

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Análisis genético del locus DFNB1 en individuos ecuatorianos con  
hipoacusia no sindrómica recesiva**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado**

**en Ciencias Biológicas**

**DOYLE EDMOND BEATY III HERRERA**

**Quito, 2014**

*A mi familia y amigos*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mis padres, Doyle y Alba, por su apoyo, amor, paciencia y confianza, siempre estuvieron ahí para mí. Si no fuese por ellos no habría podido seguir esta carrera.

Un agradecimiento especial a mi tía Rocío por su infinita bondad y cariño. También a mi hermano Paul y el resto de mi familia, abuelos, tíos y primos, por brindarme su sabiduría y amor.

Al Dr. Jaime Costales Cordero por su orientación y apoyo a lo largo de la carrera; además por la dirección en la elaboración de esta investigación.

Al Dr. Cesar Paz y Miño por darme la posibilidad de trabajar y realizar mi estudio en su laboratorio. De igual manera quiero agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio por enseñarme la práctica del laboratorio y por brindarme su amistad.

A Gaby Jaramillo por sus consejos e ideas para realizar este estudio.

Agradezco a todas las personas que haya conocido y que hayan compartido su tiempo conmigo a lo largo de la carrera.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDOS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE ANEXOS .....	xi
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Hipoacusia: definición y clasificación .....	5
3.2 Epidemiología.....	5
3.3 Anatomía y fisiología del oído.....	7
3.4 Etiología.....	9
3.5 Conexina 26 y 30 .....	10
3.6 <i>GJB2</i> .....	13
3.7 <i>GJB6</i> .....	14
3.8 Justificación del estudio .....	15
3.9 Objetivos.....	16
3.9.1 Específicos .....	16
3.9.2 Generales .....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18

4.1 Población de estudio .....	18
4.1.1 Grupo de individuos afectos .....	18
4.1.2 Grupo de individuos sanos .....	19
4.1.3 Grupo de individuos familiares .....	20
4.1.4 Aspectos éticos y consentimiento informado .....	20
4.1.5 Datos clínicos.....	20
4.1.6 Muestras .....	21
4.2 Extracción y cuantificación del material genético .....	21
4.3 Diseño de iniciadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de secuenciación .....	22
4.3.1 Diseño de iniciadores para el gen <i>GJB2</i> .....	22
4.3.2 Diseño de iniciadores para el gen <i>GJB6</i> .....	23
4.4 Estandarización de PCR para el exón 2, gen <i>GJB2</i> .....	23
4.4.1 Estandarización de PCR para la delección del( <i>GJB6</i> -d13s1830), gen <i>GJB6</i> .....	24
4.5 Genotipificación del gen <i>GJB2</i> .....	25
4.5.1 Genotipificación de la delección del( <i>GJB6</i> -d13s1830).....	26
4.6 Análisis estructural de la conexina 26 .....	26
4.7 Cálculo de frecuencias .....	26
4.8 Determinación de la patogenicidad.....	27
5. RESULTADOS .....	28
5.1 Estadísticas descriptivas de la población de estudio.....	28
5.2 Resultados de los análisis genéticos .....	29
5.3 Mutaciones del gen <i>GJB2</i> .....	30

5.4 Frecuencias .....	32
5.5 Frecuencias genotípicas y alélicas .....	33
5.6 Números de afectos, sanos y familiares con cada genotipo .....	34
5.7 Genotipos y grado de hipoacusia .....	36
5.8 La delección del( <i>GJB6</i> -D13S1830) del gen <i>GJB6</i> .....	38
6. DISCUSIÓN.....	39
7. CONCLUSIÓN .....	53
8. LITERATURA CITADA.....	55
9. FIGURAS .....	66
10. TABLAS.....	77
11. ANEXOS .....	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Causas de sordera.....	67
Figura 2. Ubicación del exón 2 del gen <i>GJB2</i> en el cromosoma 13 .....	68
Figura 3. Amplificación del gen <i>GJB2</i> mediante PCR .....	69
Figura 4. La estructura tridimensional de la Cx26 a 3,5 Angstrom .....	70
Figura 5. Esquema representativa de los aminoácidos que componen la conexina 26 .....	71
Figura 6. Resultados de la PCR multiplex para la detección de la delección del( <i>GJB6</i> - D13S1830).....	72
Figura 7. Imágenes de las secuencias de cada variación alélica presentados por Seq Scape v2.6 de Applied Biosystems, (a) Q7X, (b) 35delG, (c) V27I, (d) R32L, (e) W77R, (f) R143W, (g) S199F, (h) N206S .....	73

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos generales sobre los afectos de la población de estudio .....	78
Tabla 2. Número de afectos con mutaciones patogénicas en el locus DFNB1A (bialélica o monoalélica), en el locus DFNB1B (del( <i>GJB6</i> -D13S1830)) y sin mutaciones en el locus DFNB1 .....	79
Tabla 3. Descripción de cada una de las mutaciones y sus frecuencias .....	80
Tabla 4. Las frecuencias genotípicas de los afectos (Afct), sanos (San), familiares (Fam) y de los tres grupos juntos (Todos) para cada mutación, y las frecuencias alélicas de los afectos, sanos, familiares y todos. Se incluye el valor p del equilibrio Hardy-Weinberg para cada mutación de todos los individuos .....	82
Tabla 5. Número de afectos, sanos y familiares con cada genotipo. ....	83
Tabla 6. Tabla comparativa de los 14 genotipos con al menos un alelo patogénico .....	84

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Corte transversal de una sección de la cóclea.....	85
Anexo 2. Imagen detallada de los estereocilios.....	86
Anexo 3. Localización de las conexinas 26 y 30 en la cóclea.....	87
Anexo 4. Ubicación del gen <i>GJB6</i> y región afectada por del( <i>GJB6</i> -D13S1830) .....	88
Anexo 5. Base de datos, incluye información tomada de las fichas médicas de los individuos del grupo afectos (A#) junto con información referente de los parientes (F#) de los mismos y la representación de los genotipos de ambos grupos referente al gen <i>GJB2</i> (a). HN representa hipoacusia neurosensorial. Presentación del genotipo para cada uno de los individuos sanos (S#) no emparentados con los casos (b) .....	89
Anexo 6. Copia de la declaración del consentimiento informado .....	98
Anexo 7. Copia de la ficha médica para cada paciente .....	99
Anexo 8. Iniciadores para la detección de los genes (a) <i>GJB2</i> y (b) del( <i>GJB6</i> -D13S1830) del gen <i>GJB6</i> .....	100
Anexo 9. Volúmenes y concentraciones para la PCR del gen <i>GJB2</i> .....	101
Anexo 10. Volúmenes y concentraciones para la PCR de la delección del( <i>GJB6</i> -D13S1830). .....	102

## 1. RESUMEN

Se ha estimado que el 60% de casos con hipoacusia se dan por factores genéticos; dentro de los factores genéticos, la hipoacusia no sindrómica recesiva es la forma más común de hipoacusia hereditaria. Debido a esto, se decidió realizar un análisis genético del locus DFNB1 con muestras tomadas de diferentes provincias del Ecuador.

En este estudio únicamente se encontraron mutaciones en el gen *GJB2* locus DFNB1A. Ningún individuo de la población total tenía la delección del(*GJB6*-D13S1830) del locus DFNB1B. Las siete mutaciones patogénicas halladas en este estudio fueron: Q7X (C19T), 35delG, V27I (G79A), R32L (G95T), W77R (T229C), R143W (C427T), S199F (C596T) y N206S (A617G); además de estas, se identificó al polimorfismo no patogénico V27I.

Considerando todas las variaciones, en la población de estudio se encontró un total de 104 alelos mutados (estos vienen hacer los alelos totales). La variación más común en la población total fue el polimorfismo benigno V27I, del cual se encontraron 61 alelos, equivalente al 58,9% del total de los alelos mutados detectados en los loci estudiados (alelos totales). La segunda variación más común fue Q7X, presente en el 18,3% (19 alelos) de los alelos totales. Al considerar únicamente las mutaciones patogénicas (todas excepcionando V27I), Q7X viene a ser la más común.

Dieciséis genotipos fueron hallados en los individuos afectos (aquellos que sufren de hipoacusia), sanos y familiares (parientes de los afectos). Entre los individuos afectos se encontraron 13 individuos en heterocigosis compuesto con dos mutaciones patogénicas. El genotipo Q7X/V27I/R32L, el más común, se encontró en cuatro individuos afectos.

Este análisis genético permitió la identificación de ocho variaciones alélicas del gen *GJB2* y, posteriormente, relacionar la clínica de 13 de los 26 individuos afectados con genotipos homocigoto recesivos o heterocigoto compuestos con dos mutaciones patogénicas. Se confirma que la mutación Q7X provoca hipoacusia no sindrómica y no hipoacusia sindrómica como previamente sugerido. Al considerar lo común que resultó ser la mutación Q7X existe la posibilidad que sea una mutación predominante en la población ecuatoriana; sin embargo, existe la necesidad de ampliar el estudio para poder definir con mayor certeza cuan fuerte es la presencia de la mutación Q7X, y de las demás, en la población ecuatoriana.

**Palabras clave:** DFNB1, *GJB2*, *GJB6*, unión de tipo hendidura, heterocigosis compuesta, penetrancia incompleta.

## 2. ABSTRACT

It has been estimated that 60% of hearing loss cases are caused by genetic factors; of these cases, the recessive non-syndromic form of hearing loss is the most common. Because of this, a genetic analysis of the locus DFNB1 with samples taken from different provinces of Ecuador was proposed.

In this study only mutations in the *GJB2* gene, locus DFNB1A, were found. No individual of the population sample had the del(*GJB6*-D13S1830) deletion in the *GJB6* gene, locus DFNB1B. The seven pathogenic mutations found in this study were: Q7X (C19T), 35delG, V27I (G79A), R32L (G95T), W77R (T229C), R143W (C427T), S199F (C596T) and N206S (A617G); in addition to these the non-pathogenic polymorphism V27I was also identified.

