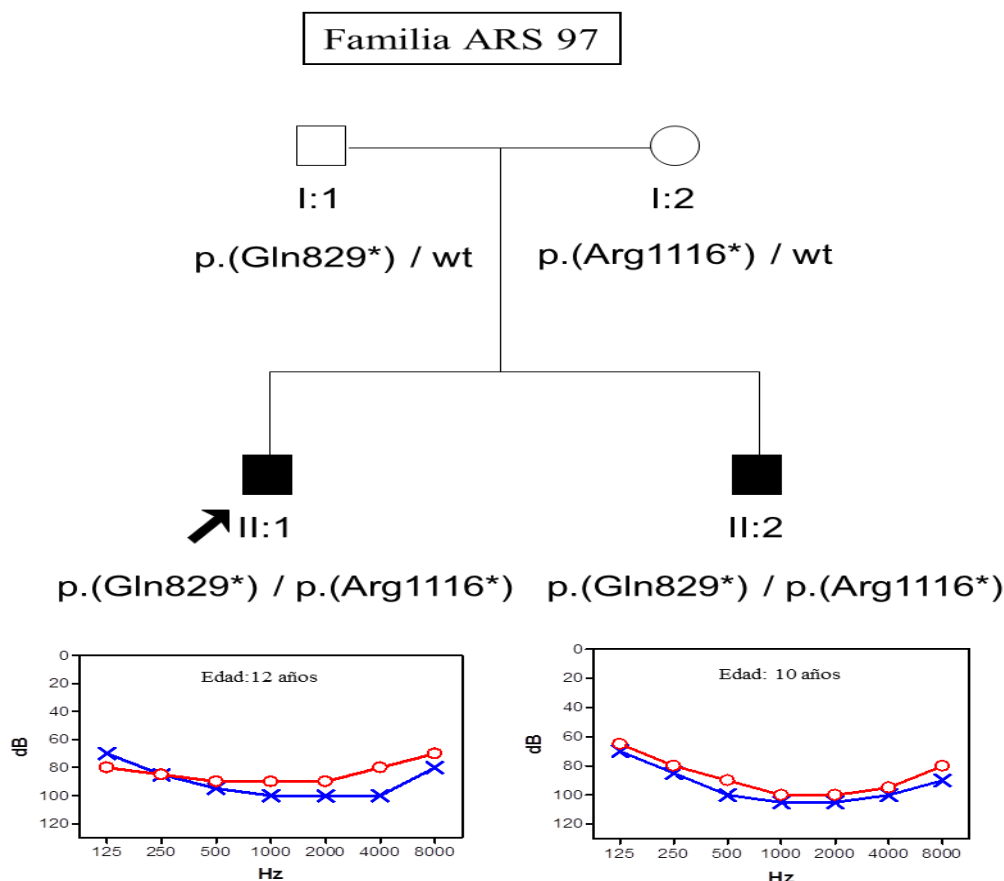
**Figura 29:** Ensayo de restricción con *BfaI* para detectar la mutación p.(Gln829\*). (1) Marcador de peso molecular V de Roche. La longitud de los fragmentos de restricción se indica a la derecha. (2) Individuo afectado: homocigoto para la mutación: (129+124) pb. (3) Individuo heterocigoto para la mutación: (253+129+124) pb. (4) Control sin ADN.

Para confirmar el resultado obtenido en el ensayo de restricción y para buscar la mutación en el otro alelo, se procedió a la secuenciación de los 48 exones codificantes del *gen OTOF* en el probando (apartado 5.6 de "Pacientes y Métodos"). Se confirmó la presencia de la mutación p.(Gln829\*) en el exón 22 del *gen OTOF*. Además, encontramos una nueva mutación no descrita previamente en el exón 28, que consiste en una transición en la posición 3346 (c.3346C>T). Esta sustitución reemplaza el codón para el residuo Arginina en la posición 1116 por un codón de parada prematuro (p.(Arg1116\*)) (Figura 30).



**Figura 30:** Electroferogramas de las secuencias parciales del exón 22 y 28 del gen *OTOF* y sus respectivas ubicaciones con respecto a la proteína otoferlina.

En el caso ARS 97 se comprobó que las mutaciones encontradas segregaban con la sordera en esta familia, ya que estaban presentes en heterocigosis compuesta en los dos individuos afectados y en heterocigosis en sus progenitores. El probando (II:1) y su hermano (II:2) heredaron la mutación p.(Gln829\*) de su padre (I:1) y la mutación p.(Arg1116\*) de su madre (I:2) (Figura 31). Estas dos mutaciones anulan la función de la proteína otoferlina, siendo la causa de la hipoacusia en esta familia. Los dos individuos afectados presentaban hipoacusia no sindrómica bilateral congénita y profunda. En el momento de obtener las muestras de ADN, el caso índice (II:1) con 14 años de edad y su hermano (II:2) con 13 años de edad, referían acúfenos.



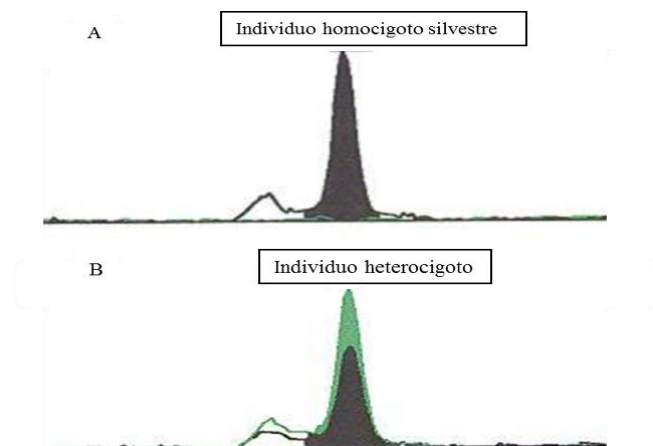
**Figura 31:** Árbol genealógico de la familia ARS 97 donde se indica la segregación de los cambios patogénicos en progenitores e hijos afectados. Se indica con flecha el caso índice. Las audiometrías presentan un grado de hipoacusia profunda en los individuos II:1 y II:2, ambos heterocigotos compuestos para las mutaciones en el gen *OTOF*.

## 2.2 Análisis de fragmentos para detectar la mutación c.2905\_2923delinsCTCCGAGCGCA.

En los 92 casos índices que quedaban sin elucidar, se procedió a la detección de la mutación c.2905\_2923delinsCTCCGAGCGCA, que consiste en una delección de 19 nucleótidos y la inserción en su lugar de 11 nucleótidos. No se detectó ningún caso positivo (0/184 cromosomas estudiados).

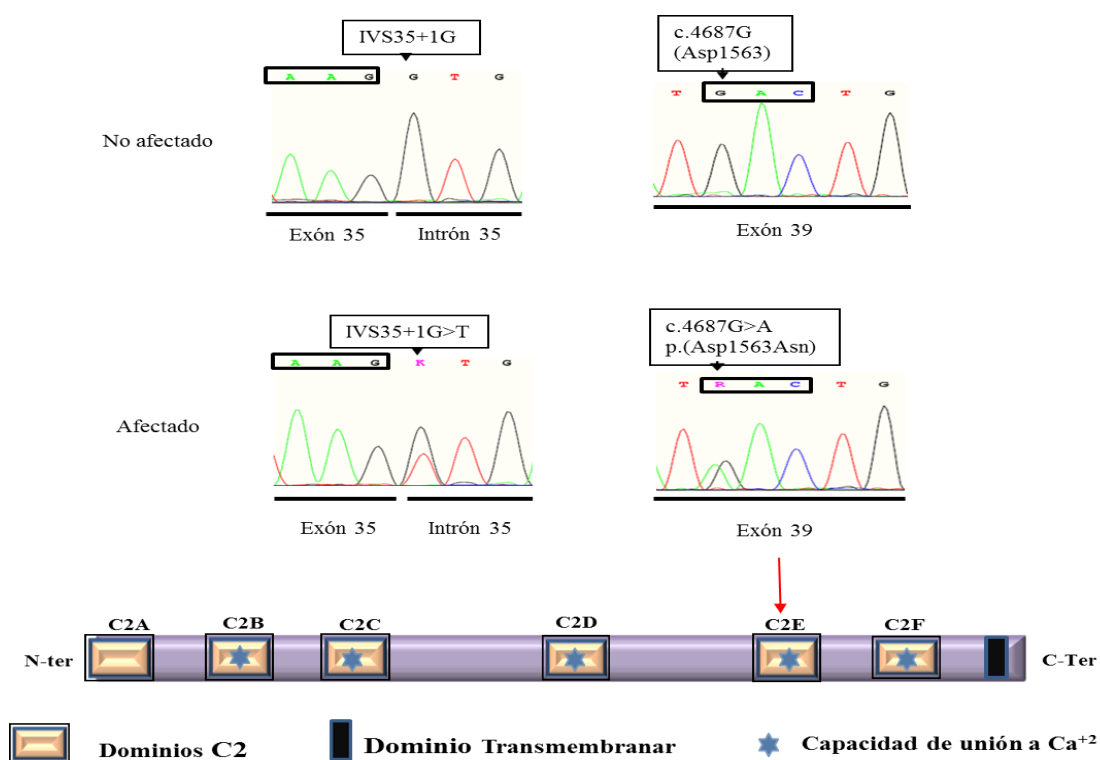
## 2.3 Ensayo de minisequenciación (*SNaPShot*). Detección de la mutación IVS35+1G>T.

Para la detección de la mutación IVS35+1G>T, se diseñó un ensayo de minisequenciación (apartado 5.3 en "Pacientes y Métodos"). El cribado se realizó en las 92 familias que quedaban sin elucidar. Este estudio dio lugar a la identificación de 1 probando (ARS 24: caso esporádico) que presentó la mutación en uno de sus dos alelos. En la [Figura 32](#) se puede observar un ejemplo de los resultados obtenidos en el ensayo para la identificación de la mutación IVS35+1G>T.



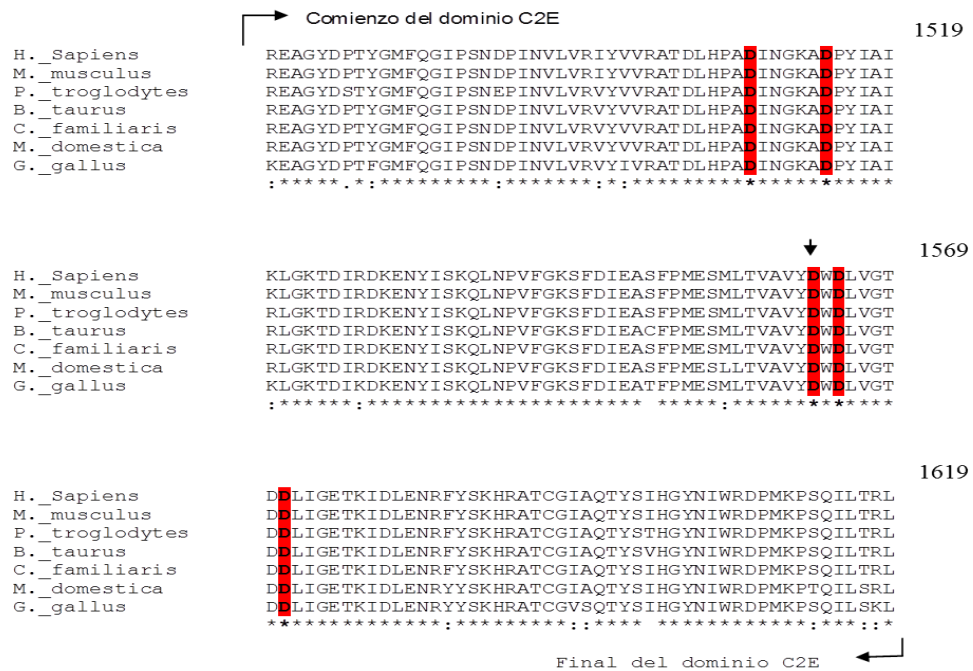
**Figura 32:** (A) Individuo homocigoto silvestre, el pico de ambos alelos se observa de color negro correspondiente a la base guanina. (B) Individuo afectado, se puede observar que hay dos picos, uno negro (citosina) y otro verde (adenina).

Para intentar esclarecer la hipoacusia del paciente, secuenciamos los 48 exones del gen *OTOF* en busca de la mutación en el otro alelo. Encontramos una nueva mutación de tipo *missense* en el exón 39, que consiste en una transición G>A en la posición 4687 (c.4687G>A). Esta sustitución reemplaza el residuo ácido aspártico en la posición 1563 (localizado en el dominio C2E) de la proteína por un residuo asparagina p.(Asp1563Asn) (Figura 33). Hay que destacar que el residuo 1563 es uno de los cinco aspárticos del dominio C2E de la otoferlina que participan directamente en la unión a calcio.

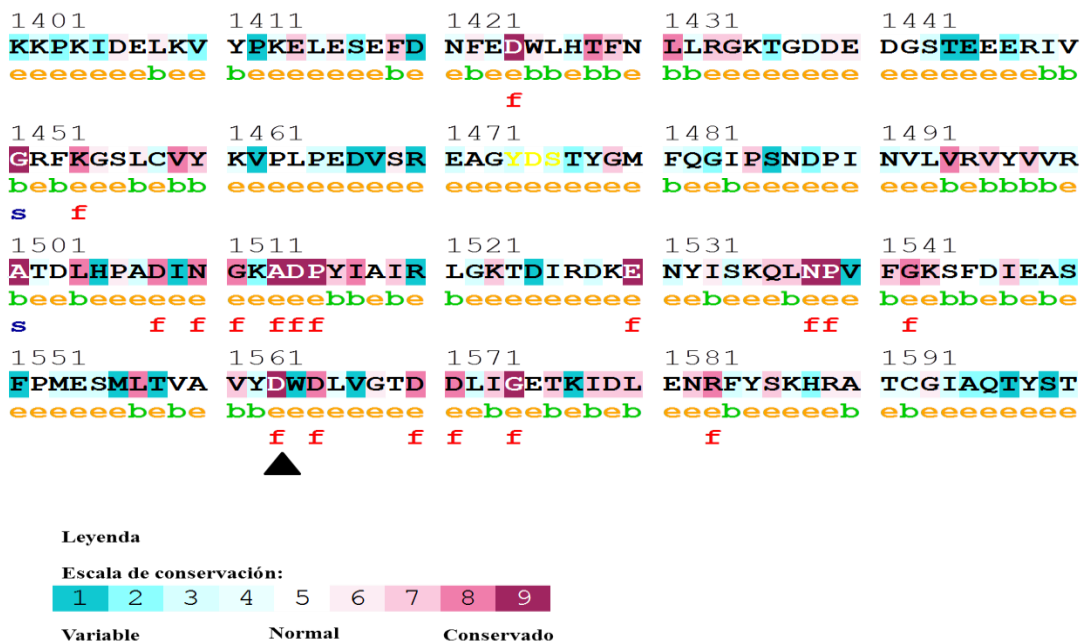


**Figura 33:** Secuencias parciales de los electroferogramas del exón35/intrón 35 y del exón 39 del gen *OTOF* y ubicación del residuo mutado en la estructura de la proteína otoferlina (isoforma larga).

Como cabría esperar, los programas *ClustalW* y *Conseq* indican una total conservación de este residuo (Figuras 34 y 35). Su sustitución por una asparagina debe anular la capacidad de unión a calcio del dominio C2E.