Considering all variations found in this sample study a total of 104 mutant alleles were identified (these are considered to be total alleles). The most common variation in the study sample was the benign polymorphism V27I, of which 61 alleles were found, equivalent to 58.9% of all detected alleles (total alleles). The second most common mutation, Q7X, was present at a frequency of 18.3% (19 alleles) of the total alleles. When considering only the pathogenic mutations it becomes the most common one.

The 16 genotypes found belonged to the three groups distinguished (affected, healthy and relatives) in this study. In the affected group, 13 individuals were found to be compound heterozygotes for two pathogenic mutations. The Q7X/V27I/R32L genotype, the most common one, was found in four individuals.

This genetic analysis allowed the identification of eight *GJB2* allelic variations, and subsequently link the clinical diagnosis of 13 of the 26 affected individuals with either homozygous recessive genotypes or heterozygous compound genotypes with two pathogenic mutations. We confirmed that the mutation causes non-syndromic hearing loss and does not produce a form syndromic deafness as previously suggested. When considering how common the mutation Q7X proved to be, there exists the possibility that it is a predominant mutation in the Ecuadorian population. There is, however, a need to extend this study in order to define with greater certainty how strong the presence of the Q7X mutation, and the other mutations in the *GJB2* gene, are in the Ecuadorian population.

**Keywords:** DFNB1, *GJB2*, *GJB6*, Gap junction, compound heterozygosity, incomplete penetrance.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 HIPOACUSIA: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

La hipoacusia se define como “la incapacidad de escuchar frecuencias específicas a intensidades apropiadas”; funcionalmente, se la ha definido como “una discapacidad auditiva suficientemente severa como para invalidar el procesamiento lingüístico a través de la audición de un individuo” (Elzouki *et al.*, 2012). Para determinar el nivel de agudeza auditiva se mide la cantidad de energía (dB) que un individuo requiere para detectar sonidos desde los 250 hasta los 8,000 hertz (Hz) (Elzouki *et al.*, 2012). En niños la audición normal se encuentra debajo de los 20 dB, por lo tanto el grado de hipoacusia se clasifica como: leve (umbral entre 20 – 40 dB), moderada (41 – 54 dB), moderada-severa (50 – 70 dB), severa (71 – 90) o profunda (>90 dB) (Elzouki *et al.*, 2012).

#### 3.2 EPIDEMIOLOGÍA

En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>) publicó nuevas estimaciones llevadas a cabo en 42 poblaciones hasta el año 2010; sus resultados indican que 360 millones de personas mundialmente (alrededor del 5,3% de la población mundial) padecen de sordera. Este dato, sin embargo, no distingue entre las diferentes formas de sordera: ambiental o genética.

La hipoacusia ambiental, también conocida como hipoacusia adquirida se origina debido a enfermedades infecciosas tales como la rubéola, citomegalovirus, meningitis,

sarampión y las paperas, no solo en la infancia, sino también después de ella. La hipoacusia además puede ocurrir por infección crónica del oído, por acumulación de líquido (otitis media); por el uso de fármacos ototóxicos, tales como algunos antibióticos y medicamentos contra la malaria; por traumatismo craneal o por una lesión; por la edad avanzada del individuo (presbiacusia); por exposición a ruido excesivo o por cera o cuerpos extraños que pueden bloquear el canal auditivo (Petit *et al.*, 2001; Irwin, 2006; Farpón y Bañales, 2011). Siendo las estas las causas ambientales más comunes cuando la hipoacusia se presenta, en su ausencia, se asume que el origen de la misma se debe a la hipoacusia sindrómica, la cual viene acompañada con deformaciones físicas en oído externo y/o en otros órganos (Elzouki *et al.*, 2012). Se han encontrado alrededor de 400 síndromes con hipoacusia aunque, en su mayoría, estos casos tienen hipoacusia leve o inclusive no la tienen (Farpón y Bañales, 2011). Si en la exploración física del paciente no se encontró ninguna deformación física se clasifica a la condición como hipoacusia no sindrómica (HNS). Ésta, a diferencia de su forma sindrómica, aparece sin la presencia de otro síntoma o deformación (Farpón y Bañales, 2011).

La hipoacusia es considerada la deficiencia sensorial más frecuente (Marlin *et al.*, 2005); cada año alrededor de uno de cada 1000 niños nace con discapacidad auditiva pre-lingual (persona que nace con sordera o la adquiere antes de poder hablar) (Yasunaga *et al.*, 1999; Kenneson *et al.*, 2002; Cordeiro-Silva *et al.*, 2010). Se ha estimado que alrededor del 60% de estos casos se deben a factores genéticos mientras que el 40% restante se originan por causas ambientales (Farpón y Bañales, 2011). Entre los individuos afectados por causas genéticas, el 70% presenta la forma no sindrómica de la enfermedad, esto quiere decir que no se presentan otros síntomas médicos junto con la hipoacusia; sin embargo, dentro de los individuos no sindrómicos el 80% sigue un patrón de herencia autosómica recesiva (Farpón y

Bañales, 2011) por lo que la hipoacusia no sindrómica recesiva (HNSR) es la forma más común de hipoacusia hereditaria (Figura 1).

### **3.3 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL OÍDO**

Para entender cómo la HNSR llega a afectar la audición, es necesario comprender el funcionamiento del oído. Las tres partes principales del oído son: el oído externo, el medio y el interno. Las vibraciones del sonido inician su viaje en el oído externo, donde son capturadas por el pabellón auricular; pasan al canal auditivo y viajan a través de éste hasta la membrana timpánica, donde se acumulan en la membrana timpánica antes de ser transmitidas por el oído medio hasta el líquido del oído interno a través de la ventana oval (Irwin, 2006).

El oído interno está formado por la cóclea y el sistema vestibular. La cóclea, comúnmente llamada caracol, por su forma espiralada, es el órgano sensorial auditivo del oído. Este órgano es el lugar en donde se da lugar a la transducción y se generan impulsos neuroquímicos que viajan por el nervio vestibulococlear (octavo nervio craneal) hasta el cerebro. Como en los demás mamíferos, la cóclea en el humano está dividida en tres segmentos (Anexo 1): desde arriba, la rampa vestibular, media y timpánica. La rampa media contiene endolinfa mientras que las otras dos contienen perilinfa (Irwin, 2006).

La rampa media está compuesta por la membrana de Reissner, en la parte superior; por la membrana basilar, en la parte inferior; y por la estría vascular, en la parte lateral del triángulo. La estría vascular está localizada sobre la pared ósea de la cóclea. Montado sobre la membrana basilar y debajo de la membrana tectoria se encuentra el órgano de Corti (Anexo 1) (Irwin, 2006).

El órgano de Corti contiene células ciliadas ordenadas en una fila, denominada células internas, y otras en tres filas denominadas células externas (Anexo 1) (Irwin, 2006). Sobre cada célula ciliada existen estereocilios, pequeñas células compuestas de actina que son las estructuras mecanorreceptoras de las células ciliadas (Petit *et al.*, 2001), donde ocurre la transducción del sonido. Los estereocilios, a veces llamados microvellosidades, siempre están en forma de escalera, donde la punta de cada estereocilio está unida a la parte lateral del estereocilio vecino, el cual es más alto, mediante un enlace de punta (“tip link”) (Anexo 2) (Petit *et al.*, 2001). Los estereocilios y las partes apicales de las células ciliadas al estar separadas de las bases de las células ciliadas, por la membrana reticular, hace que los estereocilios, incluyendo las partes apicales de las células ciliadas, se encuentren embebidos en un líquido diferente al que las bases de las células, endolinfa y perilinfa respectivamente. (Petit *et al.*, 2001).

Las vibraciones, al llegar al oído interno, producen olas líquidas, las cuales mueven la membrana basilar y empujan las células ciliadas contra la membrana tectoria (Petit *et al.*, 2001). Las células ciliadas, al ser empujadas contra la membrana tectoria, doblan los estereocilios produciendo tensión sobre los enlaces de punta (canales catiónicos de mecanotransducción), y provocan la apertura de los mismos (Eisen y Ryugo, 2007). Las superficies basolaterales de las células ciliadas están rodeadas de perilinfa, líquido con concentración iónica similar a la del líquido extracelular; mientras que partes apicales de las células y los estereocilios están sumergidas en endolinfa, líquido que asemeja las condiciones iónicas intracelulares (concentraciones altas de iones de potasio,  $K^+$ , y bajas de iones de sodio,  $Na^+$ ) (Gerido y White, 2004). Estas condiciones son los factores que permiten que el sonido estimule la apertura de los enlaces de punta y despolaricen a las células ciliadas (Petit *et al.*,

2001; Martínez *et al.*, 2009). El influjo de iones de  $K^+$ , con un potencial total de aproximadamente 150 mV, desde la endolinfa hacia la perilinfa, a través de las células ciliadas al abrirse los enlaces de punta, despolariza, con gran fuerza iónica, a las mismas (Petit *et al.*, 2001). Aquella despolarización de las células ciliadas permite que suceda la transducción mecanoeléctrica del sonido, la cual envía una señal eléctrica mediante el nervio vestibulococlear hasta el cerebro (Irwin, 2006).

### 3.4 ETIOLOGÍA

La hipoacusia puede ser clasificada como conductiva, neurosensorial o mixta; esta clasificación hace referencia a la sección anatómica del oído afectada (Farpón y Bañales, 2011; Elzouki *et al.*, 2012). Sordera conductiva se refiere a una interrupción mecánica en la parte externa o media del oído durante la transmisión del sonido. La sordera neurosensorial ocurre cuando, en el oído interno, las células ciliadas no transmiten estos impulsos neurales previamente mencionados al nervio vestibulococlear (Elzouki *et al.*, 2012). La sordera mixta involucra sordera conductiva y neurosensorial simultáneamente y, por lo general, va acompañada de daños estructurales al oído medio e interno (Elzouki *et al.*, 2012). Generalmente, la HNSR suele ser de tipo neurosensorial, debido a las funciones de los genes involucrados.