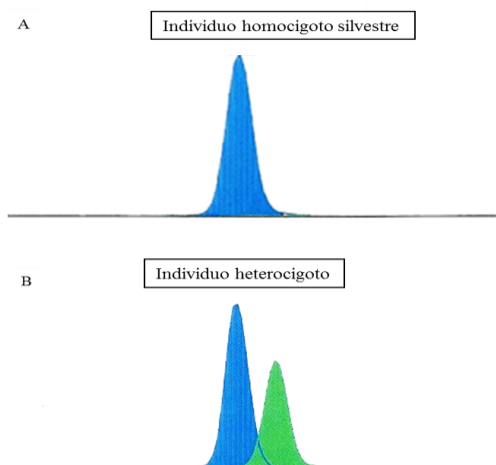


**Figura 34:** Alineamiento de los dominios C2E de las otoferlinas de varias especies mediante el programa *ClustalW*. Se puede observar el alto grado de conservación de dicho dominio. En rojo, se indican los cinco residuos de aspártico que están implicados en la unión a calcio. La flecha indica la posición del residuo Asp-1563.



**Figura 35:** Grado de conservación de la otoferlina humana y proteínas ortólogas mediante el programa *Conseq*. La punta de flecha indica el residuo Asp-1563, con valor 9 en la escala de 1 a 9. (b): oculto, (e): expuesto, (f): funcional y (s): estructural.

Mediante un ensayo de minisequenciación corroboramos la ausencia de la mutación en 120 individuos normoyentes argentinos (240 cromosomas) (Figura 36). La mutación p.(Asp1563Asn) es la primera de todas las conocidas que afecta a un residuo de ácido aspártico implicado en la unión a calcio, dentro de un dominio C2 de la otoferlina.



**Figura 36:** Ensayo de minisequenciación para detectar la mutación p.(Asp1563Asn). (A) Individuo homocigoto silvestre. (B) Individuo heterocigoto para dicha mutación. Referencia de los picos: azul (guanina) y verde (adenina).

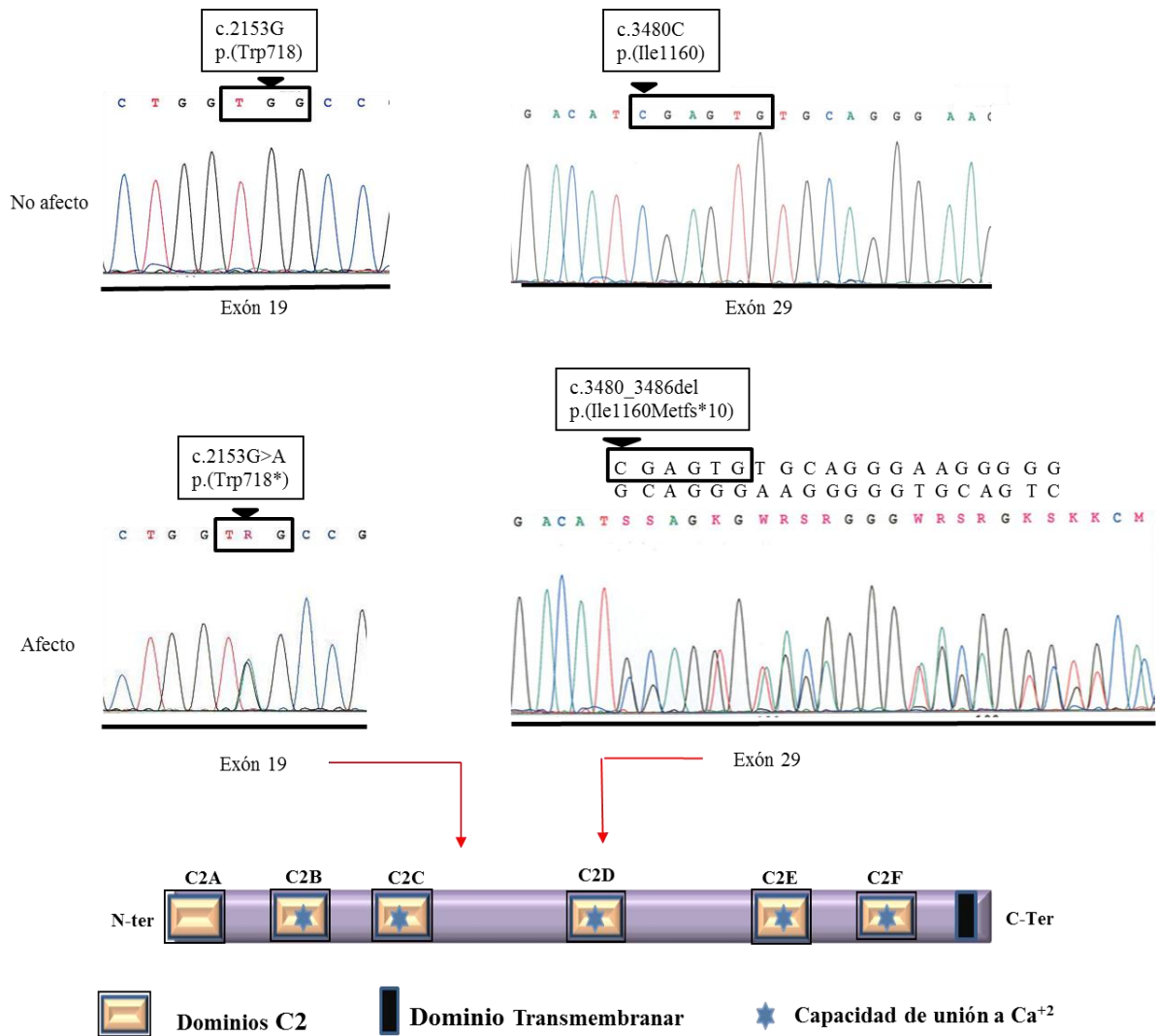
#### 2.4 Análisis de haplotipos.

Una vez realizado el cribado de los casos no elucidados de nuestra colección para las tres mutaciones más frecuentes en la población argentina, decidimos extender el estudio investigando aquellos casos de la colección compuestos por al menos dos individuos afectados en la misma fratría. En estos casos se puede realizar un análisis de haplotipos para marcadores cercanos al gen, que nos informa sobre la conveniencia de secuenciar o no los 48 exones del gen *OTOF* en un caso dado.

Se estudiaron 8 casos familiares, seleccionados de las 91 familias sin elucidar. El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamento en 3 casos (ARS 12, ARS 14 y ARS 22) de las 8 familias estudiadas. Se secuenciaron los 48 exones del gen *OTOF* en un individuo afectado de cada una de estas 3 familias.

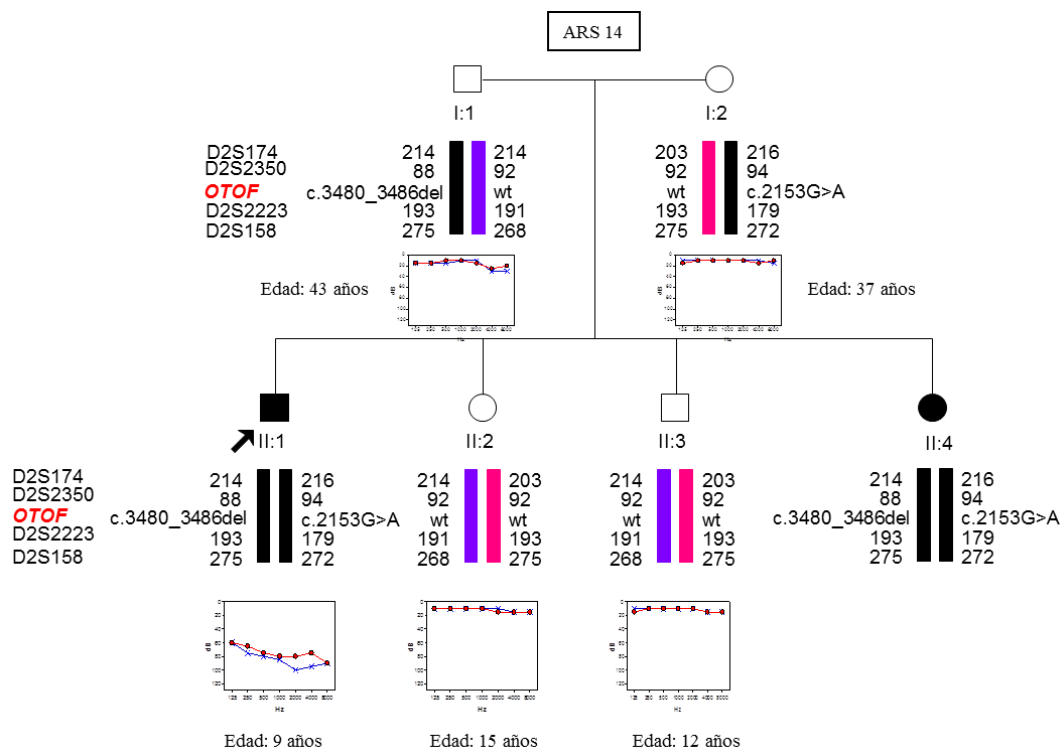
Se encontraron dos nuevas mutaciones patogénicas (una de tipo *nonsense* y otra de tipo *frameshift*), en la familia ARS 14. La variante de tipo *nonsense*, consistió en una transición G>A en la posición 2153 (c.2153G>A) en el exón 19. Esta sustitución reemplazó el codón para el residuo Triptófano en la posición 718 por un codón de parada prematuro (p.(Trp718\*)) (Figura 37). Esta mutación solamente afecta a las isoformas largas. Además, en el exón 29 encontramos una delección de 7 pb (c.3480\_3486del), que produce un cambio en la fase de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro (p.(Ile1160Metfs\*10)) (Figura 37). Esta mutación afecta tanto a las isoformas cortas como a las largas.





**Figura 37:** Secuencias parciales de los electroferogramas del exón 19 y el exón 29 del gen *OTOF* y sus respectivas ubicaciones con respecto a la proteína otoferlina (isoforma larga).

Se corroboró la ausencia de ambas mutaciones patogénicas en 50 individuos normoyentes argentinos (100 cromosomas). Posteriormente, el estudio de segregación de las mutaciones en la familia ARS 14 mostró que estaban presentes en heterocigosis en los progenitores normoyentes. El caso índice (II:1) y su hermana (II:4) heredaron la variante de tipo *frameshift* por parte de padre y la variante de tipo *nonsense*, por parte de madre; mientras que los hermanos (II:2 y II:3) no son portadores (Figura 38).



**Figura 38:** Árbol genealógico de la familia ARS 14. Se indica el análisis de haplotipos con los 4 marcadores de tipo microsatélite que flanquean al gen *OTOF*. Los números indican el tamaño de los alelos en pares de bases y la flecha el caso índice. Junto a las audiometrías se especifica la edad en que se realizó el estudio audiológico.

El estudio de las tres familias (ARS 12, ARS 14 y ARS 22) reveló también diversas variantes de secuencia no patógenas (Tabla 48).

**Tabla 48:** Variaciones de secuencia del gen *OTOF* no patógenas encontradas en las tres familias estudiadas.

Mutaciones silenciosas				
Localización	cDNA	Proteína	Nº de alelos	Nº rs (dbSNP)
Exón 5	c.372A>G	p.(Thr124Thr)	3 / 6	rs 11687696
Exón 11	c.945G>A	p.(Lys315Lys)	2 / 6	rs 41288779
Exón 18	c.2022C>T	p.(Asp674Asp)	1 / 6	rs 13004993
Exón 23	c.2580C>G	p.(Val860Val)	2 / 6	rs 2272069
Exón 24	c.2736G>C	p.(Leu912Leu)	2 / 6	rs 4335905
Exón 37	c.4446G>A	p.(Gln1482Gln)	1 / 6	<b>Este trabajo</b>
Mutación de sustitución de aminoácido				
Localización	cDNA	Proteína	Nº de alelos	Nº rs (dbSNP)
Exón 4	c.244C>T	p.(Arg82Cys)	1 / 6	rs 13031856

Las mutaciones encontradas en este estudio y los genotipos observados en los pacientes se recapitulan en las Tablas 49 y 50, respectivamente.

**Tabla 49:** Mutaciones patógenas encontradas en el gen *OTOF*.

Mutaciones				Referencias
Localización	cDNA	Proteína	Dominio	
Exón 19	c.2153G>A	<b>p.(Trp718*)</b>		<b>Este trabajo</b>
Exón 22	c.2485C>T	p.(Gln829*)		Migliosi <i>et al.</i> , 2002
Exón 28	c.3346C>T	<b>p.(Arg1116*)</b>		<b>Este trabajo</b>
Exón 29	c.3480_3486del	<b>p.(Ile1160Metfs*10)</b>		<b>Este trabajo</b>
Intrón 35	IVS35+1G>T			Rodríguez-Ballesteros <i>et al.</i> , 2008
Exón 39	c.4687G>A	<b>p.(Asp1563Asn)</b>	C2E	<b>Este trabajo</b>

Número de acceso para el gen *OTOF*: a nivel c.DNA (RefSeq ID: NM\_194248.2). Se resaltan en negrita las mutaciones encontradas en este trabajo no descritas previamente.

**Tabla 50:** Genotipos con variantes patogénicas del gen *OTOF*.

Casos	Genotipos	Grado de Sordera	Inicio	Historia	Procedencia geográfica de abuelos maternos y paternos
ARS 14	<b>p.(Trp718*) / p.(Ile1160Metfs*10)</b>	profunda	prelocutivo	Familiar	España/Países árabes
ARS 24	IVS35+1G>T/ <b>p.(Asp1563Asn)</b>	profunda	prelocutivo	Esporádico	España/ Argentina
ARS 97	p.(Gln829*)/ <b>p.(Arg1116*)</b>	profunda	prelocutivo	Familiar	España/ Argentina

Se indican en **negrita** las nuevas mutaciones encontradas en este estudio.

## 2.5 Correlación Genotipo-Fenotipo.

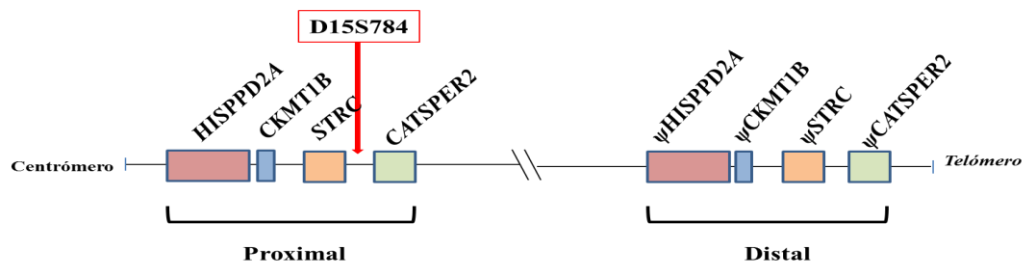
Los datos reunidos sobre la edad de manifestación y el grado de la hipoacusia, en los cuatro individuos afectados para los que tenemos datos audiológicos, concordaron con lo hasta ahora conocido para la hipoacusia DFNB9 (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008). En los tres casos la hipoacusia era prelocutiva, detectada en el primer año de vida, y profunda.

## 3 Hipoacusia de tipo DFNB16 (*STRC*).

### 3.1 Ensayo de PCR múltiple para la detección de deleciones en el gen *STRC*.

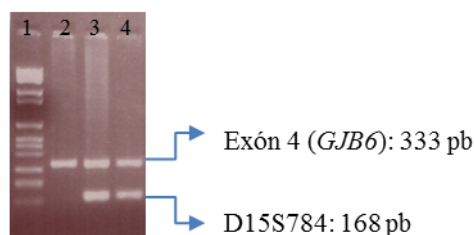
Resultados recientes de nuestro laboratorio y de otro equipo de investigación (Francey *et al.*, 2012) sugerían que la contribución del gen *STRC* al conjunto de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas podía ser significativa. Decidimos investigar esta cuestión en nuestra cohorte argentina.