Hasta la fecha, se han descubierto alrededor de 50 genes relacionados con la HNSR (Farpón y Bañales, 2011). A pesar de esta gran variedad de genes, la mayoría de las mutaciones suceden en un solo locus: DFNB1, donde se han encontrado dos genes, *GJB2* (Gap Junction Beta-2; localizado en el locus DFNB1A) y *GJB6* (Gap Junction Beta-6;

localizado en el locus DFNB1B). Este locus (DFNB1) por sí solo es responsable del 50% de las deficiencias auditivas recesivas (Wu *et al.*, 2003; Del Castillo *et al.*, 2005; Tamayo *et al.*, 2009; Zoidl y Dermietzel, 2010); Farpón y Bañales, 2011). Los diferentes loci relacionados con la hipoacusia no sindrómica, se designan con la abreviatura DFN (derivado de deafness, sordera en inglés); a continuación un número, el cual representa el orden cronológico de descubrimiento del loci; “cuando la clasificación es DFNB significa que la herencia sigue un patrón autosómico recesivo, DFNA representa un patrón autosómico dominante, mientras que DFNX representa transmisión ligada al cromosoma X” (Farpón y Bañales, 2011). El locus DFNB1 contiene ambos genes *GJB2* y *GJB6* por lo que se aumentó una letra más: DFNB1A representa la herencia autosómica recesiva del gen *GJB2* y DFNB1B representa la herencia autosómica recesiva del gen *GJB6* (Farpón y Bañales, 2011)

### 3.5 CONEXINA 26 Y 30

Las conexinas son una familia de proteínas integrales de la membrana plasmática expresadas en casi todas las formas de tejido y células del cuerpo (Sabag *et al.*, 2005; Zoidl y Dermietzel, 2010). En la membrana plasmática, grupos de seis conexinas se oligomerizan para formar un conexón; al juntarse dos conexones localizados en células adyacentes forman una unión de tipo hendidura (Gap junction), también conocida como unión gap (Sabag *et al.*, 2005). Estas uniones son conexiones intercelulares transmembranales, y por lo tanto “proporcionan vías directas entre células acopladas para compartir iones, nutrientes o metabolitos pequeños que a su vez sirven para el mantenimiento del equilibrio iónico”, homeostasis intracelular (Zoidl y Dermietzel, 2010). El gen *GJB2* codifica la conexina 26, una

proteína de 226 aminoácidos (Petit *et al.*, 2001) mientras que *GJB6* codifica la conexina 30, una proteína de 261 aminoácidos (Grifa *et al.*, 1999).

En la cóclea, las uniones de tipo hendidura pueden formarse en base a cuatro tipos de conexinas: Cx26 (gen *GJB2*), Cx30 (gen *GJB6*), Cx31 (gen *GJB3*) y Cx43 (gen *GJA1*) (Farpón y Bañales, 2011).

Como se mencionó anteriormente, las diferencias iónicas entre las rampas permite la despolarización de las células ciliadas, una de las hipótesis sobre las funciones de las conexinas 26 y 30 en la cóclea es que están involucradas el reciclaje de los iones  $K^+$ . Dicha hipótesis propone que el reciclaje comienza en las células de soporte y epiteliales, viaja a través de los fibrocitos del ligamento espiral y, eventualmente, llega a las células epiteliales de la estría vascular, por donde regresa a la endolinfa; este reciclaje es importante ya que evita la muerte celular y preserva la audición a través del mantenimiento del potencial endococlear (Gerido y White, 2004; Irwin, 2006; Eisen y Ryugo, 2007; Martínez *et al.*, 2009; Zoidl y Dermietzel, 2010). Se propuso que “la pérdida de la Cx26 evita dicho reciclaje y que la cantidad elevada de  $K^+$  en la perilinfa extracelular inhibe el influjo del neurotransmisor glutamato, el cual se acumula y resulta en muerte celular” (Zoidl y Dermietzel, 2010).

La evidencia principal para demostrar que las uniones gap proveen vías iónicas para mantener el potencial iónico de la endolinfa y por lo tanto la agudeza auditiva es el hecho de que durante el desarrollo coclear, el cual inicia al mismo tiempo que el desarrollo de los otros órganos sensoriales, alrededor de la cuarta semana en humanos, la formación inicial e incremento subsecuente de la cóclea coincide con el incremento en el número de uniones gap

en la estría vascular y con la generación inicial y aumento subsecuente del potencial endococlear (Gerido y White, 2004; Sabag *et al.*, 2005; Zoidl y Dermietzel, 2010).

Una prueba de cómo afecta la malformación de las conexinas en la hipoacusia se obtuvo de experimentos en los cuales se realizó una inactivación génica (gene knockout) de la Cx26 (*GJB2*) en la cóclea de ratones, sin afectar su expresión en otros órganos; el resultado fue el desarrollo normal de la cóclea (Gerido y White, 2004; Sabag *et al.*, 2005; Zoidl y Dermietzel, 2010). Se encontró, sin embargo, un incremento de muerte celular post-natal dentro de la cóclea, seguida por pérdida significativa de audición. Se vió, además, que esta muerte celular iniciaba cerca de las células ciliadas internas y coincidía con el inicio de la audición (Zoidl y Dermietzel, 2010). En su publicación Zoidl y Dermietzel (2010) establecen que si bien esta hipótesis sobre el rol de estas conexinas en la hipoacusia hereditaria suena muy convincente, no queda clara al considerar la Cx30.

La Cx30 se encuentra co-localizada con la Cx26 en la cóclea; a ambas se las han encontrado entre las células de soporte, en los fibrocitos del ligamento espiral y en el limbo espiral, siendo la Cx26 la más abundante de las dos (Sabag *et al.*, 2005; Zoidl y Dermietzel, 2010) (Anexo 3). En un estudio realizado por Teubner y colaboradores (2003), se estableció que el bloqueo del gen de la Cx30 (*GJB6*), al igual que el bloqueo del gen de la Cx26, produce ratones sordos, sin potencial endococlear; estos, al igual que los ratones sin la Cx26 no tienen daño mecánico o disfunción física en el oído interno; sin embargo, los ratones sin la Cx30 mantuvieron la concentración normal de iones de  $K^+$  de la endolinfa. Junto con la sordera se encontró, adicionalmente, un aumento de apoptosis dentro del epitelio de la cóclea. Se desconoce por qué la presencia de la Cx26, la cual mantiene el potencial de iones de  $K^+$ , no compensa la ausencia de la Cx30 y evita la sordera (Gerido y White, 2004; Zoidl y

Dermietzel, 2010). También se encontró que en ratones sin la Cx30, la expresión del mRNA de la Cx26 disminuía en las células circundantes a las células ciliadas externas y en la estría vascular (Anexo 3) (Ortolano *et al.*, 2008).

Estos hechos sugieren que las conexinas 26 y 30 tienen otros roles además del reciclaje de los iones de  $K^+$ . Esta idea tiene soporte en experimentos funcionales donde se encontró que las conductancias de las conexinas 26 y 30 son similares para los iones  $K^+$  pero difieren en cuanto a su permeabilidad a moléculas importantes aún desconocidas (Ahmad *et al.*, 2007). Es decir que “algún defecto en la Cx26 o la Cx30 no solo reduce la distribución de  $K^+$  intercelular sino que también altera la disponibilidad de otros solutos necesarios para la audición” (Ahmad *et al.*, 2007).

### 3.6 *GJB2*

El gen *GJB2* (Gap Junction Beta 2), localizado en el cromosoma 13 en la región q11-q12, contiene 2 exones aunque el exón 1 no se transcribe (Kiang *et al.*, 1997) (Figura 2 a, b y c). Debido a que *GJB2* es un gen relativamente pequeño, con una región codificante de 681 pares de bases (pb), en el exón 2 (Kenneson *et al.*, 2002), y también al creciente interés en la genética de la sordera, se ha logrado identificar más de cien mutaciones patogénicas únicamente en este gen (Farpón y Bañales, 2011). Estas mutaciones pueden ser con cambio de sentido, silenciosas, con cambio de marco, splicing, deleciones o inserciones (Zoidl y Dermietzel, 2010).

De todas las mutaciones que afectan al gen *GJB2*, la más conocida y caracterizada es la deleción 35delG; inclusive se ha determinado que al realizar un análisis genético, o un

tamizaje en recién nacidos ésta mutación obligatoriamente debe ser tomada en cuenta (Farpón y Bañales, 2011). El resultado del gran número de estudios con el gen de la conexina 26 fue la identificación de mutaciones relacionadas con la etnicidad y el origen de las poblaciones estudiadas; por ejemplo: 167delT es la mutación más común en la población judía asquenazí, 35delG se encuentra entre los caucásicos de ascendencia europea, 235delC en la población asiática (Rabionet *et al.*, 2000), W24X (G71A) en la población hindú (Mani *et al.*, 2009), R143W en Ghana (Brobbly *et al.*, 1998), V27I (G79A) en poblaciones hispánicas y asiáticas (Pandya *et al.*, 2003; Putcha *et al.*, 2007; Samanich *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2006), y S199F (C596T) en Bogotá, Colombia (Tamayo *et al.*, 2009).

### **3.7 GJB6**

Este gen, *GJB6*, (Gap Junction Protein Beta-6, por sus siglas en inglés), está compuesto de 786 pares de bases (pb) y pertenece al locus DFNB1B. La delección del(*GJB6*-D13S1830) se considera la segunda causa más frecuente de hipoacusia hereditaria pre-lingual en la población española y en otras que descienden de ésta (Cordeiro-Silva *et al.*, 2010; Farpón y Bañales, 2011). Esta mutación genera una delección estimada de 309 kilobases (kb) (Anexo 4) a la cual deja la Cx30 no funcional (Del Castillo *et al.*, 2005).

En el año 1996, Dahl y colaboradores clonaron, por primera vez, a la conexina 30 en ratones. Este gen no presenta intrones y codifica una proteína de 261 aminoácidos. Tres años después Grifa y colaboradores (1999) clonaron un fragmento de cADN homólogo de humano de la misma conexina; éste gen codifica, igualmente, una proteína de 261 aminoácidos, comparte 93% de homología con la conexina 30 del ratón y 76% de identidad con el gen *GJB2*

del humano. Mediante, análisis utilizando northern blot, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) e hibridación *in situ* (ISH, por sus siglas en inglés) se reveló que la expresión de *GJB6* se da en la tráquea, tiroides, cerebro y cóclea (Kelley *et al.*, 1999). Mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés), (Kelley *et al.*, 1999) determinó que el gen *GJB6* se ubica en el cromosoma 13 en la región q12 en humanos.

### **3.8 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

En el Ecuador la discapacidad auditiva representa el tercer tipo de discapacidad más común, sin tomar en cuenta discapacidades intelectuales. Está presente en alrededor de 33,828 habitantes, con una tasa de 2,3 por cada 1000 habitantes (datos previos a publicación, Vice presidencia de la República del Ecuador). Sin embargo este dato no diferencia entre individuos afectados por factores ambientales y hereditarios. Esto significa que, en nuestro país, las principales mutaciones causantes de la hipoacusia hereditaria no sindrómica recesiva y sus frecuencias continúan sin ser conocidas.

Dado que la HNSR causada por mutaciones en el locus *DFNB1* es la forma más común de sordera auditiva se realizará un análisis genético con el fin de tener una visión inicial sobre las mutaciones en la población ecuatoriana. Además, el estudio permitirá comparar genotipos entre individuos que sufren de HNSR (individuos afectos), individuos sanos y parientes de los individuos afectos (familiares) para determinar si existen diferencias con respecto a la presencia de cambios alélicos y afectación entre estos grupos.

Con los resultados se espera ganar una visión más clara sobre las mutaciones del gen *GJB2* que ocurren en el país, así como la frecuencia con la que la delección del(*GJB6*-D13S1830) del gen *GJB6* ocurre.

Más allá de los genes involucrados en este estudio, un análisis más completo, incluyendo los demás genes involucrados en la hipoacusia no sindrómica y sindrómica, sería útil al momento de diagnosticar las causas de las sorderas genéticas y determinar un tratamiento para cada paciente. Personas que sufren hipoacusia neurosensorial no sindrómica, que involucre los genes *GJB2* y/o *GJB6*, son candidatos para cirugía de implantación coclear. Se ha determinado que individuos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica en los genes *GJB2* y *GJB6* se benefician más de implantes cocleares (Green *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2003). Para pacientes afectados con mutaciones en otros genes que resultan en HNSR, existen otros tratamientos como audífonos auriculares o la intervención quirúrgica.

### **3.9 OBJETIVOS**

#### **3.9.1 GENERALES**

Conocer las frecuencias de las variaciones alélicas halladas en el gen *GJB2* y de la delección del(*GJB6*-D13S1830) en el gen *GJB6* en una muestra de la población ecuatoriana afectada con sordera no sindrómica recesiva.

### 3.9.2 ESPECÍFICOS

- 1.- Estandarizar el protocolo de amplificación mediante PCR y secuenciación para la detección de las variantes alélicas del exón 2 del gen *GJB2* en futuros análisis de tamizaje o diagnóstico genético.
- 2.- Determinar cuál es la mutación con mayor frecuencia en la población estudiada mediante el cálculo de porcentajes.
- 3.- Por medio el análisis de los árboles genealógicos, los datos clínicos y el análisis genético, relacionar la clínica de cada paciente con las mutaciones halladas en este estudio.
- 4.- Mediante la comparación con un grupo control, determinar si existen diferencias en cuanto a la presencia de las mutaciones entre los grupos de estudio y la producción de la afección.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Para este estudio, de tipo descriptivo, se reclutaron 54 individuos, tanto de sexo masculino como femenino, de edades comprendidas entre dos y 67 años y pertenecientes a 11 diferentes familias (clasificadas como F1, F2 etc., ver Anexo 5) afectadas por hipoacusia. Los 54 individuos se separaron en dos grupos: afectos (diagnosticados con hipoacusia) y familiares (parientes sin hipoacusia de los individuos del grupo afectos).

Adicionalmente, se incluyó un tercer grupo denominado sanos. Este grupo se compone de 57 individuos sin hipoacusia quienes no estuvieron emparentados con los primeros dos grupos. A pesar de la separación del grupo de comparación de los otros dos grupos, afectos y familiares, al mencionar a la población de estudio se suman los individuos de los tres grupos, afectos, sanos y familiares, y se los consideran un solo grupo. En total, la población analizada consistió de 111 individuos, de los cuales 26 son afectos, 57 son sanos y 28 son familiares de los individuos en el grupo afectos.

#### **4.1.1 GRUPO DE INDIVIDUOS AFECTOS**

Veintiún individuos fueron diagnosticados con hipoacusia no sindrómica de carácter recesivo (HNSR). Diecinueve tenían hipoacusia neurosensorial en ambos oídos, mientras que dos tenían hipoacusia mixta en un oído y neurosensorial en el otro. El tipo de hipoacusia (neurosensorial, conductiva o mixta) de cada individuo afecto se encuentra en el Anexo 5.

Adicionalmente, cinco individuos más fueron incluidos. Estos cinco individuos son parientes diagnosticados con hipoacusia de los 21 pacientes afectos pero fueron valorados fuera de este estudio, por lo que su tipo, clase (sindrómica o no sindrómica) y grado de severidad de hipoacusia no se conoce. Estos 26 individuos comprenden el grupo “afectos”, por ser individuos afectados por la condición.

Los participantes involucrados en este estudio fueron seleccionados por la Dr. Indira Proaño en el hospital de niños Baca Ortiz de acuerdo al siguiente criterio: aquellos individuos en cuya familia existan dos o más miembros afectados por hipoacusia de carácter hereditario; estos, además, debieron compartir el mismo patrón clínico de la enfermedad en una o dos generaciones, lo cual fue determinado mediante un árbol genealógico.

#### **4.1.2 GRUPO DE INDIVIDUOS SANOS**

Adicionalmente, se analizaron 57 individuos tomados al azar de la población ecuatoriana con el fin de compararlos con los otros dos grupos (afectos y familiares) y verificar la presencia o ausencia de variaciones patogénicas en este grupo. Este grupo, al no estar afectado por hipoacusia, vienen a ser el grupo control o de comparación. Las 57 muestras fueron adquiridas en el banco de muestras del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad de las Américas (UDLA), previa la firma del consentimiento informado. Para ser incluidos en el estudio los individuos debían cumplir con un único requisito, no tener antecedentes personales o familiares con hipoacusia.

### **4.1.3 GRUPO DE INDIVIDUOS FAMILIARES**

Sin embargo, no todos los participantes en la investigación presentaron hipoacusia. Para verificar el patrón de herencia de las mutaciones halladas en esta población de estudio, poder determinar la variación más común y calcular las frecuencias genóticas y alélicas de cada variación también se incluyó a 28 familiares (parientes sin hipoacusia de los afectos). Los 28 parientes fueron categorizados como “familiares”, ya que ninguno fue diagnosticado con hipoacusia; tampoco se los agrupó con los individuos sanos ya que son parientes de los afectos y, de acuerdo a la genética mendeliana, podrían ser portadores de las mutaciones relacionadas con la deficiencia.

### **4.1.4 ASPECTOS ÉTICOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Se obtuvo previo al análisis, el consentimiento informado de cada individuo que entregó una muestra. Una copia para cada sujeto se encuentra archivada en la base de datos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB-UDLA). El documento ha sido sometido a la declaración de Helsinki y fue aprobado por el Código de Ética Médica del Ecuador. El detalle del formulario utilizado en la declaración del consentimiento informado se encuentra en el Anexo 6.

### **4.1.5 DATOS CLÍNICOS**

Junto con el consentimiento informado y las muestras de sangre, se dispuso de las fichas médicas de 20 de los individuos afectos, esta información no se completó en el caso de

los seis parientes con hipoacusia, por lo que en varias variables fueron categorizados como n/a (información no disponible). Cada ficha médica contenía la información básica de cada paciente, edad, sexo, origen geográfico familiar, edad de inicio de la sordera, antecedentes familiares y estudios adicionales como los resultados de las audiometrías (estado clínico). Se obtuvo también el árbol genealógico familiar, como punto de partida, para el estudio de los 20 individuos agrupados como afectados, los otros seis afectados y los demás parientes están incluidos en cada árbol. Cada familia en el Anexo 5 fue clasificada según su correspondiente árbol.

#### **4.1.6 MUESTRAS**

La obtención de las muestras y la recolección de la información clínica, incluyendo la exploración física (para determinar la clase de hipoacusia, sindrómica o no sindrómica), y los estudios complementarios se realizó previamente, gracias a la ayuda de la Dr. Indira Proaño en el hospital de niños Baca Ortiz en colaboración con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y se nos facilitó una ficha médica (un ejemplo se encuentra en el Anexo 7).

De cada individuo participante (54 individuos de 11 diferentes familias y los 57 controles sanos), se obtuvieron 5 ml de sangre mediante punción de venas periféricas del brazo, utilizando tubos venoject<sup>®</sup> con EDTA.

## **4.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO**

La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial PureLink<sup>™</sup> Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Life Science Technologies, USA). Posteriormente, se determinó la

concentración de cada muestra utilizando el NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Se etiquetó cada una apropiadamente y se adjuntó a la base de datos según el siguiente criterio: en el caso del grupo de los afectos se escogió el código A, seguido de un número (e.g. A44); para el grupo de individuos sanos se utilizó la letra S y un número (e.g. S43); para el grupo denominado familiares se utilizó la letra F como código. Todas estas muestras fueron amplificadas mediante PCR antes de iniciar los procedimientos de genotipificación.