Como se mencionó en la Introducción, el gen *STRC* (15q15.3) se encuentra dentro de una región duplicada en tándem, lo que dificulta su estudio. En el año 2007, Zhang y colaboradores hallaron un marcador no polimórfico de tipo STS (*sequence tagged site*), presente exclusivamente en la región proximal del cromosoma 15 entre el gen *STRC* y el gen *CATSPER2*, denominado D15S784 (Figura 39). Desde entonces se utiliza este marcador para detectar posibles deleciones presentes en ambos alelos de la región cromosómica proximal que contiene el gen *STRC*.



**Figura 22:** Región del cromosoma 15 (15q15.3) duplicada en tándem. Se puede observar el gen *STRC* y la localización del marcador D15S784 en la parte proximal. La parte distal contiene los pseudogenes (Adaptado de Zhang *et al.*, 2007).

Para detectar la presencia o ausencia de dicho marcador, se utilizó un ensayo de PCR múltiple (apartado 6.1). Dicho ensayo se basa en amplificar el marcador D15S784 (168 pb) y el exón 4 del gen *GJB6* (333 pb), que se utiliza como control interno de PCR. Investigamos 90 casos argentinos. El ensayo reveló un caso positivo. En el caso índice de la familia ARS 74 (II:2) (Figura 40) el marcador D15S784 no amplificó, sugiriendo la presencia de deleciones del gen *STRC* en homocigosis.

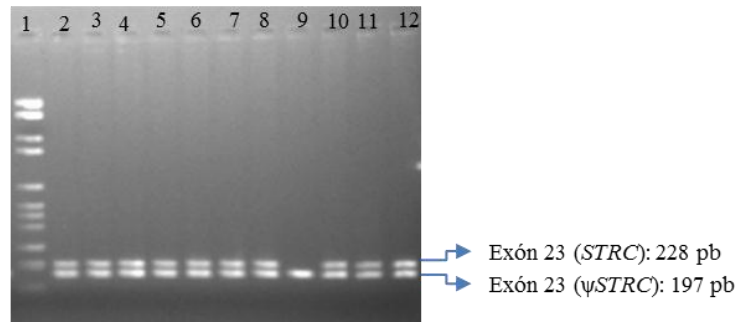


**Figura 40:** Ensayo de PCR múltiple para la detección del marcador D15S784. Gel de agarosa al 2%. Se observa el marcador D15S784 (168 pb) y el exón 4 del gen *GJB6* (333 pb). (1) Marcador de peso molecular VI (Roche). (2) Individuo homocigoto para una deleción, no amplifica el marcador D15S784. (3 y 4) Individuos no homocigotos, amplifican ambos fragmentos.

### 3.2 Ensayo de detección mediante PCR-AFLP.

La comparación de secuencias entre el gen *STRC* y su pseudogén reveló que el gen contiene una secuencia de 31 nucleótidos (situada 28 nucleótidos antes del inicio del exón 23), que no está presente en su pseudogén. Un ensayo de PCR-AFLP (siglas en inglés de *Amplified Fragment Length Polymorphism*), desarrollado en nuestro laboratorio, permite distinguir la presencia o ausencia de este trecho de secuencia en los probandos.

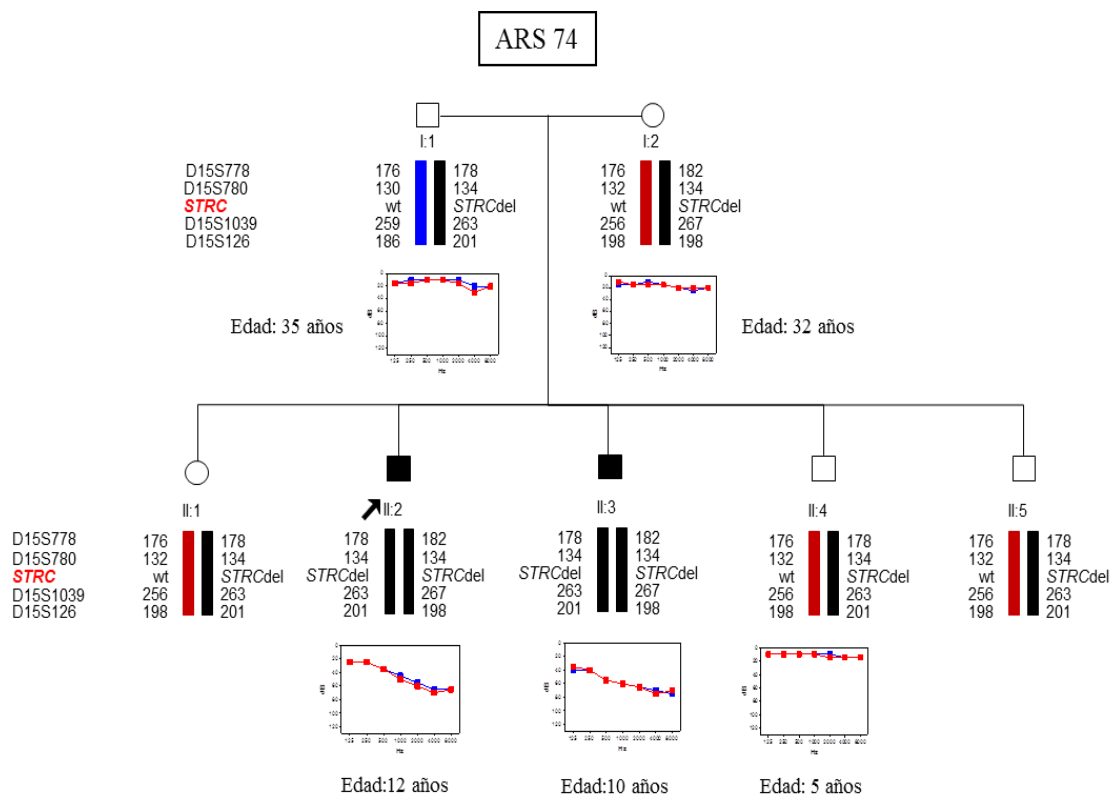
La aplicación de este ensayo a los 90 casos argentinos confirmó la existencia de deleción del gen en el individuo afectado de la familia ARS 74 (II:2) (Figura 41). No se detectaron casos adicionales.



**Figura 41:** Patrón de bandas obtenido en el ensayo de PCR-AFLP para detectar la delección en la región próxima al exón 23 del gen *STRC*. (1) Marcador de peso molecular VI (Roche). (2-12) Individuos problema. Nótese en el carril 9 la ausencia de la banda correspondiente al exón 23 del gen *STRC*.

### 3.3 Análisis de ligamiento.

Para examinar la segregación de las delecciones en el gen *STRC* se realizó el análisis de haplotipos en la familia ARS 74. Se utilizaron cuatro marcadores microsatélites cercanos al *locus* DFNB16 en el orden: cen-D15S780-D15S778-*STRC*-D15S1039-D15S126-tel. Se corroboró que dicha familia presentaba compatibilidad de ligamiento a dicho *locus* (Figura 42).



**Figura 42:** Árbol genealógico de la familia ARS 74. Se indica el análisis de haplotipos con los 4 marcadores microsatélites que flanquean al gen *STRC*. La flecha señala el caso índice. Los números indican el tamaño de los alelos en pares de bases. Debajo de cada individuo se adjuntan los estudios audiométricos. Se puede observar que los individuos afectados (II:2 y II:3) presentan audiogramas correspondientes a una hipoacusia de grado moderado.

#### 4 Análisis de otros genes.

Con el fin de extender el estudio a otros 14 genes, e investigar su espectro mutacional en casos argentinos, decidimos concentrar los trabajos sobre un grupo selecto de familias. Se trataba de 8 casos familiares con la característica de tener al menos dos individuos afectados en la misma fratría. Esto nos permitiría aplicar un análisis de haplotipos previo a la secuenciación, con el fin de excluir del estudio de cada gen aquellos casos no ligados al mismo. Esta estrategia es muy conveniente para disminuir el esfuerzo en una tarea tan laboriosa. Estas 8 familias incluían los casos ARS 14 y ARS 74, que ya hemos descrito como elucidados (mutaciones patogénicas en *OTOF* y *STRC*, respectivamente). Dado que el estudio de los 14 genes adicionales se fue llevando de forma simultánea al de los genes *OTOF* y *STRC*, presentaremos en esta sección las variantes de secuencia no patogénicas encontradas en otros genes en estos dos casos, junto con los resultados obtenidos en los seis casos restantes.

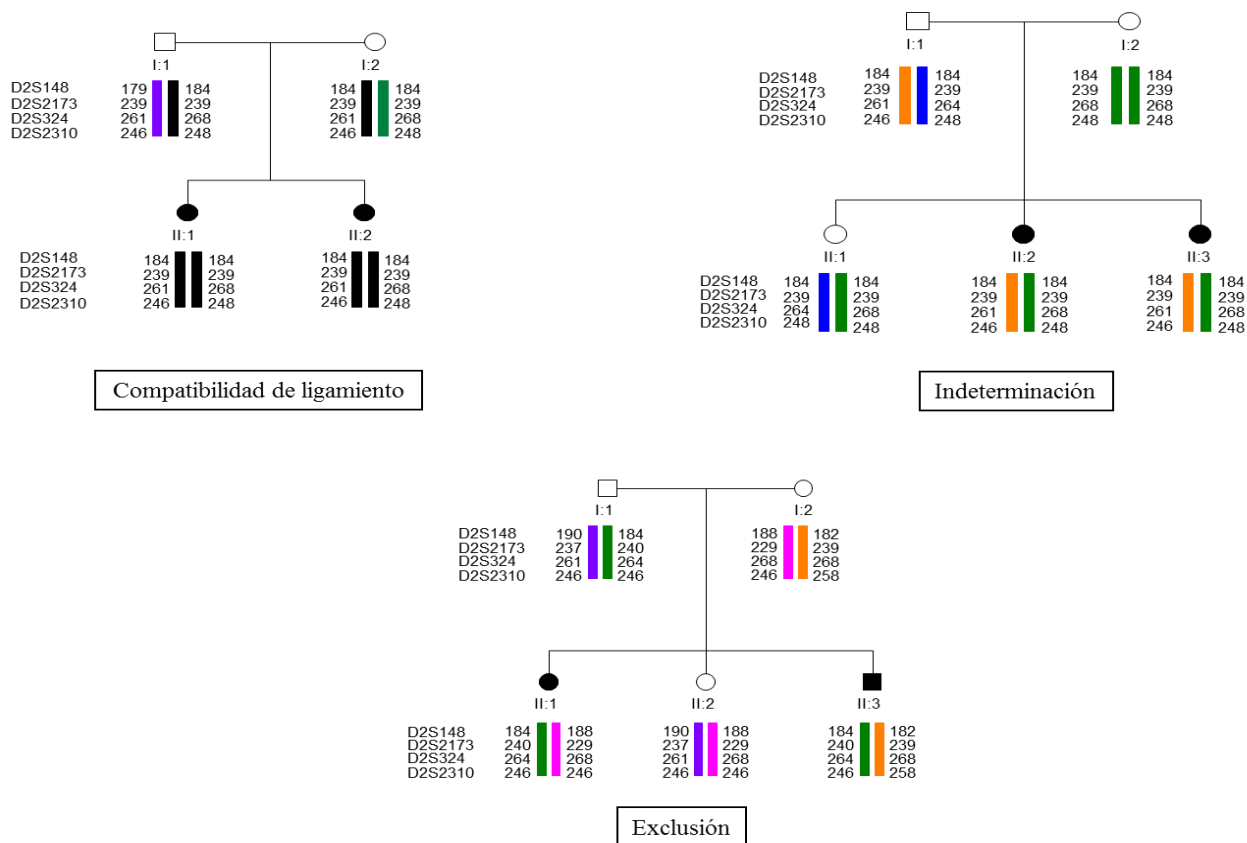
Aplicamos el análisis de haplotipos previo a la secuenciación, en todos los genes con elevado número de exones (apartado 4.1). En genes con un número de exones pequeño, realizamos la secuenciación sin previo filtrado de los casos (apartado 4.2).

##### 4.1 Análisis de Haplotipos y Secuenciación.

Se estudiaron los siguientes genes: *MYO6* (miosina VI), *MYO15A* (miosina XVA), *PCDH15* (protocadherina 15), *TRIOBP* (proteína TRIOBP), *TECTA* (alfa-tectorina), *PJVK* (pejvakina), *CDH23* (cadherina 23), *TMC1* (proteína TMC1) y *SERPINB6* (serpina B6). El análisis de haplotipos de los 8 casos familiares seleccionados reveló compatibilidad de ligamiento, indeterminación o exclusión de ligamiento a los diferentes genes, según se detalla en la [Tabla 51](#). En la [Figura 43](#) se puede observar un ejemplo de cada tipo de caso.

**Tabla 51:** Resultados del análisis de haplotipos.

Genes	Compatibilidad de Ligamiento	Indeterminación	Exclusión	Casos no excluidos
<i>MYO6</i> (35 exones)	0 / 8 casos	0 / 8 casos	8 / 8 casos	/
<i>MYO15A</i> (65 exones)	0 / 8 casos	0 / 8 casos	8 / 8 casos	/
<i>PCDH15</i> (32 exones)	0 / 8 casos	0 / 8 casos	8 / 8 casos	/
<i>TRIOBP</i> (23 exones)	0 / 8 casos	0 / 8 casos	8 / 8 casos	/
<i>TECTA</i> (23 exones)	0 / 8 casos	0 / 8 casos	8 / 8 casos	/
<i>SLC26A4</i> (21 exones)	4 / 8 casos	0 / 8 casos	4 / 8 casos	ARS 12, ARS 14, ARS 47, ARS 88
<i>SERPINB6</i> (7 exones)	2 / 8 casos	2 / 8 casos	4 / 8 casos	ARS 12, ARS 27, ARS 47, ARS 88
<i>PJVK</i> (7 exones)	2 / 8 casos	1 / 8 casos	5 / 8 casos	ARS 22, ARS 27, ARS 47
<i>CDH23</i> (69 exones)	1 / 8 casos	0 / 8 casos	7 / 8 casos	ARS 74
<i>TMC1</i> (24 exones)	1 / 8 casos	0 / 8 casos	7 / 8 casos	ARS 118



**Figura 43:** Análisis de haplotipos para ejemplificar los criterios de exclusión, compatibilidad de ligamiento e indeterminación con el gen en estudio.

- **Genes MYO6, MYO15A, PCDH15, TRIOBP y TECTA:** El análisis de haplotipos indicó exclusión de ligamiento de la hipoacusia a dichos genes.
- **Gen SLC26A4:** Los resultados indicaron compatibilidad de ligamiento en cuatro familias (ARS 12, ARS 14, ARS 47 y ARS 88). Se secuenciaron los 20 exones codificantes del gen *SLC26A4* en un individuo afecto de cada familia. Se encontró una variante de secuencia en la región codificante (una mutación de sustitución de aminoácido), en heterocigosis en el probando (Tabla 52).

**Tabla 52:** Mutaciones encontradas en el gen *SLC26A4*.

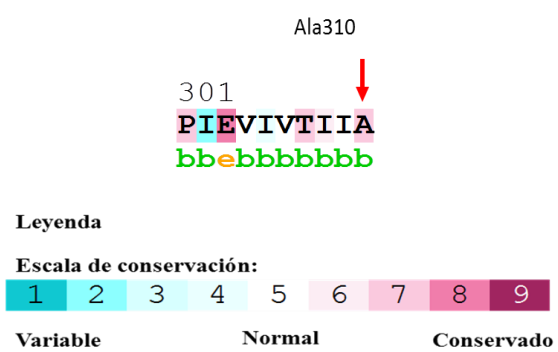
Mutación de sustitución de aminoácido					
Localización	cDNA	Proteína	Dominio	Nº de caso	Referencias
Ex 8	c.929C>T	p.(Ala310Val)	TM	ARS 14-1	Este trabajo

Número de acceso para el gen *SLC26A4*: a nivel c.DNA (RefSeq ID: NM\_000441.1). (TM): dominio transmembranar.