### **4.3 DISEÑO DE INICIADORES DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y DE SECUENCIACIÓN**

#### **4.3.1 DISEÑO DE INICIADORES PARA EL GEN *GJB2***

Se utilizó el software gratuito Primer 3 (disponible en <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para el diseño de los iniciadores de PCR para la amplificación y secuenciación del exón 2 del gen *GJB2*. La secuencia del gen *GJB2*, para el diseño de los iniciadores, se obtuvo mediante la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el código número (Gene ID) 2706. Los iniciadores utilizados fueron: sentido (Fw): 5' ACA CGT TCA AGA GGG TTT GG 3' y antisentido (Rv): 5' CCT CAT CCC TCT CAT GCT GT 3'. Los cuales daban como resultado un amplicón de 960 pb. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) y el porcentaje de GC de los iniciadores estuvieron dentro de los prerrequisitos y conforme el estándar preestablecido de Primer 3 (Anexo 8 a).

### 4.3.2 DISEÑO DE INICIADORES PARA EL GEN *GJB6*

Para la detección de la delección del(GJB6-D13S1830) se utilizaron tres iniciadores en una PCR multiplex (ver Anexo 8 b); los iniciadores fueron tomados a partir del método descrito por Del Castillo y colaboradores (2002) y estandarizado por Cordeiro-Silva y colaboradores (2010): Fw: 5' TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT 3', Rv1: 5' CAC CAT TGC GTA GCC TTA ACC ATT TT 3' y Rv2: 5' TCA TCG GGG GTG TCA ACA AACA 3'. Según Cordeiro-Silva y colaboradores (2010) la temperatura de anillamiento es 62°C, por lo que en este estudio se aplicó la misma temperatura.

### 4.4 ESTANDARIZACIÓN DE PCR PARA EL EXÓN 2, GEN *GJB2*

Para determinar la temperatura óptima de anillamiento se calculó el promedio de ambas temperaturas de disociación provistas por Primer 3 (60,01°C y 60,22°C); y, en base a este resultado (60,12°C) se procedió a diseñar un programa de PCR en el termociclador Multigene™ Gradient Therma 1 Cyclor (Labnet International, Inc) con gradiente de temperatura 5°C por arriba y 5°C por debajo de la temperatura teóricamente óptima (es decir que el gradiente se realizó desde 55°C – 65°C). La temperatura de anillamiento una vez estandarizada fue de 58,5°C. La verificación de la amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. El volumen final por reacción de PCR fue de 25 µl, la cual estuvo compuesta por ADN genómico a una concentración de 5 ng/µl, tampón de PCR 10X a una concentración final de 1,5X (composición: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1,5 mM, solución de dNTPs (deoxinucleótido trifosfato) a una concentración final de 0,5 uM de cada uno de ellos (dATP, dGTP, dNTP y

dCTP), cada iniciador a una concentración final de 0,4  $\mu$ M, y Taq Polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) a una concentración final de 1 U/ $\mu$ l (Anexo 9). El programa para el termociclador comenzó con una denaturación inicial a 95°C por 9 minutos y 30 segundos, seguido por 35 ciclos: denaturación a 95°C por 50 segundos, anillamiento a 58,5°C por 50 segundos y elongación a 72°C por 50 segundos; y una elongación final a 72°C por 6 minutos y 30 segundos.

#### **4.4.1 ESTANDARIZACIÓN DE PCR PARA LA DELECIÓN del(*GJB6-D13S1830*), GEN *GJB6***

La detección de la delección del(*GJB6-d13S1830*) fue posible mediante PCR multiplex usando los tres iniciadores (f, rv1 y rv2) mencionados anteriormente. La amplificación de todas las muestras se realizó en el termociclador Surecyclor 8800 (Agilent Technologies) a 62°C, descrito por Cordeiro-Silva y colaboradores (2010) (Ver 4.5.1). El volumen final de PCR por reacción fue 25  $\mu$ l, la cual estuvo compuesta por la misma concentración de ADN genómico, tampón de PCR y de MgCl<sub>2</sub> que en la reacción de amplificación del gen *GJB2*; se utilizó, sin embargo, dNTPs a una concentración final de 0,4 mM, cada uno de los iniciadores a una concentración final de 0,25  $\mu$ M y Taq Polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, USA) a una concentración final de 1 U/ $\mu$ l (Anexo 10) para la amplificación y detección de esta delección. El programa utilizado comenzó con una denaturación inicial de 94°C por 7 minutos y 30 segundos; seguido por 35 ciclos de: denaturación a 94°C por 40 segundos, anillamiento 62°C por 40 segundos, y una etapa de elongación a 72°C por 40 segundos, antes de finalizar con un ciclo final de elongación a 72°C por 4 minutos y 30 segundos.

#### 4.5 GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN *GJB2*

Una vez estandarizado el programa de PCR, la amplificación de cada fragmento fue luego verificada en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Se registraron fotográficamente todas las amplificaciones.

Los amplicones fueron, posteriormente, purificados utilizando el kit comercial Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP (Beckman Coulter, Alemania) siguiendo el protocolo estándar. Para verificar la pureza del amplicón se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. El ADN purificado fue sometido a una reacción de secuenciación con el kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) bajo las concentraciones propuestas por el fabricante. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, buffer 1x, 1 µl del BigDye Terminator 3.1 y 3 µl del amplicón. Se realizó una reacción por cada iniciador a una concentración de 1,0 pM. El programa estándar para la PCR de secuenciación consiste de una denaturación inicial a 96°C por 3 minutos, seguido por 25 ciclos de: denaturación a 96°C por 10 s.; anillamiento a 50,5°C por 5 s.; y elongación a 60°C por 4 min. El producto de la reacción fue, posteriormente, purificado con el reactivo Agencourt<sup>®</sup> Cleanseq<sup>®</sup> XP (Beckman Coulter, Alemania). Una vez obtenidas las secuencias purificadas, se realizó la electroforesis capilar en el analizador genético Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).

Las variaciones alélicas en las secuencias fueron identificadas utilizando el software Sequencing Analysis v5.3.1 y Seq Scape v2.6, ambos de Applied Biosystems, Life Technologies, USA.

#### **4.5.1 GENOTIPIFICACIÓN DE LA DELECIÓN del(*GJB6-D13S1830*)**

El método de la PCR multiplex, estandarizado por Cordeiro-Silva y colaboradores (2010) posibilita la diferenciación de los individuos afectados de los normales en una sola PCR: el tamaño del fragmento del alelo normal (iniciadores f y rv2) equivale a 685 pb mientras que el fragmento presentando la delección (iniciadores f y rv1) pesa 460 pb. Todos los resultados de las PCRs fueron registrados fotográficamente (ejemplo representativo en la Figura 6).

#### **4.6 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA CONEXINA 26**

Se observó, mediante PyMOL v1.5, la ubicación de los aminoácidos identificados en el estudio en la estructura tridimensional de la conexina 26 (diseñada por Maeda *et al.*, 2009) y se marcó con diferentes colores las ocho variaciones alélicas halladas. Una copia de la imagen producida se encuentra en la Figura 4. La Figura 5 es un esquema que facilita la observación de las variaciones representadas en la figura tridimensional de la conexina 26 producida por PyMOL. Se muestra la ubicación estructural de las variaciones alélicas usando los mismos colores de la Figura 4.

#### **4.7 CÁLCULO DE FRECUENCIAS**

Para analizar los resultados, se determinó la frecuencia de las mutaciones relacionando el número de variaciones alélicas de cada mutación por el número total de cambios alélicos (alelos totales) hallados en toda la población de estudio ( $n = 111$ ). De esta manera se

determinó cuáles fueron las variantes más comunes. Además, se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas de cada mutación mediante el cálculo del valor  $P$  del equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando software gratuito en línea (disponible en <http://www.koonec.com/k-blog/2010/06/20/hardy-weinberg-equilibrium-calculator/>) para la población total, “Todos” (ver Tabla 4). Se propone como hipótesis nula la ausencia de los cinco supuestos de Hardy-Weinberg: (1) una población que sea grande, donde (2) no exista migración (3) ni mutaciones, que tenga (4) reproducción aleatoria y (5) no actúe sobre ésta la selección natural.

#### **4.8 DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD**

Los individuos de cada familia fueron agrupados de acuerdo a los árboles genealógicos disponibles. Mediante el uso de estos, el acceso a los datos clínicos junto con los resultados del análisis previamente descrito se diagnosticó genéticamente a varios de los individuos afectados involucrados en el estudio.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La edad promedio de los individuos afectados ( $n = 26$ ), que participaron en el estudio fue de aproximadamente 16 años (2 – 67 años), teniendo en cuenta que el 77% fueron menores de 16 años. En cuanto al género, el 65,4% (17) de los individuos fueron varones, mientras que el 34,6% (nueve) corresponden al sexo femenino. El tipo de hipoacusia predominante en este estudio fue la neurosensorial, identificada en 19 (73,1%) individuos; dos (7,7%) fueron diagnosticados con hipoacusia mixta en el oído derecho y neurosensorial en el izquierdo. En cinco individuos (19,2%), el tipo y clase de hipoacusia fue valorada fuera de este estudio (hipoacusia n/a, Tabla 1). La condición se presentó de manera congénita en cuatro individuos afectados (15,3%), mientras que nueve individuos (35%) presentaron síntomas entre el primer mes y año de vida. Según la clasificación establecida por Gleason y Bernstein (2009), estos 13 individuos representan el grupo con hipoacusia no sindrómica recesiva prelingual. Cinco individuos (19,2%) presentaron la condición entre su primer año y segundo año de vida y tres (11,3%) la presentaron entre el segundo y tercer año. Según la clasificación antes mencionada, estos ocho individuos presentan de hipoacusia no sindrómica recesiva postlingual. Para los cinco pacientes restantes (19,2%), no se dispuso de información detallada. Esta información se encuentra resumida en la Tabla 1. Las 11 familias con al menos dos pacientes afectados con HNSR proceden de 12 de las 24 provincias del Ecuador. El origen geográfico de los abuelos de cada individuo afecto se encuentra en el Anexo 5.