La mutación p.(Ala310Val) afecta a un residuo relativamente conservado *ClustalW* y (*Conseq*: 7) (Figuras 44 y 45) y los valores de *Polyphen* (0,99) y *SIFT* (0,03) sugieren que se trataría de una variante patogénica.



**Figura 44:** Alineamiento de un fragmento de la proteína pendrina mediante el programa *ClustalW*. En rojo se indica el residuo alanina muy conservado en la proteína ortóloga de varias especies.



**Figura 45:** Grado de conservación del residuo Ala-310 en la proteína pendrina según el programa *Conseq*. La flecha indica el residuo afectado. Referencias: (e): expuesto, (b): oculto.

Por esta razón, exploramos mediante un ensayo de PCR-*RFLP* su presencia en 95 controles normoyentes argentinos (190 cromosomas) y encontramos un caso positivo. Esto sugiere que se trata de una variante polimórfica rara. Además, el probando de la familia ARS 14 que presentó la mutación p.(Ala310Val) en un solo alelo, llevaba dos mutaciones patogénicas en el gen *OTOF* (apartado 2.4 de Resultados).

➤ **Gen *SERPIN6*:** El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento en dos casos e indeterminación en otros 2 casos. Se secuenciaron los 7 exones de un individuo afectado de cada familia. Se detectó una variante de secuencia sin efectos patogénicos (Tabla 54). El cambio p.(Met90Val) es un polimorfismo ya descrito. El residuo Met-90, según el programa *Conseq* (valor 5) estaría poco conservado. El programa *Polyphen-2* (valor 0) predice que dicho cambio sería benigno.



**Tabla 54:** Mutaciones encontradas en el gen *SERPINB6*.

Mutación de sustitución de aminoácido				
Localización	cDNA	Proteína	Nº de alelos	Nº rs (dbSNP)
Exón 3	c.268A>G	p.(Met90Val)	2/ 16	rs 2295769

➤ **Gen *PJK***: El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento en 2 casos e indeterminación en un tercer caso. Se secuenciaron los 7 exones de un individuo afectado de cada familia. No se encontró ninguna variante de secuencia.

➤ **Gen *CDH23***: El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento en una familia estudiada. Se secuenciaron los 69 exones del gen *CDH23* en el individuo afectado de la familia ARS 74. Se identificaron tres mutaciones silenciosas y cuatro mutaciones de sustitución de aminoácidos, todos ellos descritos en las bases de datos, sin efectos patogénicos (Tabla 55).

**Tabla 55:** Mutaciones encontradas en el gen *CDH23*.

Mutaciones silenciosas						
Localización	cDNA	Proteína	Dominio	Nº de alelos	Nº rs (dbSNP)	Referencias
Exón 5	c.366T>C	p.(Val122Val)	Cadherina 1	Heteroc.	rs3802720	Roux <i>et al.</i> , 2006, 2011,
Exón 21	c.2316T>C	p.(Asn772Asn)	Cadherina 7	Heteroc.	rs3752752	Le Quesne Stabej <i>et al.</i> , 2012
Exón 21	c.2388T>C	p.(Asp796Asp)	Cadherina 8	Heteroc.	rs3752751	Ammar-Khodja <i>et al.</i> , 2009 Roux <i>et al.</i> , 2006, 2011
Mutaciones de sustitución de aminoácido						
Localización	cDNA	Proteína	Dominio	Nº de alelos	Nº rs (dbSNP)	Referencias
Exón 31	c.4051A>G	p.(Asn1351Asp)	Cadherina 13	Homoc.	rs1227065	Ammar-Khodja <i>et al.</i> , 2009
Exón 37	c.4723G>A	p.(Ala1575Thr)	Cadherina 15	Homoc.	rs1227051	Ammar-Khodja <i>et al.</i> , 2009
Exón 38	c.5023G>A	p.(Val1675Ile)	Cadherina 16	Heteroc.	rs17712523	Roux <i>et al.</i> 2011
Exón 45	c.5996C>G	p.(Thr1999Ser)	Cadherina 19	Homoc.	rs11592462	Ebermann <i>et al.</i> , 2007

Número de acceso para el gen *CDH23*: a nivel c.DNA (RefSeq ID: NM\_022124.5).

➤ **Gen *TMCI***: El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento en una de las familias estudiadas. Se secuenciaron los 24 exones del gen *TMCI* en el individuo afectado de la familia ARS 118. No se encontró ninguna variante de secuencia.

#### 4.2 Secuenciación directa de los genes *BSND*, *TMHS*, *CLDN14* y *TMIE*.

Para estos cuatro genes, se investigaron las 8 familias seleccionadas para el estudio.

##### ➤ **Gen *BSND*.**

Se secuenciaron los cuatro exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *BSND* en un individuo afectado de cada familia. El cambio detectado se detalla en la Tabla 56, sin efecto patogénico y descrito en la base de datos.

**Tabla 56:** Mutaciones encontradas en el gen *BSND*.

Mutación silenciosa			N° de alelos	N° rs (dbSNP)	Nro rs (dbSNP)
Localización	cDNA	Proteína			
Exón 4	c.924G>C	p.(Pro308Pro)	1 / 16	rs: 33938617	rs: 33938617

Número de acceso para el gen *BSND*: a nivel c.DNA (RefSeq ID: NM\_057176.2).

➤ **Gen *TMHS*.**

Se secuenciaron los cuatro exones del gen *TMHS* y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes en un individuo afecto de cada familia. No se encontró ninguna variante de secuencia.

➤ **Gen *CLDN14*.**

Se secuenciaron los tres exones del gen *CLDN14* y regiones intrónicas flanqueantes, en un individuo afecto de cada familia. Los cambios detectados se detallan en la [Tabla 57](#), sin efectos patogénicos y descritos en la base de datos.

**Tabla 57:** Mutaciones encontradas en el gen *CLDN14*.

Mutaciones silenciosas			N° de alelos	N° rs (dbSNP)
Localización	cDNA	Proteína		
Exón 3	c.243C>T	p.(Arg81Arg)	1 / 16	rs:219779
Exón 3	c.687G>A	p.(Thr229Thr)	1 / 16	rs:219780
Mutación de sustitución de aminoácido			N° de alelos	N° rs (dbSNP)
Localización	cDNA	Proteína		
Exón 3	c.11C>T	p.(Thr4Met)	2 / 16	rs:113831133

Número de acceso para el gen *CLDN14*: a nivel c.DNA (RefSeq ID: NM\_144492.2).

La mutación p.(Thr4Met) fue clasificada en otros estudios como no patogénica (Uyguner *et al.*, 2003; Wattenhofer *et al.*, 2005). Asimismo, el programa bioinformático *Polyphen2* (valor: 0.315) predice que la variante sería benigna.

➤ **Gen *TMIE*.**

Se secuenciaron los cuatro exones del gen *TMIE* y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, en un individuo afecto de cada familia. Encontramos una variante de secuencia, que consistió en la delección de un triplete AAG (c.391\_393del) en el exón 4, sin efecto patogénico ([Tabla 58](#)). Se trata de un polimorfismo frecuente (6 de 16 alelos estudiados).

**Tabla 58:** Mutaciones encontradas en el gen *TMIE*.

Mutación deletérea			N° de alelos	Referencia
Localización	cDNA	Proteína		
Exón 4	c.391_393del	p.(Lys131del)	6 / 16	Aguirre, 2009

Número de acceso para el gen *TMIE*: a nivel c.DNA (RefSeq ID: NM\_147196.2).

## DISCUSIÓN

La elevada heterogeneidad genética de las hipoacusias dificulta el diagnóstico genético-molecular de estos trastornos. Este problema se intenta aminorar priorizando la búsqueda de mutaciones en unos pocos genes, para lo cual se utilizan las pistas proporcionadas por las correlaciones genotipo-fenotipo y se concentran los esfuerzos sobre los genes en los que se encuentran mutaciones con mayor frecuencia. La optimización del diagnóstico de hipoacusias hereditarias se podrá conseguir mediante la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva pero, debido a su todavía elevado coste, no se utilizan como herramienta de rutina.

Actualmente se conocen 47 genes cuyas mutaciones producen hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva, que constituyen el subtipo genético de hipoacusias más prevalente. No todos estos genes contribuyen en igual medida. Las mutaciones en el locus DFNB1 (gen *GJB2* y deleciones que implican o no al gen *GJB6*) dan cuenta de hasta un 50% de los casos de estas hipoacusias, si bien este porcentaje varía en las diferentes poblaciones (Kenneson *et al.*, 2002; del Castillo y del Castillo, 2011). Pocos estudios se han publicado sobre los restantes 45 genes (Duman *et al.*, 2011), la mayoría realizados en poblaciones no europeas ni americanas (nótese que la población pakistaní es una de las mejor estudiadas). A partir de los escasos datos disponibles, se piensa que entre los genes con una contribución mayor (cada uno aporta en torno al 3-10% de los casos) se encontrarían *MYO15A* (miosina XVA, hipoacusia DFNB3), *SLC26A4* (pendrina, hipoacusia DFNB4), *TMC1* (proteína TMC1, hipoacusia DFNB7/B11), *OTOF* (otoferlina, hipoacusia DFNB9) y *CDH23* (cadherina-23, hipoacusia DFNB12). No obstante, se observa una gran variabilidad en las contribuciones de cada gen en las diferentes poblaciones. Es frecuente encontrar efectos fundadores para algunas mutaciones, que elevan enormemente la contribución del gen implicado en una población dada.

Para progresar en el conocimiento de esta materia en la población argentina, decidimos abordar en este trabajo el estudio de 18 genes implicados en hipoacusias autosómicas recesivas. Iniciamos el estudio por el locus DFNB1 (genes *GJB2* y *GJB6*), dada la elevada frecuencia de sus mutaciones en la mayoría de las poblaciones estudiadas. Seleccionamos además otros 10 genes (*MYO15A*, *SLC26A4*, *TMC1*, *OTOF*, *CDH23*, *STRC*, *TECTA*, *PCDH15*, *TRIOBP* y *MYO6*), cuya frecuencia de mutaciones en pacientes con hipoacusia, en las poblaciones hasta ahora estudiadas, destaca sobre el resto. De los genes con una presumible baja frecuencia de mutaciones en hipoacusias, seleccionamos seis (*TMIE*, *CLDN14*, *PJVK*, *TMHS*, *BSND* y *SERPIN6*), en base a que su pequeño número de exones hace el cribado menos trabajoso.

La población contemporánea argentina es en su mayor parte de ascendencia europea, con un 85-97% de caucásicos de diferentes países de Europa, principalmente España e Italia. Además, hay un 15% de diferentes etnias amerindias y un 2-4% de etnias africanas (Avena *et al.*, 2006; Salas *et al.*, 2008; Corach *et al.*, 2009; Blanco-Vera *et al.*, 2010). Dada la importante contribución española al acervo genético argentino, decidimos planificar las primeras fases del estudio sobre la base de los datos ya conocidos sobre la epidemiología genética de las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas en la población española. Los resultados de este trabajo han confirmado las similitudes que cabía esperar, y han mostrado también diferencias que deben ser tenidas en cuenta al diseñar las estrategias diagnósticas para estas hipoacusias en Argentina.

### **1. Hipoacusia de tipo DFNB1 (*locus* DFNB1, genes: *GJB2* y *GJB6*).**

La elevada frecuencia de las mutaciones en el gen *GJB2* (conexina-26) en los casos de hipoacusias no sindrómicas de la mayoría de las poblaciones ha hecho que el diagnóstico molecular de la hipoacusia se centre en este gen. Como consecuencia, se dispone de datos de epidemiología genética de la hipoacusia de tipo DFNB1 en numerosos países, incluyendo los resultados de dos estudios previos en la población argentina, además del realizado en este trabajo (Dalamón *et al.*, 2010; Gravina *et al.*, 2010) (Tabla 59). Como puede observarse, las mayores frecuencias de la hipoacusia de tipo DFNB1 se encuentran en países del área mediterránea (Grecia, Turquía, Israel, Francia, Italia y España), con cifras alrededor del 30%. En un segundo plano se sitúan los países del centro y norte de Europa (véase Alemania, por ejemplo). En Estados Unidos y China, la hipoacusia de tipo DFNB1 sigue siendo la más numerosa, pero con cifras alrededor del 15%. Finalmente, en países del Asia Central, con Pakistán como ejemplo, la frecuencia cae significativamente. Los tres estudios realizados en población argentina presentan resultados dispares, con frecuencias entre 13,5% y el 34%.

Hay que señalar que la comparación de las cohortes descritas en la literatura resulta una tarea difícil, ya que no se han seguido pautas uniformes en los diferentes estudios. Hay distintos factores que sesgan los resultados de frecuencia, entre los que señalaremos los siguientes: (1) Diferentes criterios clínicos de inclusión/exclusión de los sujetos afectados dentro de la cohorte en estudio. Los resultados pueden variar si se incluyen hipoacusias de todos los grados o solamente profundas (por ejemplo, en estudios de pacientes con implante coclear). (2) Diferentes proporciones de casos familiares y esporádicos. En todos los estudios se observa mayor frecuencia en los casos familiares que en los esporádicos (Tabla 60). Se piensa que esta diferencia se debe a que las cohortes de casos esporádicos (sin antecedentes familiares) probablemente incluyen pacientes cuya hipoacusia es de causa ambiental, sin que ésta haya podido ser detectada en su historia clínica, y por lo tanto esos pacientes no han sido excluidos del estudio. Además el mayor porcentaje en casos familiares puede estar también relacionado con la elevada frecuencia de mutaciones en el *locus* DFNB1 entre la población en general, de modo que en una misma familia pueden existir más de dos portadores fundadores, lo que facilita que aumente el número de afectados y el caso sea familiar y no

esporádico. Muchos de los estudios publicados presentan los pacientes en una cohorte única, sin tener en cuenta el sesgo que producen las diferentes proporciones de casos familiares y esporádicos en una cohorte dada. (3) Inclusión de datos solamente de casos DFNB1 demostrados, es decir, con dos alelos patogénicos; algunos estudios añaden también los casos con un solo alelo patogénico, en los que la causa de hipoacusia pudieran ser mutaciones en otro gen diferente, y son simplemente heterocigotos portadores. (4) Distintos métodos de genotipado utilizados y diferencias en la cobertura del cribado (sólo la región codificante del gen, o también otras partes del mismo). (5) Diferentes criterios sobre la patogenicidad de algunas mutaciones. (6) Diferente composición étnica o diferente procedencia geográfica de las cohortes de un mismo país. (7) Pequeño tamaño de las cohortes estudiadas (del Castillo y del Castillo, 2011).

**Tabla 59:** HNSAR de tipo DFNB1 en diferentes poblaciones.

Población	Casos de HNSAR estudiados	% tipo DFNB1	Referencia
Alemania	319	20,1	Bartch <i>et al.</i> , 2010
Israel	230	30,8	Brownstein y Avraham, 2009
Turquia	93	31,2	Kalay <i>et al.</i> , 2005
Grecia	210	33,3	Pampanos <i>et al.</i> , 2002
Italia	271	29,2	Orzan <i>et al.</i> , 2002
Italia	376	27,7	Cama <i>et al.</i> , 2009
Francia	112	26,8	Roux <i>et al.</i> , 2004
Francia	255	37,6	Feldmann <i>et al.</i> , 2004
España	980	31,3	Aguirre, 2009
Argentina	252	13,5	Dalamón <i>et al.</i> , 2010
Argentina	94	34	Gravina <i>et al.</i> , 2010
Argentina	117	20,5	<b>Este trabajo</b>
Estados Unidos	1294	16,8	Azaiez <i>et al.</i> , 2004
China	2063	14,9	Dai <i>et al.</i> , 2009
Pakistán	196	6,1	Santos <i>et al.</i> , 2005

Solamente se incluyen casos DFNB1 demostrados, es decir, con dos alelos mutantes considerados patogénicos.