En cuanto a los antecedentes personales y familiares, ningún individuo de la población bajo estudio había estado expuesto a fármacos u otros agentes ototóxicos. A excepción de un individuo (A39), cuya madre había sufrido un traumatismo obstétrico, ninguno de los individuos tenía antecedentes de problemas gestacionales (Anexo 5). Este individuo es uno de los dos con hipoacusia mixta en el oído derecho y neurosensorial en el izquierdo. Ninguna de las familias presentó historial con enfermedades infecciosas causantes de hipoacusia, ni tampoco con otras enfermedades que afecten otros órganos.

## 5.2 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS GENÉTICOS

La distribución del número de individuos afectados con mutaciones en homocigosis recesiva o en heterocigosis compuesto (dos mutaciones patogénicas distintas) pertenecientes al locus DFNB1A, al igual que la distribución del número de individuos afectados con la delección del(*GJB6-D13S1830*) en el locus DFNB1B y del número de afectados sin mutación patogénica alguna en el locus DFNB1 se indica en la Tabla 2. En el locus DFNB1A, se encontraron 16 individuos afectados (61,1%) pertenecientes a siete familias, con al menos un alelo patogénico: 13 individuos (50%) con dos alelos y tres (11,5%) con uno solo; en varios de estos, como se describe más adelante, se hallaron en heterocigosis compuesto con el polimorfismo no benigno V27I. La delección del(*GJB6-D13S1830*) (el locus DFNB1, gen *GJB6*) no se encontró en ningún individuo. En los 10 individuos afectados restantes (38,5%), nueve pertenecen a tres familias donde se halló únicamente al polimorfismo benigno V27I (ver 5.3), mientras que uno (A44) pertenece a la única familia sin mutación alguna en el gen *GJB2*.

Variantes del gen *GJB2* fueron halladas en 10 de las 11 familias analizadas, provenientes de 10 provincias distintas; pero las variantes patogénicas fueron halladas en siete familias, provenientes de nueve provincias. Los individuos sanos, que conforman el grupo control, no pertenecen a ninguna de dichas familias. Entre los individuos sanos solamente se identificó al polimorfismo V27I.

### 5.3 MUTACIONES DEL GEN *GJB2*

La amplificación del gen *GJB2* se realizó mediante PCR y fue registrada fotográficamente utilizando el analizador de imágenes ImageQuant 300 junto con ImageQuant TL software de GE Healthcare, Life Sciences. En la Figura 3 se muestra, como ejemplo, uno de los gels de agarosa al 1,5%, resultado de una de las PCRs realizadas, con el peso de las muestras equivalentes a 960 pb identificado mediante el uso del marcador de peso molecular de 100 pb. Estos fragmentos contienen al gen *GJB2* completo. La temperatura óptima de anillamiento fue de 58.5°C; las PCRs para todas las muestras se las realizaron en base a esta temperatura.

En total, se encontraron ocho variaciones alélicas a lo largo de toda la región codificante del gen: Q7X (C19T), 35delG, V27I (G79A), R32L (G95T), W77R (T229C), R143W (C427T), S199F (C596T) y N206S (A617G) (Figura 2 d). Las secuencias de cada una de las mutaciones fueron registradas y analizadas con el software Seq Scape v2.6 (Figura 7).

La Figura 4 representa una imagen tridimensional producida con el software PyMOL v1.5 y diseñada por Maeda y colaboradores (2009) que muestra los 226 aminoácidos de la Cx26 del gen *GJB2* y, con color, la ubicación de los alelos mutados hallados en este estudio.

El esquema de la Cx26, sus aminoácidos y la membrana plasmática representada en la Figura 5, permite visualizar el dominio de cada aminoácido. La variación Q7X (C19T) es una mutación sin sentido que ocurre en el codón 7 de la secuencia proteica o nucleótido 19 del transcrito (dominio IC1) y produce el intercambio de una glicina (CAG) por un codón de STOP (TAG). Esta mutación termina la producción de la proteína prematuramente en el codón 7. Por otro lado, el genotipo normal de la delección 35delG consiste de seis guaninas (GGGGGG) mientras que el genotipo mutado contiene solamente cinco (GGGGG). Esta delección ocasiona un cambio en el marco de lectura de la secuencia codificante lo cual resulta en la terminación prematura de la proteína en el aminoácido duodécimo (Carrasquillo *et al.*, 1997), dominio IC1 de la proteína. El polimorfismo V27I es una mutación con cambio de sentido y produce el intercambio de una valina (GTC) por una isoleucina (ATC) en el codón número 27, nucleótido número 79, dominio TM1. En cuanto a la variación R32L el cambio se da en el codón 32, equivalente al nucleótido 95 (dominio TM1); esta mutación con cambio de sentido intercambia una arginina (CGC) por una leucina (CTC). La mutación W77R, una mutación con cambio de sentido, intercambia una tripsina, (TGG) por una arginina (CGG) en el codón 77, nucleótido 229, dominio TM2 de la proteína. La mutación R143W, igualmente una mutación con cambio de sentido, provoca el reemplazo de una arginina (CGG) por una tripsina (TGG) en el codón número 143, nucleótido 427 (dominio TM3). Por ubicación en la secuencia aminoacídica, la siguiente mutación, S199F, es otra mutación con cambio de sentido que ocurre en el codón número 199, nucleótido 596 del transcrito, dominio TM4 de la proteína. Esta mutación ocasiona el intercambio de una serina (TCT) por una fenilalanina (TTT). La última mutación encontrada es N206S, como la mayoría hallada en el estudio, es una mutación con cambio de sentido; el intercambio produce el intercambio de una asparagina

(AAT) por una serina (AGT) en el codón 77, nucleótido 617, localizado en el dominio TM4 de la proteína. La tabla 3 incluye todos los cambios nucleotídicos, proteicos y el dominio de la proteína de cada variación del gen *GJB2*.

#### 5.4 FRECUENCIAS

Este estudio genético permitió identificar en total siete mutaciones patogénicas y un polimorfismo, V27I, no patogénico.

En la total población de estudio, compuesta de 111 individuos (26 afectados, 28 familiares y 57 controles sanos), se encontró un total de 104 alelos mutados (pertenecientes a las ocho variaciones alélicas halladas). El porcentaje de cada variación en relación a los alelos totales se encuentra en la Tabla 3. El cambio más común fue el polimorfismo V27I, del cual se encontraron 61 alelos mutados, equivalente al 58,9% del total con una distribución homogénea entre los tres grupos, individuos afectados, sanos y familiares; ninguna otra variante fue encontrada entre los individuos sanos. La segunda mutación más común fue Q7X, presente en el 18,3% (19 alelos) de los alelos totales. Seguida de ésta, la mutación R32L (con 7 alelos) viene a ser la tercera más común, con una frecuencia de 6,7%; las mutaciones 35delG, W77R, R143W, S199F y N206S se encontraron en las siguientes frecuencias: 2,9% (3 alelos), 4,8% (5 alelos), 3,8% (4 alelos), 3,8% (4 alelos) y 1,9% (2 alelos), respectivamente.

Tomando en cuenta solamente a las mutaciones patogénicas (todas las mutaciones halladas menos V27I, el polimorfismo benigno), la mutación patogénica más común resulta ser Q7X; a esta mutación se la encontró en 16 sujetos; de estos, 13 la presentan en estado heterocigoto y tres en homocigoto, dando un total de 19 alelos patogénicos (Tabla 3). Diez de

los 16 sujetos, incluyendo los tres individuos homocigotos, fueron pacientes clínicamente diagnosticados con HNSR. La segunda mutación patogénica más común fue R32L; se la encontró en estado heterocigoto en siete sujetos, lo que equivale a siete alelos (Tabla 3). De estos siete, seis son pacientes con HNSR. La tercera mutación patogénica más común fue W77R, esta fue hallada en estado heterocigoto en cinco sujetos, tres de estos fueron afectados con HNSR.

## 5.5 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS

En la Tabla 4 se exponen, para cada mutación, las frecuencias genotípicas de cada grupo, “afectos”, “sanos” y “familiares”; también se incluye otro grupo, “todos” (este cuarto grupo es la suma de los primeros tres); además de las frecuencias genotípicas, se exponen frecuencias alélicas de cada grupo. De las ocho mutaciones, únicamente se hallaron dos, Q7X y V27I, con genotipo homocigoto recesivo. Por dicha razón las demás mutaciones tienen valores nulos en cuanto a su genotipo homocigoto recesivo.

De todas las variaciones, el polimorfismo V27I tiene, para el genotipo heterocigoto (GA) y homocigoto recesivo (AA), en cuanto a los individuos afectados (GA = 0,35; AA = 0,11), sanos (GA = 0,33; AA = 0,01) familiares (GA = 0,32; AA = 0,18) y todos (GA = 0,33; AA = 0,1), las frecuencias genotípicas más altas. De igual modo, este polimorfismo también presentó la frecuencia alélica del alelo recesivo (en este caso A) más alta para cada grupo, afectados (0,29), sanos (0,23), familiares (0,34) y todos (0,27). Las frecuencias genotípicas de la mutación Q7X, para cada grupo, afectados (CT = 0,27; TT = 0,12), sanos (CT = 0; TT = 0), familiares (CT = 0,21; TT = 0) y de todos (CT = 0,12; TT = 0,03), fueron las segundas más

altas dentro de las 8 variaciones alélicas. De esta mutación, también se obtuvo la segunda frecuencia alélica más alta para los afectos ( $A = 0,26$ ), sanos ( $A = 0$ ), familiares ( $A = 0,11$ ) y todos ( $A = 0,09$ ). Considerando solo las mutaciones patogénicas, esta mutación presenta las frecuencias genotípicas y alélicas más altas. Al analizar la tercera mutación más común, R32L, se obtuvo las terceras frecuencias genotípicas más altas; esto en cuanto a los afectos ( $GT = 0,23$ ;  $TT = 0$ ), los sanos ( $GT = 0$ ;  $TT = 0$ ), los familiares ( $GT = 0,04$ ; ( $TT = 0$ ), y todos ( $GT = 0,06$ ;  $TT = 0$ ); también se obtuvo la tercera frecuencia alélica del alelo recesivo más alto para los afectos ( $T = 0,11$ ), sanos ( $T = 0$ ), familiares ( $T = 0,02$ ) y todos ( $T = 0,03$ ). Las otras mutaciones, 35delG, W77R, R143W, S199F, N206S, menos comunes en este estudio, tienen, en cuanto a todos los grupos, las frecuencias genotípicas y alélicas más bajas.

Se expone, también en la Tabla 4, el valor  $P$  de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada mutación dentro del grupo denominado “todos”. Resultó que en ningún caso el valor  $P$  fue mayor a 0,5, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se afirma que actúan los supuestos de Hardy-Weinberg.

## **5.6 NÚMEROS DE INDIVIDUOS AFECTOS, SANOS Y FAMILIARES CON CADA GENOTIPO**

La Tabla 3 indica las frecuencias de cada mutación en relación a los alelos totales (total de cambios alélicos/alelos mutados) ( $n = 104$  alelos) mientras que la Tabla 4 presenta las frecuencias alélicas y genotípicas para cada mutación. En estas tablas y hasta este punto se han presentado a las mutaciones en estado heterocigoto. Sin embargo, en la mayoría de los individuos afectos las mutaciones no se hallaron en estado heterocigoto simple. Es decir que si

bien la mayoría de las mutaciones se presentaron, hasta este punto, en estado heterocigoto simple, este estado no representa el genotipo real de cada uno de estos individuos afectados. Los genotipos completos de cada uno de los grupos analizados (afectos, sanos y familiares), se encuentran la Tabla 5.

Tomando en cuenta a los tres grupos, afectados, sanos y familiares, el número total de genotipos hallados fueron 16 (Tabla 5). Estos incluyen aquellas variaciones alélicas patogénicas y no patogénicas, individuos heterocigoto compuestos y heterocigoto no compuestos (simples). Los genotipos se encontraron en 67 individuos de la población total ( $n = 111$ ), pertenecientes a 10 de las 11 familias afectadas por hipoacusia (grupos afectados y familiares); de estos 16 genotipos, solamente dos fueron totalmente benignos (V27I/V27I y V27I/wt); los demás tenían al menos un alelo patogénico.

En el grupo de los 26 afectados, 10 individuos, presentaron dos mutaciones patogénicas en heterocigosis compuesta (Q7X/V27I/R32L; Q7X/S199F; 35delG/W77R; W77R/R143W) (Tabla 5). También se hallaron tres individuos con la mutación recesiva Q7X en homocigosis (Q7X/Q7X). Se encontró un solo individuo afecto con el polimorfismo V27I en homocigosis; otro dos con el mismo polimorfismo en homocigosis más una heterocigosis compuesta con un alelo R32L (V27I/V27I/R32L); cinco sujetos con el polimorfismo en heterocigosis (V27I/wt); y uno con la mutación N206S en heterocigosis (N206S/wt).

En la población total, el genotipo más común fue V27I/wt; el cual se encontró en 28 (41.8%) de los 67 individuos, 19 (67,9%) de los cuales pertenecen al grupo de los sanos, cinco (17,8%) a los individuos afectados y cuatro (14,3%) a los familiares. El segundo genotipo más común en la población total fue esta misma variación pero en homocigosis, V27I/V27I.

Ambos genotipos fueron, además, los únicos que se encontraron en el grupo de controles sanos.

Los genotipos que componen el grupo familiares, es decir, los parientes sin hipoacusia de los individuos afectados, presentaron variantes genóticas patogénicas involucrando un solo alelo en heterocigosis compuesta con el polimorfismo no patogénico V27I o con la variante silvestre (wt). En total, se encontraron 20 individuos con 10 genotipos distintos. El genotipo compuesto Q7X/V27I se encontró en tres individuos, V27I/V27I en cinco, V27I/V27I/R32L en uno, V27I/35delG en uno y V27I/N206S en uno. La heterocigosis simple Q7X/wt, V27I/wt, 35delG, W77R/wt, R143W/wt se encontró en tres, cuatro, uno, dos y dos sujetos respectivamente.

## **5.7 GENOTIPOS Y GRADO DE HIPOACUSIA**

Para observar con mayor facilidad la relación entre los alelos patogénicos y el grado de hipoacusia de cada afecto, los genotipos benignos fueron excluidos de la Tabla 6. Por ende, en esta tabla, no se está considerando al grupo de los sanos, ya que en este grupo solo se hallaron los genotipos V27I/wt y V27I/V27I. En la Tabla 6 se describen 14 genotipos con al menos un alelo patogénico hallados en 30 individuos; 16 de estos fueron pacientes afectados mientras que 14 fueron sujetos familiares. Seis genotipos fueron exclusivos para los pacientes afectados mientras que siete fueron exclusivos entre individuos familiares sin hipoacusia; un genotipo (V27I/V27I/R32L) fue hallado en ambos grupos.

Entre los diferentes grados de hipoacusia, aquellos con hipoacusia severa y profunda fueron los más comunes. Con esta severidad se encontraron 10 (33,3%) de los 30 individuos

(Tabla 6). El genotipo más común entre los 16 individuos hipoacúsicos con cualquier grado de severidad fue Q7X/V27I/R32L; con este genotipo se identificaron cuatro individuos (13,3%) de los 30, dos de aquellos fueron diagnosticados con hipoacusia profunda y dos con hipoacusia severa; estos cuatro individuos pertenecen a tres familias diferentes (Anexo 5). Otros dos genotipos (Q7X/Q7X y Q7X/S199F) se encontraron en tres individuos afectados (10%) cada uno. El primero se identificó en tres individuos con hipoacusia profunda y el último en dos con hipoacusia profunda más otro con hipoacusia de grado desconocido (n/a). Seguido de estos, el genotipo W77R/R143L fue hallado en dos individuos afectados (6,7%) (con severidad profunda); el genotipo V27I/V27I/R32L también se halló en dos individuos afectados (6,7%) pero estos fueron clasificados bajo hipoacusia de grado desconocido. El genotipo 35delG/W77R se encontró en uno solo (3,3%), con grado de severidad profunda. Otro genotipo, N206S/wt también se halló en un individuo (3,3%) con hipoacusia moderada en el oído izquierdo y severa en el oído derecho. Llamativamente, un individuo (3,3%) que pertenece a la misma familia presenta el genotipo (V27I/N206S) pero carece de hipoacusia.

Dentro de los individuos clasificados bajo la categoría “sin hipoacusia” uno fue hallado con el genotipo V27I/V27I/R32L, mientras que dos, previamente mencionados, con hipoacusia de grado no definido, poseen el mismo genotipo. Uno de estos individuos afectados (con genotipo V27I/V27IR32L) y el individuo con el mismo genotipo pero sin hipoacusia pertenecen a la misma familia.

A excepción de tres casos previamente mencionados (dos individuos hipoacúsicos con genotipo V27I/V27I/R32L y el individuo con genotipo N206/wt), todos los individuos con un

solo alelo patogénico no presentan hipoacusia. Esta tendencia se observa entre los individuos del grupo denominado familiares

### **5.8 LA DELECCIÓN del(*GJB6-D13S1830*) DEL GEN *GJB6***

Esta deleción no fue encontrada en ningún individuo dentro de esta población de estudio. Una imagen de la PCR de varias muestras, incluyendo a varios individuos afectados y sanos se encuentra en la Figura 6. Todas las muestras (n = 111), al presentar una sola banda de 685 pb revelaron no tener la deleción del(*GJB6-D13S1830*).

## 6. DISCUSIÓN

Mediante secuenciación se analizó al exón 2 del gen *GJB2* mientras que mediante una PCR multiplex se analizó a la delección del(*GJB6-D13S1830*) en 111 sujetos, 26 de los cuales pertenecen a 11 familias con al menos dos individuos previamente diagnosticados con HNSR. Se incluyeron 57 individuos considerados controles (sanos) y 28 parientes de los afectados (familiares) sin hipoacusia. En cuatro familias de las 11 afectas con HNSR no se observó ninguna mutación patogénica en los genes analizados; sin embargo, se debe tomar en cuenta que en tres de ellas sí se encontró el polimorfismo V27I (gen *GJB2*), descrito como no patogénico. Esto quiere decir que si bien estas tres familias con la enfermedad no presentan mutaciones patogénicas en el gen *GJB2*, sí portan el polimorfismo no patogénico V27I, lo que sugiere que la actuación de la heterogeneidad genética. Este fenómeno, común en la hipoacusia hereditaria, se conoce como heterogeneidad genética y se da cuando mutaciones en genes distintos pueden producir una misma manifestación clínica (Farpón y Bañales, 2011).

El 50% de los individuos afectados presentó al menos dos mutaciones patogénicas del locus *DFNB1A* (Tabla 2). Se presume que los genotipos con dos mutaciones patogénicas en estado heterocigoto compuesto u homocigoto recesivo son los que provocan sordera (Tabla 5), como se ha observado en los otros estudios de este tipo (Menéndez *et al.*, 2003; Pandya *et al.*, 2003; Putcha *et al.*, 2007). Analizando el árbol genealógico de cada familia en conjunto con los perfiles clínicos y los resultados de las pruebas genéticas, se diagnosticó HNSR a 13 individuos, los cuales cumplen con el criterio mencionado en los materiales y métodos (individuos en cuya familia existan dos o más miembros afectados por hipoacusia hereditaria;

y que compartieron el mismo patrón clínico en una o dos generaciones). Éstos fueron diagnosticados con HNSR y tienen dos alelos patogénicos pertenecientes al gen *GJB2*. Se sospecha que los otros tres individuos afectados con un solo alelo patogénico en el locus *DFNB1A* deben poseer una mutación en otro gen (heterogeneidad alélica); así como los otros 10 individuos afectados sin mutaciones en el locus *DFNB1*. Sin embargo, también podría ser que porten la mutación del exón 1 del gen *GJB2* (IVS1 + 1 G/A), en este estudio este exón no fue estudiado. La heterogeneidad genética debe tomarse en cuenta para todos individuos en los que no se encontraron mutaciones patogénicas en el locus *DFNB1*, así como para todos los individuos con HNSR con solo un alelo patogénico, aunque en estos casos también podría estar implicada la penetrancia incompleta, es decir que “solamente un porcentaje de individuos portadores del gen alterado manifiestan la enfermedad” (Farpón y Bañales, 2011).