**Tabla 60:** Casos familiares y esporádicos de HNSAR de tipo DFNB1 en diferentes poblaciones.

Población	Casos familiares		Casos esporádicos		Referencias
	Nº de casos estudiados	% tipo DFNB1	Nº de casos estudiados	% tipo DFNB1	
Grecia	45	42,2	165	30,9	Pampanos <i>et al.</i> , 2002
Francia	33	45,5	79	19	Roux <i>et al.</i> , 2004
España	434	41,9	546	22,9	Aguirre, 2009
Argentina	61	19,7	191	11,5	Dalamón <i>et al.</i> , 2010
Argentina	69	24,6	48	14,6	<b>Este trabajo</b>

Solamente se incluyen aquellos estudios en los que se publicaron datos desglosados para casos familiares y esporádicos.

Teniendo en mente todos estos factores, no resultan extrañas las divergencias entre las diferentes cohortes de un mismo país. Compárense por ejemplo las dos cohortes francesas (26,8% frente a 37,6%, relativamente dispares) y las dos cohortes italianas (27,7% frente a 29,2%, más

semejantes). Respecto a las cohortes argentinas, hay que señalar que las tres han seguido criterios clínicos de inclusión aparentemente similares, y métodos de cribado también similares. Al compararlas, hemos uniformizado los datos, de manera que solamente se han tenido en cuenta los casos con dos alelos DFNB1 mutados que se consideren patogénicos según lo aceptado mayoritariamente en la literatura. De este modo, las diferencias entre las cohortes podrían deberse a la distinta composición de casos (familiares/espórados), y a la diferente composición en cuanto a orígenes étnicos o procedencia geográfica. En la cohorte de Dalamón *et al.*, 2010, la relación de casos familiares frente a esporádicos es de aproximadamente 1:3. En nuestra cohorte, esta misma relación es de 1:0,7. Esta diferencia explicaría en buena parte la menor frecuencia observada en la cohorte de Dalamón *et al.*, 2010. Sorprendentemente, la cohorte de Gravina *et al.*, 2010 presenta una relación 1:8, lo que iría en contra de lo esperado, si aceptamos que los antecedentes familiares fueron suficientemente investigados. En cuanto a la procedencia geográfica de las familias, nuestra cohorte incluye un 12,8% de casos de Buenos Aires y un 87,2% de otras provincias, mientras que la cohorte de Gravina *et al.*, 2010 consta de un 59% de casos de Buenos Aires y un 41% del resto del país. Teniendo en cuenta que las oleadas migratorias españolas e italianas se asentaron principalmente en Buenos Aires, y que la hipoacusia DFNB1 es relativamente frecuente en estos dos países (en torno al 30%), cobra sentido el mayor porcentaje de casos DFNB1 en el estudio de Gravina *et al.* Consistente con esta explicación es el dato de la alta frecuencia del alelo c.35delG en dicha cohorte (68,33% frente a 54,17% en la nuestra), ya que este alelo es claramente mayoritario en España e Italia (ésta última con una de las mayores frecuencias a escala mundial de portadores de este alelo en la población general). No se puede comparar la cohorte de Dalamón *et al.*, 2010, porque los autores, que afirman que sus pacientes provienen de todo el país, no indican el desglose por áreas geográficas.

Finalmente, hay que considerar que los tamaños de las cohortes estudiadas son todavía pequeños, y que conclusiones más estables podrán alcanzarse cuando se incremente el número de casos estudiados, y cuando éstos sean realmente representativos de la población de todas las provincias del país.

Los alelos patogénicos encontrados en las tres cohortes argentinas se muestran en la [Tabla 61](#). En nuestra cohorte, encontramos que el alelo DFNB1 más frecuente fue **c.35delG** (54,17%), dato similar a los obtenidos en las otras dos cohortes argentinas (60,94% y 68,33%, respectivamente) y en la cohorte española 62,38 % (Aguirre, 2009). Este resultado era esperable al tener en cuenta la ascendencia de nuestros pacientes, mayoritariamente europea, con elevadas contribuciones españolas e italianas. La mutación c.35delG es la más frecuente en las poblaciones europeas, con un posible efecto fundador originario de Grecia (Lucotte y Dieterlen, 2005; Kokotas *et al.*, 2008). La frecuencia de portadores en la población general es realmente elevada, del 2,5% en España y del 3,1% en Italia (Gasparini *et al.*, 2000).

**Tabla 61:** Comparativa de los alelos patogénicos encontrados en las diferentes cohortes.

Mutaciones	Argentina			Argentina	España
	Este trabajo, 2013	Gravina <i>et al.</i> , 2010	Dalamón <i>et al.</i> , 2010	Σ de las tres cohortes	Aguirre, 2009
	Nº de alelos (%)	Nº de alelos (%)	Nº de alelos (%)	Nº de alelos (%)	Nº de alelos (%)
<b>c.35delG</b>	<b>26 (54,17)</b>	39 (60,94)	41 (68,33)	106 (61,63)	398 (62,38)
<b>del(GJB6-D13S1830)</b>	<b>4 (8,33)</b>	5 (7,81)	2 (3,33)	11 (6,39)	52 (8,15)
<b>p.(Arg143Trp)</b>	<b>4 (8,33)</b>	4 (6,25)	1 (1,67)	9 (5,23)	7 (1,10)
<b>c.167delT</b>	<b>4 (8,33)</b>	2 (3,12)	2 (3,33)	8 (4,65)	8 (1,25)
<b>p.(Val37Ile)</b>	<b>4 (8,33)</b>	2 (3,12)	1 (1,67)	7 (4,07)	13 (2,04)
<b>p.(Asn206Ser)</b>	<b>2 (4,17)</b>	1 (1,56)		3 (1,74)	18 (2,82)
p.(Ile20Thr)	1 (2,08)			1 (0,58)	
c.313_326del	1 (2,08)			1 (0,58)	2 (0,31)
p.(Arg184Pro)	1 (2,08)	2 (3,12)	2 (3,33)	5 (2,91)	3 (0,47)
c.645delT	1 (2,08)			1 (0,58)	
c.-23+1G>A		2 (3,12)	1 (1,67)	3 (1,74)	3 (0,47)
p.(Gly12Val)			1 (1,67)	1 (0,58)	
p.(Met34Thr)			2 (3,33)	2 (1,16)	13 (2,04)
p.(Glu47*)		2 (3,12)	1 (1,67)	3 (1,74)	24 (3,76)
p.(Trp77Arg)		1 (1,56)	1 (1,67)	2 (1,16)	12 (1,88)
p.(Ile82Met)			1 (1,67)	1 (0,58)	
p.(Val95Met)			1 (1,67)	1 (0,58)	
del(GJB6-D13S1854)		1 (1,56)	2 (3,33)	3 (1,74)	13 (2,04)
c.269insT		1 (1,56)	1 (1,67)	2 (1,16)	3 (0,47)
p.(Glu147Lys)		2 (3,12)		2 (1,16)	14 (2,19)
Nº total de alelos	48	64	60	172	638

En nuestro estudio, los siguientes cuatro alelos más frecuentes (8,33% cada uno) son del(GJB6-D13S1830), p.(Arg143Trp), c.167delT y p.(Val37Ile).

La mutación **del(GJB6-D13S1830)** es la segunda mutación más frecuente en las tres cohortes argentinas y en la española, dando cuenta de alrededor del 8% de los alelos DFNB1 patogénicos, excepto en el estudio de Dalamón *et al.*, 2010, en el que solamente llega al 3,33%. Esta mutación está ampliamente distribuida. Representa el 6-8% de los alelos patogénicos DFNB1 en las cohortes de pacientes estudiadas en España, Francia, Reino Unido, Israel y Brasil. En cohortes estudiadas de Bélgica, Italia, EEUU y Australia da cuenta del 1-5% de los alelos patogénicos DFNB1 (del Castillo *et al.*, 2003).

La mutación **p.(Arg143Trp)** se encontró en alta frecuencia en la población africana de Ghana, y no es muy común en poblaciones caucásicas (Snoeckx *et al.*, 2005). En nuestra cohorte da cuenta del 8,33% de los alelos DFNB1 patogénicos. Datos semejantes se observan en el estudio de Gravina *et al.*, 2010, con una frecuencia del 6,25%. Estos datos, contrastan con el 1,67% del otro estudio (Dalamón *et al.*, 2010), más similares a los de la cohorte española (1,10%). Es posible que esta diferencia en las frecuencias pueda deberse a un posible efecto fundador en determinadas regiones del país. Por su parte, la mutación **c.167delT** da cuenta del 8,33% de los alelos en nuestra cohorte, y en torno al 3% en las otras dos cohortes argentinas (Dalamón *et al.*, 2010; Gravina *et al.*, 2010). Esta mutación es muy común en pacientes de origen judío Askenazi (Zelante *et al.*, 1997; Kelley *et al.*, 1998) y en poblaciones palestinas. La frecuencia de portadores en la población en general es del 4% en este grupo étnico (Morell *et al.*, 1998), pero la mutación es rara en las demás poblaciones. La frecuencia relativamente alta en la población Argentina está relacionada con su alta



tasa de judíos Askenazí. En cuanto al alelo **p.(Val37Ile)**, fue descrito por Kelley y col. en 1998 como una variante polimórfica. Dos años más tarde Rabionet *et al.* (2000) encontraron la mutación en homocigosis en un paciente con hipoacusia autosómica recesiva. La sustitución aminoacídica se localiza en el dominio transmembranar M1, que se encuentra altamente conservado. Se piensa que tiene un potencial patogénico débil. De hecho, es frecuente encontrarla en heterocigosis con mutaciones de efectos más graves en pacientes con hipoacusia moderada. Nosotros la encontramos en cuatro casos, dos de los cuales tenían efectivamente una sordera moderada cuyas mutaciones acompañantes fueron p.(Asn206Trp) y p.(Ile20Trp). Los otros dos casos, presentaron una sordera severa cuyas mutaciones acompañantes fueron c.35delG y p.(Arg143Trp). La mutación p.(Val37Ile) también está presente en las otras dos cohortes argentinas y en la española, con frecuencias que van del 1,7% al 3,1%. El siguiente alelo más frecuente en nuestro estudio, **p.(Asn206S)**, que representa el 4,17% de los alelos DFNB1 patogénicos, es también relativamente frecuente en la población española. Fue también encontrado en el estudio de Gravina *et al.*, 2010, pero no así en el de Dalamón *et al.*, 2010. Otra mutación destacable es **p.(Arg184Pro)**, encontrada en las tres cohortes argentinas, en las que da cuenta del 2-3% de los alelos DFNB1 patogénicos.

Los restantes 13 alelos observados en las cohortes argentinas presentan frecuencias entre el 1% y el 3%. Ninguno de ellos aparece en las tres cohortes. El incremento del número de casos en futuros estudios permitirá evaluar su contribución con más precisión.

Es importante destacar que al menos uno de los seis alelos patogénicos más frecuentes en nuestra cohorte (Tabla 44) se encuentra presente en el 100% (este estudio), el 97% (Gravina *et al.*, 2010), y el 94% (Dalamón *et al.*, 2010) de los genotipos DFNB1 observados. Estos datos permitirían concentrar el diagnóstico molecular sobre estos seis alelos (test específicos para cada mutación, minisequenciación múltiple, etc, seguidos por secuenciación de tipo Sanger en los casos heterocigotos). Sin embargo, teniendo en cuenta la gran heterogeneidad étnica de Argentina, muy marcada en cada provincia en particular, y teniendo en cuenta que los hospitales pediátricos de Buenos Aires son los centros de referencia más importantes a nivel nacional, sería más apropiado emplear secuenciación Sanger (región promotora, exón 1 y región codificante del gen *GJB2*), y el test de PCR múltiple para la detección de las deleciones de *GJB6*, en todos los casos en estudio. De hecho, esta estrategia va a ser recomendada con carácter general por la correspondiente comisión de la EMQN (*European Molecular Genetics Quality Network*) (I. del Castillo, comunicación personal).

Respecto a las características fenotípicas de las hipoacusias de tipo DFNB1, nuestros resultados muestran que se trata de una hipoacusia prelocutiva en la mayoría de los casos (en nuestro estudio, en la totalidad) sin que se asocien malformaciones del oído interno. Algunos estudios han comunicado casos con hipoacusia postlocutiva, normalmente asociada a mutaciones específicas (Snoeckx *et al.*, 2005). El grado de hipoacusia en las familias de nuestra cohorte varía de moderada a profunda, aunque es mayoritaria la forma profunda (17/24 casos, 71%). De igual modo ocurrió en Gravina *et al.*, 2010 y Dalamón *et al.*, 2010. En cambio, en la cohorte española, mucho mayor en

número (980 casos), el grado de hipoacusia cubre todo el espectro (de leve a profunda), si bien es mayoritariamente profunda. En un estudio multicéntrico se estudió a más de 1500 individuos de diferentes países para averiguar si existía alguna correlación genotipo-fenotipo. Para ello, clasificaron a las mutaciones en "truncantes" (mutaciones que generan codones de parada prematuros en *GJB2*, la mutación del(*GJB6*-D13S1830) y la mutación del sitio de *splicing* c.-23+1G>A) y "no truncantes" (mutaciones *missense* y pequeñas deleciones en fase). Observaron que la hipoacusia de tipo DFNB1 es mayoritariamente severa o profunda, aunque también incluye fenotipos leves y moderados, e incluso observaron que pacientes con un mismo genotipo presentaban diferentes fenotipos, en cuanto al grado de pérdida auditiva, como ocurre en los casos homocigotos para c.35delG. Lo más interesante es que Snoeckx *et al.* (2005) descubrieron que el grado de pérdida auditiva asociado con la presencia de dos mutaciones truncantes era significativamente más grave que el asociado a dos mutaciones no truncantes. Además se observó que el grado de hipoacusia asociado a genotipos truncante/no truncante era intermedio entre los dos grupos anteriores, y que unas pocas mutaciones de sustitución de aminoácido (p.(Leu90Pro), p.(Met34Thr), p.(Val37Ile)) siempre estaban asociadas con hipoacusias leves o moderadas. Esto lo hemos podido corroborar en dos casos de nuestra colección, heterocigotos compuestos para p.(Val37Ile) y otra mutación.

## 2. Hipoacusia de tipo DFNB9.

En este trabajo hemos encontrado tres nuevos casos de hipoacusia de tipo DFNB9 (dos familiares y uno esporádico), que representan el 2,6% de nuestra cohorte (3 de 117). Este dato no difiere significativamente del obtenido en la población española, donde las mutaciones en el gen *OTOF* son responsables del 3,5% de los casos de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2003). Téngase en cuenta además que el cribado realizado no ha sido exhaustivo, puesto que se ha basado en la aplicación de test específicos para la detección de tres mutaciones cuya presencia en la población argentina era conocida, y en el análisis de haplotipos seguido de secuenciación en un pequeño número de familias abordables mediante esta estrategia. El cribado del gen *OTOF* en todos los casos no elucidados de nuestra colección mediante técnicas de detección de mutaciones (análisis de heterodúplex de ADN en *dHPLC*, *High-resolution DNA melting...*), o mediante secuenciación directa, podría identificar nuevos casos, aunque con una relación coste-beneficio que resulta disuasoria en un gen con tan elevado número de exones. El hallazgo de nuevos alelos mutantes en la población argentina se verá facilitado si se concentra el cribado en los casos con neuropatía auditiva. Téngase en cuenta que las mutaciones en el gen *OTOF* dan cuenta del 87% de los casos de neuropatía auditiva aislada en la población española y de más del 55% de los casos en otras poblaciones (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008).

Los tres nuevos casos DFNB9 identificados en este estudio totalizan seis mutaciones diferentes, dos de ellas ya conocidas y cuatro aún no descritas en la literatura. Hasta la fecha se conocen más de 90 mutaciones patogénicas en el gen *OTOF* (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008; Mahdieh *et al.*,

2012). Aunque no existe un "punto caliente" de mutaciones propiamente dicho, sí se pueden señalar dos amplias regiones en las que se observa la mayor concentración de mutaciones: una es entre los exones 13 a 29, y la otra, entre los exones 35 a 48 (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008; Mahdih *et al.*, 2012). Las cuatro nuevas mutaciones encontradas en este trabajo caen dentro de estas dos regiones. Es interesante señalar que no aparecen mutaciones en el exón 47, específico de isoformas de cerebro. La mayoría de las mutaciones son privadas (se han observado en un único caso), pero unas pocas sí que se encuentran repetidamente. Entre ellas destacan las mutaciones p.(Gln829\*), frecuente en la población española y en poblaciones hispanoamericanas (Migliosi *et al.*, 2002), y la mutación p.(Glu1700Gln), frecuente en poblaciones del Asia Oriental (Chiu *et al.*, 2010). En un estudio previo sobre unos pocos casos argentinos con neuropatía auditiva, se identificaron tres mutaciones no privadas: p.(Gln829\*), IVS35+1G>A y c.2905\_2923delinsCTCCGAGCGCA (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008). Hemos encontrado las dos primeras en nuestra cohorte, lo que apoya su contribución relativamente elevada al conjunto de los alelos *OTOF* patogénicos. La ausencia de la mutación c.2905\_2923delinsCTCCGAGCGCA podría deberse a un efecto fundador muy localizado: los tres casos hasta ahora conocidos provenían de la provincia de Córdoba, que no está representada en nuestra cohorte de pacientes.

La mutación p.(Gln829\*) es la tercera causa genética más frecuente de hipoacusia prelocutiva no sindrómica en la población española (Migliosi *et al.*, 2002, Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2003). Además, ha sido identificada en dos pacientes franceses, dos pacientes argentinos, un paciente inglés, un paciente estadounidense, un paciente alemán, dos colombianos y dos cubanos (Migliosi *et al.*, 2002; Varga *et al.*, 2006, Rouillon *et al.*, 2006; Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008). Por el contrario, no se ha observado esta mutación en pacientes brasileños (De Olivera *et al.*, 2007; Romanos *et al.* 2009). El análisis de haplotipos para marcadores genéticos muy próximos al gen *OTOF* reveló que los casos españoles, argentinos, estadounidense (de origen mejicano), colombianos y cubanos compartían un ancestro común (efecto fundador) (Migliosi *et al.*, 2002, Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008). De este modo, la mutación p.(Gln829\*) forma parte de las mutaciones incluidas en los test de diagnóstico de rutina en estos países.

Por su parte, la mutación IVS35+1G>A (c.4227+1G>A) se ha encontrado en un caso español, tres casos argentinos (contando el identificado en este trabajo), y un caso alemán. La falta de informatividad de los marcadores en las familias estudiadas impidió determinar sin ambigüedad sus haplotipos asociados (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008), por lo que la posibilidad de un efecto fundador permanece abierta. A la luz de nuestro estudio, sería también recomendable incluir la detección de IVS35+1G>A entre las pruebas diagnósticas de rutina.

El espectro de mutaciones patogénicas en el gen *OTOF* es muy variado, incluyendo tanto mutaciones que generan codones de parada prematuros como mutaciones de sustitución de aminoácido. Tres de las cuatro nuevas mutaciones encontradas en este trabajo generan codones de parada prematuros: p.(Arg1116\*), p.(Trp718\*) y p.(Ile1160Metfs\*10). Estas mutaciones son inequívocamente patogénicas, puesto que lo más probable es que sus respectivos transcritos sean

degradados vía mecanismos como el *nonsense-mediated decay*; si escapasen a la degradación, las proteínas sintetizadas quedarían truncadas a distintos niveles, pero carecerían de varios dominios C2 de unión a calcio, lo que les impediría desempeñar su función en el oído interno. Las mutaciones p.(Arg1116\*) y p.(Ile1160Metfs\*10) afectan a todas las isoformas (cortas y largas), mientras que la mutación p.(Trp718\*) solamente afecta a las isoformas largas. No obstante, está bien establecido que la ausencia de las isoformas largas (aun cuando las cortas se mantengan funcionales) causa hipoacusia en humanos (Yasunaga *et al.*, 2000; Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008).

La otra mutación nueva, c.4687G>A (p.(Asp1563Asn)), de tipo *missense* (provoca sustitución de aminoácido), merece una atención especial. Cuando se compara la distribución de las mutaciones de sustitución de aminoácido, patogénicas y no patogénicas, a lo largo de la otoferlina se observa un interesante patrón: la mayoría de las mutaciones patogénicas afectan a los dominios funcionales de la proteína (dominios C2 y dominio transmembranar), mientras que la mayoría de las mutaciones no patogénicas caen fuera de estos dominios. La mutación p.(Asp1563Asn) afecta al dominio C2E, lo que en sí mismo ya apoya su posible papel patogénico. Pero esta conclusión se refuerza si examinamos la función concreta del residuo de aspártico sustituido. El dominio C2 es un módulo proteico especializado en unir calcio. Suele comprender unos 130 residuos, organizados en 8 cadenas que se pliegan formando un *sándwich*-beta. La región de unión a calcio se localiza en un bucle en un extremo del pliegue, donde cinco residuos de aspartato sirven de ligandos para dos o tres iones calcio (Rizo y Sudhof, 1998; Jimenez y Bashir, 2007). La mutación p.(Asp1563Asn) sustituye uno de estos residuos esenciales del dominio C2E, lo que debe tener efectos muy graves sobre su capacidad de unión a calcio y, por consiguiente, sobre la función de la otoferlina en la sinapsis auditiva en cinta. Téngase en cuenta que se piensa que la otoferlina podría actuar como el sensor intracelular de la entrada de calcio provocada por la despolarización de las células ciliadas internas, formando parte del mecanismo que dispara la exocitosis de las vesículas sinápticas. La mutación descrita en este trabajo es la primera mutación de sustitución de aminoácido descrita en el gen *OTOF* que afecta a un residuo de los dominios C2 implicado directamente en la unión a calcio.

En cuanto a la correlación fenotípica, los datos reunidos sobre la edad de manifestación y el grado de la hipoacusia en los cuatro individuos afectados para los que tenemos datos audiológicos, concordaron con lo hasta ahora conocido para la hipoacusia DFNB9 (Rodríguez-Ballesteros *et al.*, 2008). En los tres casos la hipoacusia era prelocutiva, detectada en el primer año de vida, y profunda. Al no haberse realizado test de potenciales evocados ni de otoemisiones acústicas, no se puede determinar si estas hipoacusias responden a los criterios diagnósticos de la neuropatía auditiva.

### 3. Otros genes de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas.

En este trabajo hemos investigado otros 15 genes más implicados en las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas. En catorce de ellos hemos buscado mutaciones puntuales en un grupo de 8 casos familiares, habiendo encontrado 14 variantes de secuencia (una en *SLC26A4*, una en *SERPINB6*, siete en *CDH23*, una en *BSND*, tres en *CLDN14* y una en *TMIE*). La mayoría son polimorfismos conocidos ya registrados en las bases de datos. Solamente la variante en *SLC26A4* es nueva, pero su hallazgo en controles normoyentes (1 de 190 cromosomas) sugiere que se trata de una variante rara, pero no patogénica. Dada la elevada heterogeneidad genética de las hipoacusias no sindrómicas recesivas, con cerca de 50 genes identificados y otros muchos pendientes de identificar, este resultado no es sorprendente. De las 8 familias investigadas exhaustivamente, dos han quedado elucidadas. Las otras 6 pueden llevar mutaciones en los 29 genes no cribados en este estudio o en genes hasta ahora desconocidos. El avance de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, que ha permitido la preparación de paneles de resecuenciación de genes (Shearer *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012; y los propios desarrollos de nuestro laboratorio) nos ofrece ahora la posibilidad de completar rápidamente el cribado de los restantes genes conocidos en esas seis familias. Las familias que pudieran permanecer no elucidadas después de este cribado representarían un valioso material para la identificación de nuevos genes de hipoacusias mediante secuenciación de exoma.

Por otra parte, hemos explorado la presencia de deleciones que afecten al gen *STRC*. El cribado de este gen es complicado porque forma parte de una región genómica duplicada en tándem. El gen *STRC* y su pseudogén son idénticos en un trecho de secuencia que va desde el exón 1 al 15, intrones incluidos, lo que imposibilita diseñar amplificaciones PCR cortas que sean específicas del gen. Las diferencias entre ambos se encuentran entre los exones 15 y 29. La duplicación de la región en tándem genera inestabilidades estructurales (CNVs, *Copy Number Variations*). En concreto, se han descrito deleciones de unas 100 kb en la región, las cuales provocan un síndrome de contigüidad (hipoacusias e infertilidad en varones), por eliminación de los genes *STRC* y *CATSPER2* (que se expresa específicamente en los espermatozoides), en pacientes homocigotos (Zhang *et al.*, 2007; Knijnenburg *et al.*, 2009). En un estudio reciente (Francey *et al.*, 2012) se concluyó que las deleciones del gen *STRC* darían cuenta de hasta un 14% de los casos de hipoacusias leves o moderadas. La técnica más rápida y menos costosa para detectar deleciones que afecten al gen *STRC* en homocigosis es verificar la presencia de un marcador de tipo STS, D15S784, localizado muy cerca del gen, pero fuera del mismo (Zhang *et al.*, 2007). En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se desarrolló un ensayo de PCR-AFLP que permite distinguir la presencia o ausencia de un trecho de secuencia interno, que diferencia al gen de su pseudogén (el pseudogén tiene 31 pb menos), lo que constituye una exploración directa de si la deleción afecta realmente al gen (Ruiz-Palmero, 2012). La aplicación de ambas técnicas reveló una deleción en homocigosis en uno de los probandos de nuestra cohorte y en su hermano afectado. Los dos son varones pero, debido a su corta edad, no tenemos datos sobre una hipotética infertilidad. La

carencia de muestras de ADN de calidad suficiente para la aplicación de técnicas más sofisticadas nos ha impedido investigar la extensión exacta de la delección. Esperamos progresar en este caso en cuanto se reciban nuevas muestras. La hipoacusia de los dos pacientes es de grado moderado, lo que concuerda con lo descrito hasta ahora en la literatura. Nótese que este caso de hipoacusia de tipo DFNB16 representa el 0,85% de la cohorte en estudio, pero daría cuenta del 9,1% de los casos con hipoacusias moderadas, lo que apoya la inclusión del cribado de *STRC* en el diagnóstico molecular de rutina de este subtipo clínico de hipoacusias.

## **CONCLUSIONES**

## 1 Hipoacusia de tipo DFNB1.

- 1.1 La hipoacusia de tipo DFNB1 es la más prevalente en la población argentina. Se encontró en el 20,51% de los casos de HNSAR (24,64% de los casos familiares y 14,58% de los casos esporádicos).
- 1.2 El espectro de mutaciones observado en nuestra cohorte de 117 casos incluye 10 alelos patogénicos. Observamos que el 100% de los genotipos hallados presenta al menos uno de los 6 alelos más frecuentes.
- 1.3 La mutación c.35delG es la mutación causante de sordera mayoritaria (54,17% de los alelos DFNB1) en la población argentina.
- 1.4 La hipoacusia de tipo DFNB1 es bilateral y mayoritariamente prelocutiva y profunda.

## 2. Hipoacusia de tipo DFNB9.

- 2.1 La hipoacusia de tipo DFNB9 es un subtipo de hipoacusia relevante por su prevalencia en la población argentina (3,26% de los casos de nuestra cohorte).
- 2.2 La mayoría de las mutaciones en el gen *OTOF* que causan sordera son privadas: el estudio de tres familias no relacionadas aportó cuatro nuevas mutaciones al amplio espectro mutacional ya conocido.
- 2.3 Hemos identificado la primera mutación patogénica que afecta directamente a uno de los cinco residuos aspárticos implicado en la unión al calcio, p.(Asp1563Asn), dentro del dominio C2E de la proteína otoferlina, lo cual resalta la importancia funcional de estos dominios.
- 2.4 La hipoacusia de tipo DFNB9 es bilateral, prelocutiva y profunda.

## 3. Otros tipos genéticos de hipoacusia

- 3.1 La hipoacusia de tipo DFNB16, debida a mutaciones del gen *STRC*, está representada en la población argentina y pudiera constituir una causa frecuente de hipoacusia moderada (9,1% en este tipo de casos de nuestra cohorte).
- 3.2 El estudio preliminar de los genes *MYO15A*, *SLC26A4*, *TMIE*, *TMC1*, *CDH23*, *TECTA*, *PCDH15*, *TRIOBP*, *CLDN14*, *MYO6*, *PJVK*, *TMHS*, *BSND* y *SERPINB6* en 8 casos familiares sugiere que las mutaciones en estos genes no representan una elevada contribución a la HNSAR en la población argentina, lo que deberá ser corroborado en futuros estudios.



#### 4. Diagnóstico molecular de hipoacusia no sindrómica

El diagnóstico molecular de la HNSAR en Argentina debería basarse en un protocolo que combine varios ensayos: secuenciación Sanger del gen *GJB2*, detección de deleciones del gen *GJB6* mediante PCR múltiple, y ensayos específicos para detectar las tres mutaciones más frecuentes en el gen *OTOF* y las deleciones del gen *STRC*, a la espera de la reducción de costes de la secuenciación masiva (*NGS*), que permita el cribado de todos los genes de HNSAR conocidos.

**REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

1. **Achanzar WE, Ward S.** A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *Cell Science.* **1997**; 110:1073-1081
2. **Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR.** *Pholyphen-2.Nat Métodos.***2010**; 7(4):248-249.
3. **Aguirre Pérez LA.** Estudio genético-molecular de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas y del Síndrome de Mohr-Tranebjaerg. Tesis doctoral. **2009**.
4. **Ammar-Khodja F, Faugère V, Baux D, Giannesini C, Léonard S, Makrelouf M, Malek R, Djennaoui D, Zenati A, Claustres M, Roux AF.** Molecular screening of deafness in Algeria: high genetic heterogeneity involving DFNB1 and the Usher loci, DFNB2/USH1B, DFNB12/USH1D and DFNB23/USH1F. *Eur J Med Genet.* **2009**; 52(4):174-9.
5. **Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N.** ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucl. Acids Res.* **2010**.
6. **Avena SA, Goicoechea AS, Rey J, Dugoujon JM, Dejean CB, Carnese FR.** Mezcla génica en una muestra poblacional de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina.* **2006**; 66(2): 113-118.
7. **Azaiez H, Chamberlin GP, Fischer SM, Welp CL, Prasad SD, Taggart RT, del Castillo I, Van Camp G, Smith RJ.** *GJB2*: the spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype. *Hum Mutat.* **2004**; 24:305–11.
8. **Bartsch O, Vatter A, Zechner U, Kohlschmidt N, Wetzig C, Baumgart A, Nospes S, Haaf T, Keilmann A.** *GJB2* mutations and genotype-phenotype correlation in 335 patients from germany with nonsyndromic sensorineural hearing loss: evidence for additional recessive mutations not detected by current methods. *Audiol Neurootol.* **2010**; 15(6):375-82.
9. **Bashir R , Britton S, Strachan T, Keers S , Vafiadaki E, Lako M, Ricardo I , Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I , Marconi G, Passos-Bueno MR , Moreira Ede S , Zatz M, Beckmann JS , Bushby K.** A gene related to

- Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Nature Genetics*. **1998**; 20:37-42.
10. **Bennett MV, Zukin RS.** Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. *Neuron*. **2004**; 41:495-511.
  11. **Berezin C, Glaser F, Rosenberg J, Paz I, Pupko T, Fariselli P, Casadio R, Ben-Tal N.** ConSeq: The identification of functionally and structurally important residues in protein sequences. *Bioinformatics*. **2004**; 20:1322-1324.
  12. **Blanco-Vera A, Jaime JC, Brión M, Carracedo A.** Y-chromosome lineages in native South American population. *Forensic Science International Genetics*. **2010**; 4:187-193.
  13. **Broddy GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD.** Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med*. **1998**; 338: 548–550.
  14. **Brownstein Z, Avraham KB.** Deafness genes in Israel: implications for diagnostics in the clinic. *Pediatr Res*. **2009**; 66(2):128-34.
  15. **Cama E, Melchionda S, Palladino T, Carella M, Santarelli R, Genovese E, Benettazzo F, Zelante L, Arslan E.** Hearing loss features in *GJB2* biallelic mutations and *GJB2/GJB6* digenic inheritance in a large Italian cohort. *Int J Audiol*. **2009**; 48(1):12-7.
  16. **Campbell C, Cucci RA, Prasad S, Green GE, Edeal JB, Galer CE, Karniski LP, Sheffield VC, Smith RJH.** Pendred syndrome, DFNB4, and *PDS/SLC26A4* identification of eight novel mutations and possible genotype–phenotype correlations. *Human Mutation*. **2000**; 17(5): 403–411.
  17. **Chaib H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, Wissenbach J, El-Zir E, Loiselet J and Petit C.** A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum. Mol. Genet*. **1996**: 5:155-158.
  18. **Chantal LG, Gagnon LH, Bergstrom DE, Johnson KR.** A missense mutation in the conserved C2B domain of otoferlin causes deafness in a new mouse model of DFNB9. *Hearing Research*. **2007**; 234: 21-28.

19. Chiu YH, Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Lee WY, Liu AY, Hsu CJ. Mutations in the *OTOF* gene in Taiwanese patients with auditory neuropathy. *Audiol Neurootol*. **2010**; 15(6):364-74.
20. Choi BY, Stewart AK, Madeo AC, Pryor SP, Lenhard S, Kittles R, Eisenman D, Kim HJ, Niparko J, Thomsen J, Arnos KS, Nance WE, King KA, Zalewski CK, Brewer CC, Shawker T, Reynolds JC, Butman JA, Karniski LP, Alper SL, Griffith AJ. Hypo-functional *SLC26A4* variants associated with nonsyndromic hearing loss and enlargement of the vestibular aqueduct: genotype-phenotype correlation or coincidental polymorphisms? *Hum Mutat*. **2009**; 30(4): 599–608.
21. Cone-Wesson B, Rance G. Auditory neuropathy: a brief review. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg*. **2000**; 8:421-425.
22. Corach D, Lao O, Bobillo C, Van Der Gaag K, Zuniga S, Vermeulen M, Van Duijn K, Goedbloed M, Vallone P. M, Parson W, De Knijff P and Kayser M. Inferring Continental Ancestry of Argentineans from Autosomal, Y-Chromosomal and Mitochondrial DNA. *Annals of Human Genetics*. **2009**; 74: 65–76.
23. Dai P, Fei Yu, Han Bing, Liu Xuezhong, Wang Guojian, Li Qi, Yuan Yongyi, Liu Xin, Huang Deliang, Kang Dongyang, Zhang Xin, Yuan Huijun, Yao Kun Hao Jinsheng, Jia He, Yong He, Youqin Wang , Qing Ye, Youjun Yu, Lin Hongyan, Liu Lijia, Deng Wei, Zhu Xiuhui, Yiwen Usted, Cui Jinghong, Hou Nongsheng, Xu Xuehai, Zhang Jin, Tang Liang, Song Rendong, Lin Yongjun, Sun Shuanzhu, arruinando Zhang, Hao Wu, Yuebing Ma, Zhu Shanxiang, Wu Bai-lin, Han Dongyi, Lee-Jun C Wong. *GJB2* mutación del espectro radioeléctrico en 2063 pacientes chinos con discapacidad auditiva no sindrómica. *J Med Transl*. **2009**; 7: 26.
24. Dalamón V, Lotersztein V, Béhèran A, Lipovsek M, Diamante F, Pallares N, Francipane L, Frechtel G, Paoli B, Mansilla E, Diamante V, Elgoyhen AB. *GJB2* and *GJB6* genes: molecular study and identification of novel *GJB2* mutations in the hearing-impaired Argentinean population. *Audiol Neurootol*. **2010**; 15(3):194-202.
25. Davis DB, Delmonte AJ, Ly CT, McNally EM. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. **2000**; 9:217–226.

26. Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo M A, Del Castillo F J, Alvarez A, Telleria D, Menéndez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in non-syndromic hearing impairment. *N. Engl. J. Med.* **2002**; 346: 243–249.
27. Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering KR, Chamberlin GP, Ballana E, Wuyts W, Maciel-Guerra AT, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Dahl HH, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T, Nance WE, Sartorato EL, Smith RJ, Van Camp G, Avraham KB, Petit C, Moreno F. Prevalence and evolutionary origins of the del(*GJB6-D13S1830*) mutation in the *DFNB1* locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet.* **2003**; 73:1452–1458.
28. Del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, De Oliveria CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuyts W, Aguirre L, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl HM, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith RJH, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, del Castillo I. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6-D13S1830*), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin36) in subjects with *DFNB1* non-syndromic hearing impairment. *J. Med. Genet.* **2005**; 42:588–594.
29. Del Castillo FJ, del Castillo I. The *DFNB1* subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Front Biosci.* **2011**; 16:3252-74.
30. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox S A, Lench N J, Allen-Powell D R, Osborn A H, Dahl H H, Middleton A, Houseman M J, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S., Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El Zir E, Aubois A, Joannard A, and Petit C. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.* **1997**; 6:2173-2177.
31. Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaïb H, Lévi-Acobas F, Weil D, Petit C. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature.* **1998**; 393(6683): 319-320.
32. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, Petit C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, *DFNB1*, due to a

- connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* .1999; 353:1298-1303.
33. **De Oliveira CA, Alexandrino F, Christiani TV, Steiner CE, Cunha JL, Guerra AT, Sartorato EL.** Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A (14):1574-9.
34. **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.** A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996; 380:152–154.
35. **Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS.** 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Centre for Molecular Biology and Biotechnology, University of Queensland, Brisbane Australia. *Source Nucleic Acids Res*. 1991; 19(14):4008.
36. **Dror AA and Avraham KB.** Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu. Rev. Genet*. 2009; 43:411-437.
37. **Duman D, Sirmaci A, Cengiz FB, Ozdag H, Tekin M.** Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011; 15(1-2):29-33.
38. **Duman D and Tekin M.** Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes:a review. *Frontiers in Bioscience*. 2012; 17:2213-2236.
39. **Ebermann I, Lopez I, Bitner-Glindzicz M, Brown C, Koenekoop RK, Bolz HJ.** Deafblindness in French Canadians from Quebec: a predominant founder mutation in the USH1C gene provides the first genetic link with the Acadian population. *Genoma Biol*. 2007; 8 (4): R47.
40. **Essenfelder GM, Larderet G, Waksman G, Lamartine J.** Gene structure and promoter analysis of the human *GJB6* gene encoding connexin 30. *Gene*. 2005; 350:33–40.
41. **Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Milà M, Zelante L, Gasparini P.** Connexin-

- 26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet*. **1998**; 351(9100):394 – 398.
- 42. Feldmann D, Denoyelle F, Loundon N, Weil D, Garabedian EN, Couderc R, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journal H, Catros H, Ferrec C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Moati L, Petit C, Marlin S.** Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin 26 gene. *Eur J Hum Genet*. **2004**; 12:279–84.
- 43. Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nickel R.** Connexins and gap junctions in the inner ear. *Audiol. Neurootol*. **2002**; 7:141–145.
- 44. Francey LJ, Conlin LK, Kadesch HE, Clark D, Berrodin D, Sun Y, Glessner J, Hakonarson H, J alas C, Landau C, Spinner NB, Kenna M, Sagi M, Rehm HL, Krantz ID.** Genome-wide SNP genotyping identifies the Stereocilin (*STRC*) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment. *Am J Med Genet A*. **2012**; 158A (2):298-308.
- 45. Fuchs PA, Glowatzki, E, Moser T.** The afferent synapse of cochlear hair cells. *Current Opinion in Neurobiology*. **2003**; 13 (4): 452–458.
- 46. Furshpan EJ, Pooter DD.** Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol*. **2001**; 145:289-325.
- 47. Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Rodríguez-Ballesteros M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Moreno F.** Prevalence of the 35delG mutation in the *GJB2* gene, del (*GJB6*-D13S1830) in the *GJB6* gene, Q829X in the *OTOF* gene and A1555G in the mitochondrial 12S rRNA gene in subjects with non-syndromic sensorineural hearing impairment of congenital/childhood onset. *Acta Otorrinolaringol Esp*. **2005**; 56(10):463-468.
- 48. Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G., Melchionda, S., Petersen, M., Brondum-Nielsen, K., Metspalu, A., Oitmaa, E., Pisano, M., Fortina, P., Zelante, L., Estivill, X.** High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. *Eur. J. Hum. Genet*. **2000**; 8(1), 19–23.



49. **Gravina LP, Foncuberta ME, Prieto ME, Garrido J, Barreiro C, Chertkoff L.** Prevalence of DFNB1 mutations in Argentinean children with non-syndromic deafness. Report of a novel mutation in *GJB2*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* **2010**; 74(3):250-4.
50. **Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Monica MD, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P.** Mutations in *GJB6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet.* **1999**;23(1):16-18.
51. **Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C.** A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat. Genet.* **1994**; 6 (1): 24-28.
52. **Han S H, Park H J, Kang, E J, Ryu J S, Lee A, Yang, Y H, Lee K R.** Carrier frequency of *GJB2* (connexin-26) mutations causing inherited deafness in the Korean population. *J. Hum. Genet.* **2008**; 53: 1022-1028.
53. **Hormuzdi SG., Filippov MA, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R.** Electrical synapses: a dynamic signalling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim. Biophys.* **2004**; 1662: 113-137.
54. **Jagger D, Nevill G, Forge A.** The membrane properties of cochlear root cells are consistent with roles in potassium recirculation and spatial buffering. *J Assoc Res Otolaryngol.* **2010**; 11(3): 435–448.
55. **Jimenez JL and Bashir R.** In silico functional and structural characterisation of ferlin proteins by mapping disease-causing mutations and evolutionary information onto three-dimensional models of their C2 domains. *J Neurol Sci.* 2007; 260:114-123.
56. **Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer AP, Karaguzel A.** *GJB2* mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res.* **2005**; 203(1-2):88-93.
57. **Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ.** Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**; 62(4): 792– 799.

58. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leingh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*. 1997; 387(6628): 80-83.
59. Kelsell DP, Dunlop J, Hodgins MB. Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends Cell Biol*. 2001; 11: 2-6.
60. Kenna M A, Wu B L, Cotanche D A, Korf B R & Rehm H L. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2001; 127(9): 1037-1042.
61. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. *GJB2* (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet. Med*. 2002; 4: 258–274.
62. Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med. Electron. Microsc.* 2000; 33:51–56.
63. Knijnenburg J, Oberstein SA, Frei K, Lucas T, Gijbbers AC, Ruivenkamp CA, Tanke HJ, Szuhai K. A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. *Med Genet*. 2009; 46(6):412-7.
64. Kokotas H, Van Laer L, Grigoriadou M, Iliadou V, Economides J, Pomoni S, Pampanos A, Eleftheriades N, Ferekidou E, Korres S, Giannoulia-Karantana A, Van Camp G, Petersen MB. Strong linkage disequilibrium for the frequent *GJB2* 35delG mutation in the Greek population. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A (22):2879-84.
65. Lamartine J, Munhoz Essenfelder G, Kibar Z, Lamartine J, Munhoz Essenfelder G, Z Kibar, Munhoz Essenfelder G, Kibar Z, Lanneluc I, Callouet E, Laoudj D, Lemaître G, Hand C, Hayflick SJ, Zonana J, Antonarakis S, Radhakrishna U, Kelsell DP, Christianson AL, Pitaval A, Der Kaloustian V, Fraser C, Blanchet-Bardon C, Rouleau GA, Waksman G. Mutations in *GJB6* cause hidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet*. 2000; 26:142–144.
66. Leal SM, Apaydin F, Barnwell C, Iber M, Kandogan T, Pfister M, Braendle U, Cura M, Zenner HP, Vitale E. A second Middle Eastern kindred with autosomal

- recessive nonsyndromic hearing loss segregates DFNB9. *Eur. J. Hum. Genet.* **1998**; 6: 341-344.
- 67. Lee Jack R, White TW.** Connexin-26 mutations in deafness and skin disease. *Expert Reviews in molecular medicine.* **2009**; 1-19.
- 68. Leibovici M, Safieddine S, Petit C.** Mouse models for human hereditary deafness. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2008**; 84:385-429.
- 69. Le Quesne Stabej P, Saihan Z, Rangesh N, Steele-Stallard HB, Ambrose J, Coffey A, Emmerson J, Haralambous E, Hughes Y, Steel KP, Luxon LM, Webster AR, Bitner-Glindzicz M.** Comprehensive sequence analysis of nine Usher syndrome genes in the UK National Collaborative Usher Study. *J Med Genet.* **2012**; 49(1):27-36.
- 70. Lin L, Yinhu L, Siliang L, Ni H, Yimin H, Ray P, Danni L, Lihua L, and Law M.** Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume **2012**.
- 71. Liu J, Masashi A, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Andoni Urtizberea J, Hentati F, Hamida M, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown Jr RH.** Dysferlin, a novel skeletal muscle gene is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics.* **1998**; 20(1): 31-36.
- 72. Liu W, Boström M, Kinnefors A, Rask-Andersen H.** Unique expression of connexins in the human cochlea. *Hearing Research.* **2009**; 250(1-2):55-62.
- 73. Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Günther B, Menzel HJ, Utermann G, Janecke AR.** Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur. J. Hum. Genet.* **2001**; 9: 226-230.
- 74. Lucotte G, Diéterlen F.** The 35delG mutation in the connexin 26 gene (*GJB2*) associated with congenital deafness: European carrier frequencies and evidence for its origin in ancient Greece. *Genet Test.* **2005**; 9(1):20-5.
- 75. Maison SF, Luebke AE, Liberman MC, Zuo J.** Efferent protection from acoustic injury is mediated via alpha9 nicotinic acetylcholine receptors on outer hair cells. *J Neurosci.* **2002**; 22(24): 10838-10846.

76. **Mahdieh N, Shirkavand A, Rabbani B, Tekin M, Akbari B, Akbari MT, Zeinali S.** Screening of *OTOF* mutations in Iran: a novel mutation and review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* **2012**; 76(11):1610-5.
77. **Matos TD, Caria H, Simões-Teixeira H, Aasen T, Jagger DJ, O'Neill A, Kelsell DP, Fialho G.** A novel hearing-loss-related mutation occurring in the *GJB2* basal promoter. *J Med Genet.* **2007**; 44(11):721-725.
78. **Migliosi V, Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Rodriguez-Ballesteros M, Villamar M, Telleria D, Menendez I, Moreno F, Del Castillo I.** Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (*OTOF*), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *Journal Medical Genetics.* **2002**; 39: 502–506.
79. **Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB.** Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with non-syndromic recessive deafness. *N. Engl.J. Med.* **1998**; 339:1500– 1505.
80. **Morton CC.** Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Human Molecular Genetics.* **2002**; 11(10): 1229-1240.
81. **Morton CC and Nance WE.** Newborn hearing screening-a silent revolution. *New Engl J Med.* **2006**; 354: 2151-2164.
82. **Nayak GD, Ratnayaka HS, Goodyear RJ, Richardson.** Development of the hair bundle and mechanotransduction. *GP. Int J Dev Biol.* **2007**; 51(6-7):597-608.
83. **Ng PC, Henikoff S.** Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* **2001**; 11(5):863-74.
84. **Orzan E, Murgia A, Polli R, Martella M, Mazza A, Zacchello F, Babighian G.** Connexin 26 preverbal hearing impairment: Mutation prevalence and heterozygosity in a selected population. *Int. J. Audiol.* **2002**,41(2), 120–124.

85. Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis N, Eleftheriades N, Tsakanikos M, Antoniadis T, Hatzaki A, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Gronskov K, Brondum-Nielsen K, Grigoriadou M, Gyftodimou J, Iliades T, Skevas A, Petersen MB. Prevalence of *GJB2* mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2002**; 65(2), 101–108.
86. Parsons TD. Neurobiology: auditory fidelity. *Nature.* **2006**; 444:1013-1014.
87. Pera Rosas A. Causas genéticas de las sorderas DFNB4: el síndrome de Pendred y la sordera no sindrómica EVA. Tesis doctoral. **2008**.
88. Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu. Rev. Genet.* **2001**; 35:589-646.
89. Petit C and Richardson GP. Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function. *Nature Neuroscience.* **2009**; 12(6): 703–710.
90. Prasad S, Cucci R, Green G, Smith R. Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (*GJB2*) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum. Mutat.* **2000**; 16:502-508.
91. Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC, Sarlis NJ, Arnos KS, Nance WE, Yang Y, Zalewski CK, Brewer CC, Butman JA, Griffith AJ. *SLC26A4/PDS* genotype–phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet.* **2005**; 42:159–165.
92. Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, Arbonés ML, Gasparini P, Estivill X. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene. *Hum Genet.* **2000**; 106(1):40-4.
93. Richardson GP, Boutet de Monvel J and Petit C. How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **2011**; 73: 311-334.
94. Rizo J, Südhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem.* **1998**; 273(26):15879-82.

95. Roberts WM. Snaring otoferlin's role in deafness. *Cell*. 2006; 127: 258-260.
96. Robertson ND, Morton CC. Beginning of a molecular era in hearing and deafness. *Clin Genet*. 1999; 55:149-159.
97. Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Morera C, Prieto F, Marco J, Morant A, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Navas C, Trinidad G, Tapia MC, Moreno F, del Castillo I. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (*OTOF*). *Hum. Mutat*. 2003; 22: 451-456.
98. Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli, Arslan E, Meda C, Curet C, Volter C, Sainz-Quevedo M, Castorina P, Ambrosetti U, Berrettini S, Frei K, Tedin S, Smith J, Cruz Tapia M, Cavalle L, Gelvez N, Primignani P, Gómez-Rosas E, Martín M, Moreno-Pelayo MA, Tamayo M, Moreno-Barral J, Moreno F, del Castillo I. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (*OTOF*) in subjects with non-syndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum. Mutat*. 2008; 29:823-831.
99. Romanos J, Kimura L, Fávero ML, Izarra FA, de Mello Auricchio MT, Batisso AC, Lezirovitz K, Abreu-Silva RS, Mingroni-Netto RC. Novel *OTOF* mutations in Brazilian patients with auditory neuropathy. *J. Hum. Genet*. 2009; 54(7):382-385.
100. Rouillon I, Marcolla A, Roux I, Marlin S, Feldmann D, Couderc R, Jonard L, Petit C, Denoyelle F, Garabédian EN, Loundon N. Results of cochlear implantation in two children with mutations in the *OTOF* gene. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006; 70(4):689-96.
101. Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V, Templin C, Leprevost D, Artières F, Lina G, Molinari N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Med Genet*. 2004; 5:5.
102. Roux AF, Faugère V, Le Guédard S, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Chambert S, Marlin S, Hamel C, Gilbert B, Malcolm S, Claustres M. Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J Med Genet*. 2006; 43:763-768.

- 103. Roux AF, Faugère V, Vaché C, Baux D, Besnard T, Léonard S, Blanchet C, Hamel C, Mondain M, Gilbert-Dussardier B, Edery P, Lacombe D, Bonneau D, Holder-Espinasse M, Ambrosetti U, Journal H, David A, Lina-Granade G, Malcolm S, Claustres M.** Four-year follow-up of diagnostic service in USH1 patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2011**; 52(7):4063-71.
- 104. Rozen S and Skaletsky HJ.** Primer 3 (1998). [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
- 105. Ruíz-Palmero L.** Hipoacusias infantiles causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas de la membrana tectoria y el paquete de estereocilios. Tesis doctoral. **2012**.
- 106. Salas A, Jaime JC, Alvarez-Iglesias V, Carracedo A.** Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina. *J. Hum. Genet.* **2008**; 53: 662-674.
- 107. Sakaguchi H, Tokita J, Müller U and Kachar B.** Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* **2009**; 17(5): 388-393.
- 108. Samanich J, Lowes C, Burk R, Shanske S, Lu J, Shanske A, Morrow BE et al.** Mutations in *GJB2*, *GJB6*, and mitochondrial DNA are rare in African American and Caribbean Hispanic individuals with hearing impairment. *Am. J. Med. Genet.* **2007**; 143A(8): 830-838.
- 109. Sanger F, Coulson AR.** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* **1975**; 94(3):441-448.
- 110. Santos, R. L., Wajid, M., Pham, T. L., Hussan, J., Ali, G., Ahmad, W., Leal, S. M.** Low prevalence of Connexin 26 (*GJB2*) variants in Pakistani families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Clin Genet.* **2005**; 67:61-68.
- 111. Schwander M, Kachar B, Müller U.** The cell biology of hearing. *The Journal of Cell Biology.* **2010**; 190 (1): 9-20.
- 112. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srisailapathy CR, Rosengren S S, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ,**

- Sheffield VC.** Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Hum. Mutat.* **1998**; 11:387–394.
- 113. Seeman P, Sakmaryová I.** High prevalence of the IVS 1 + 1 G to A/*GJB2* mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of *GJB2*. *Clin Genet.* **2006**; 69(5):410-413.
- 114. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola J, 2nd, Scherer S, Scheetz TE and Smith RJ.** Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**; 107(49):21104-9.
- 115. Sirmaci A, Duman DA, Tekin M.** The IVS1+1G>A mutation in the *GJB2* genr is prevalent and large deletions involving the *GJB6* gene are not present in the Turkish population. *Journal of Genetics.***2006**; 85:213-216.
- 116. Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Ploski R, Murgia A, Orzan E, Castorina P, Ambrosetti U, Nowakowska-Szyrwinska E, Bal J, Wiszniewski W, Janecke AR, Nekahm-Heis D, Seeman P, Bendova O, Kenna MA, Frangulov A, Rehm HL, Tekin M, Incesulu A, Dahl HH, du Sart D, Jenkins L, Lucas D, Bitner-Glindzicz M, Avraham KB, Brownstein Z, del Castillo I, Moreno F, Blin N, Pfister M, Sziklai I, Toth T, Kelley PM, Cohn ES, Van Maldergem L, Hilbert P, Roux AF, Mondain M, Hoefsloot LH, Cremers CW, Löppönen T, Löppönen H, Parving A, Gronskov K, Schrijver I, Roberson J, Gualandi F, Martini A, Lina-Granade G, Pallares-Ruiz N, Correia C, Fialho G, Cryns K, Hilgert N, Van de Heyning P, Nishimura CJ, Smith RJ, Van Camp G.** *GJB2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet.* **2005**; 77(6):945-57.
- 117. Sohl G, Willecke K.** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* **2004**; 62, 228-232.
- 118. Starr A, Picton TW, Sininger YS, Hood LJ, Berlin CL.** Auditory neuropathy. *Brain.***1996**; 119: 741-753.
- 119. Starr A, Sininger TS, Pratt H.** The varieties of auditory neuropathy. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **2000**; 11: 215-230.



120. Strenzke N, Chanda S, Kopp-Scheinpflug C, Khimich D, Reim K, Bulankina AV, Neef A, Wolf F, Brose N, Xu-Friedman MA, Moser T. Complexin-I is required for high-fidelity transmission at the endbulb of held auditory synapse. *J. Neurosci.* **2009**; 29(25): 7991–8004.
121. Tekin M, Arnos KS, Pandya S. Advance in hereditary deafness. *Lancet.* **2001**; 358: 1082-1090.
122. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G., Ghanbari A, Baserer N, Yuksel Apak M, Wollnik B. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet.* **2003**; 64: 65-69.
123. Varga R, Kelley PM, Keats BJ, Starr A, Leal SM, Cohn E, Kimberling WJ. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (*OTOF*) gene. *J. Med. Genet.* **2003**; 40: 45–50.
124. Varga R, Avenarius MR, Kelley PM, Keats BJ, Berlin CI, Hood LJ, Morlet TG, Brashears SM, Starr A, Cohn ES, Smith RJ, Kimberling WJ. *OTOF* mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J. Med. Genet.* **2006**; 43: 576–581.
125. Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovici M, Hutchin TP, Del Castillo I, Nouaille S, Blanchard S, Laine S, Popot JL, Moreno F, Mueller RF, Petit C. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause nonsyndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet.* **2001**; 29:345-349.
126. Verpy E, Weil D, Leibovici M, Goodyear RJ, Hamard G, Houdon C, Lefevre GM, Hardelin JP, Richardson GP, Avan P, Petit C. Stereocilin-deficient mice reveal the origin of cochlear waveform distortions. *Nature.* **2008**; 456, 255-258.
127. Verpy E, Leibovici M, Michalski N, Goodyear RJ, Houdon C, Weil D, Richardson G, Petit C. Stereocilin connects outer-hair-cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J Comp Neurol.* **2011**; 519(2): 194–210.
128. Villamar M, del Castillo I, Valle N, Romero L, Moreno F. Deafness locus DFNB16 is located on chromosome 15q13-q21 within a 5-cM interval flanked by markers D15S994 and D15S132. *Am J Hum Genet.* **1999**; 64:1238-1241.

129. Wattenhofer M, Reymond A, Falcicola V, Charollais A, Caille D, Borel C, Lyle R, Estivill X, Petersen MB, Meda P, Antonarakis SE. Different mechanisms preclude mutant CLDN14 proteins from forming tight junctions in vitro. *Hum Mutat.* **2005**; 25:543–549.
130. Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfenbein J, Murgia A, Birkenhäger R, Bolz H, Da Silva-Costa SM, Del Castillo I, Haaf T, Hoefsloot L, Kremer H, Kubisch C, Le Marechal C, Pandya A, Sartorato EL, Schneider E, Van Camp G, Wuyts W, Smith RJ, Friderici KH. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression. *Clin Genet.* **2010**; 78:267–74.
131. Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat.* **2008**; 29(1):6-13
132. Yan D, Park HJ, Ouyang X, Pandya A, Doi K, Erdenetungalag R, Du LL, Matsushiro N, Nance WE, Griffith AJ, Liu XZ. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of *GJB2* (connexin 26) in East Asians. *Hum. Genet.* **2003**; 114: 44-50.
133. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A mutation in *OTOF*, encoding otoferlin, a *FER-1*-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat. Genet.* **1999**; 21: 363–369.
134. Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S, Smith T N, Friedman T B, Lalwani A K, Wilcox ER, Petit C. *Otof* encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**; 67: 591-600.
135. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Monica M D, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Mol. Genet.* **1997**; 6:1605-1609.

136. Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N, Kahrizi K, Zanganeh M, Lohr NJ, Mohseni M, Mojahedi F, Daneshi A, Najmabadi H, Smith RJ. Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet.* 2007; 44:233–40.
137. Zody MC, Garber M, Sharpe T, Young SK, Rowen L, O'Neill K, Whittaker CA, Kamal M, Chang JL, Cuomo CA, Dewar K, FitzGerald MG, Kodira CD, Madan A, Qin S, Yang X, Abbasi N, Abouelleil A, Arachchi HM, Baradarani L, Birditt B, Bloom S, Bloom T, Borowsky ML, Burke J, Butler J, Cook A, DeArellano K, DeCaprio D, Dorris L 3rd, Dors M, Eichler EE, Engels R, Fahey J, Fleetwood P, Friedman C, Gearin G, Hall JL, Hensley G, Johnson E, Jones C, Kamat A, Kaur A, Locke DP, Madan A, Munson G, Jaffe DB, Lui A, Macdonald P, Mauceli E, Naylor JW, Nesbitt R, Nicol R, O'Leary SB, Ratcliffe A, Rounsley S, She X, Sneddon KM, Stewart S, Sougnez C, Stone SM, Topham K, Vincent D, Wang S, Zimmer AR, Birren BW, Hood L, Lander ES, Nusbaum C. "Analysis of the DNA sequence and duplication history of human chromosome 15.". *Nature.* 2006; 440 (7084): 671–675.

### Páginas de internet

- Dirección de Estadística e Información de salud. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. URL : [www.deis.com.ar](http://www.deis.com.ar).
- *Connexins and deafness Homepage*. <http://davinci.crg.es/deafness>
- *Hereditary Hearing Loss Homepage*: <http://hereditaryhearingloss.org>
- *Cyrillic 2.02*: <http://www.cyrillicsoftware.com>).
- *Primer.3*: [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)
- *FinchTV v1.4* (Perkin Elmer):<http://www.geospiza.com>
- *ClustalW2*: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- *ConSeq*: <http://conseq.tau.ac.il/>
- *ConSurf*: <http://consurf.tau.ac.il/>
- <http://cuerpohumanocuerpo.blogspot.com.es>
- [http://anatomiadeloideo.blogspot.com.es/2010\\_04\\_01\\_archive.html](http://anatomiadeloideo.blogspot.com.es/2010_04_01_archive.html)
- [www.cochlea.org](http://www.cochlea.org)
- *Mutalyzer*: <http://mutalyzer.nl>
- <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>
- *SIFT*: <http://sift.jcvi.org>

## **ARTÍCULOS**

**Artículos firmados por el doctorando, derivados de este trabajo de Tesis**

- **Charaf-Hasbani SR**, Rodríguez-Ballesteros M, Moreno F, Segovia M, del Castillo I.  
Four novel mutations in the gene encoding otoferlin in Argentinean families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. Manuscrito en preparación.
- Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, **Charaf-Hasbani SR**, Gandía M, Domínguez M, Gómez-Rosas E, Segovia M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I.  
The *OTOF* gene encoding otoferlin: review of mutations causing non-syndromic hearing impairment and auditory neuropathy, and development of a locus-specific database. Manuscrito en preparación, comisionado por la revista *Human Mutation* como Mutation Update article.
- **Charaf-Hasbani SR**, Moreno F, Segovia M, del Castillo I.  
Molecular screening of the *GJB2* and *GJB6* genes in a cohort of Argentinean patients with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. Manuscrito en preparación.
- Ruiz-Palmero L, Gandía M, **Charaf-Hasbani SR**, 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 its pseudogene. Manuscrito en preparación.