En el locus *DFNB1B* no se encontró a ningún individuo con la delección del(*GJB6-D13S1830*); lo cual resulta curioso poblacionalmente, ya que esta es la segunda causa más frecuente de HNSR en la población española (Farpón y Bañales, 2011). Esta variante demuestra no ser prevalente ni importante en la población ecuatoriana en estudio, a diferencia de otras poblaciones de ascendencia europea (Pandya *et al.*, 2003; Putcha *et al.*, 2007). Se debe recalcar que está mutación es una de las más analizadas en estudios poblacionales para HNSR poniendo, con este estudio, una alerta ya que se demuestra que una variante no puede ser aplicada para tamizaje en todas las poblaciones.

La población total constó de 26 afectados más 28 de sus parientes y además 57 controles sanos sin antecedentes personales ni familiares con hipoacusia. En total se identificaron siete mutaciones patogénicas distintas (Q7X, 35delG, R32L, W77R, R143W, S199F y N206S), además del polimorfismo benigno V27I (Figura 5). Estas mutaciones son mutaciones

autosómicas recesivas. Si bien todas han sido descritas previamente, una sola publicación (Pandya *et al.*, 2003) hace referencia a la variante Q7X (en heterocigosis) en un solo individuo de origen ecuatoriano. Dicho individuo presentaba retraso cognitivo y un diagnóstico de posible albinismo oculocutáneo. Esta mutación no ha sido encontrada en ningún otro estudio. Este hecho resulta interesante porque en nuestra población, la mutación Q7X fue encontrada en 10 individuos afectados: siete en heterocigosis compuesta con otra mutación patogénica y tres en homocigosis recesiva; también se halló en seis familiares, tres en heterocigosis compuesta con el polimorfismo V27I y en 3 combinada con un alelo silvestre (wt) (Tabla 5). Es la única mutación patogénica que se encontró en homocigosis recesiva. El origen geográfico familiar de estos 16 individuos, que corresponden a siete de las 11 familias estudiadas, pertenecen a 6 provincias de las 24 del país. Compone el 19,2% de los alelos totales (Tabla 3). En la muestra total la frecuencia alélica de alelo recesivo T de todos los individuos que portan la mutación Q7X fue la segunda más alta ( $T = 0,09$ ), seguida del alelo recesivo de la mutación V27I. Considerando que la mutación V27I no es patogénica la mutación Q7X tiene la frecuencia genotípica y alélica más alta entre las mutaciones patogénicas (Tabla 3). En la población estudiada, esta mutación, fue la más significativa y prevalente en la población ecuatoriana.

Cabe recalcar que en nuestro estudio todos los individuos con la mutación Q7X (C19T) en estado homocigoto recesivo o heterocigoto compuesto con algún otro alelo patogénico del gen *GJB2* fueron diagnosticados con HNSR profunda o severa. Este dato contrasta con lo descrito por Pandya y colaboradores (2003), ya que el individuo ecuatoriano con Q7X en heterocigosis que ellos identificaron presentó retraso cognitivo un y diagnóstico de posible albinismo oculocutáneo; por lo que el autor sugirió una forma sindrómica para esta mutación pero con el presente estudio se demuestra que se trata de una mutación no sindrómica.

La probabilidad genética de que un individuo presente al nacer un genotipo homocigoto recesivo para la mutación Q7X (o cualquier otra mutación identificada en este estudio) es de 25%, si es que ambos padres son heterocigotos; si un padre es homocigoto recesivo y el otro heterocigoto la probabilidad será del 50%, tomando en cuenta que la mutación es autosómica recesiva. Esta probabilidad sumada con la alta frecuencia alélica de esta mutación aumenta la probabilidad de que un individuo con HNSR produzca descendencia con la condición.

A diferencia de varios estudios, donde la mayoría de los pacientes afectados son de ascendencia europea (Farpón y Bañales, 2011), la mutación patogénica más común en este estudio no fue la delección 35delG sino Q7X. De hecho la delección 35delG fue encontrada en solamente 2,9% de los alelos totales. La frecuencia alélica de 35delG en todos los individuos es una de las más bajas, 0,01%.

El origen de la delección 35delG ha sido tema de gran debate durante los últimos años; en el año 1997, Carrasquillo y colaboradores realizaron un análisis de haplotipos en un grupo endogámico, su estudio no solo sugirió un origen reciente de la mutación sino que también permitió identificar diferentes haplotipos que aquellos identificados por Zelante y colaboradores (1997). Por esta razón se había propuesto que la delección 35delG se da recurrentemente, y cada caso se da independientemente; es decir que se proponía que la alta frecuencia de 35delG se debe a un “hot spot mutacional”, provocado por los errores de la polimerasa al pasar sobre las seis guaninas consecutivas (Denoyelle *et al.*, 1997). “La ausencia de un haplotipo común argumentaría para orígenes múltiples de la mutación” (Rothrock *et al.*, 2003). Sin embargo, existe gran cantidad de evidencia que demuestra que la mutación 35delG está ampliamente ausente en poblaciones no-europeas (Gasparini *et al.*, 2000), inclusive no ha

sido detectada en algunas poblaciones, como aquellas de origen japonesa y taiwanesa (Kudo *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2000). Van Laer y colaboradores en el año 2001 realizaron un estudio genético incluyendo un análisis de recombinación de la delección 35delG en individuos belgas, británicos y americanos y, llegaron a la conclusión de que la mutación 35delG procede de un “fundador común y ancestral”. Dos años más tarde (2003) Rothrock y colaboradores fomentaron esta hipótesis con evidencia, demostrando que esta delección surgió en un individuo ancestral de origen europeo o de medio oriente. Nuevamente, en el año 2008, se presentó evidencia que apoya la hipótesis del efecto fundador para explicar la alta frecuencia de 35delG, Kokotas y colaboradores (2008) realizaron un análisis de haplotipos en 60 individuos homocigotos para la mutación y concluyeron que la variación apareció alrededor de 700 generaciones o 14,000 años atrás. Recientemente, Norouzi y colaboradores (2011), basándose en los estudios previamente mencionados y en la ruta migratoria del hombre desde Siberia hasta Europa por Irán concluyeron que la mutación probablemente se originó en el norte de Irán. La hipótesis de Norouzi y colaboradores (2011) propone que los descendientes de esta población llevaron la mutación hacia Europa donde posteriormente se esparció en todas las poblaciones de ascendencia europea.

Con esto podemos decir que, las bajas frecuencias de 35delG en la población ecuatoriana estudiada podrían bien representar un bajo número de muestra o, también podría significar que la mayor parte de la población ecuatoriana no ha tenido un gran influjo génico de aquella población donde se dio inicialmente la mutación 35delG.

El polimorfismo V27I, además de ser la variación alélica no patogénica más común (56,7% de los alelos totales), fue el único que se encontró en ambos estados, heterocigoto y homocigoto, en los tres grupos afectados, sanos y familiares. De hecho fue la única variación que

se encontró en el grupo sanos (Tablas 5 y 6) lo cual sustenta su denominación como polimorfismo. Como ya se mencionó anteriormente, este polimorfismo tiene las frecuencias genotípica y la alélica más altas del estudio.

En el sentido poblacional, la presencia de este polimorfismo es interesante ya que en referencias previas se ha visto que ocurre en altas frecuencias en las etnias asiáticas e hispánicas. En el año 2003 Pandya y colaboradores detallaron que este polimorfismo se encuentra en las poblaciones hispánicas y asiáticas en una frecuencia del 11,5% y 3,7%, respectivamente; Tang y colaboradores (2006) encontraron 21 individuos (28%) de 76 sanos hispánicos con esta mutación en heterocigosis y dos (2,6%) en homocigosis; entre los individuos asiáticos de este estudio se obtuvo una frecuencia más alta (0,32%); en su estudio sobre una muestra de la población del caribe hispánico Samanich y colaboradores (2007) observaron que nueve de 101 casos contenían este polimorfismo; al igual que el 12% de los controles. Pucha colaboradores (2007) determinaron una frecuencia del 20,8% y 19,1% en las etnias asiáticas e hispánicas respectivamente. La alta frecuencia de V27I en este estudio concuerda con las altas frecuencias del mismo en los otros estudios en otras poblaciones hispánicas (Pandya *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006; Samanich *et al.*, 2007; Pucha *et al.*, 2007). Estas observaciones sugieren que las etnias hispánicas y asiáticas debieron compartir un ancestro común.

La variación R32L es una mutación relativamente rara (Arenas-Sordo *et al.*, 2012). Fue descrita por primera vez en el año 2002 por Wu y colaboradores. En este estudio, se encontró a la mutación en heterocigosis compuesta con la mutación Q7X y el polimorfismo V27I. Wu y colaboradores (2002) sugirieron que, al igual que los alelos patogénicos R32H y R32C, los cuales son importantes para la función normal de la Cx26, el alelo R32L es patogénico.

También confirma que el codón R32 es uno de los más conservados en el dominio TM 1 (primer dominio transmembranal) y comparte identidad con las siguientes conexinas: Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 en el humano, Cx30 en el ratón y Cx31 en el pollo, todas implicadas en la pérdida de la audición. A través de *Predict Protein* software en línea Joseph y Rasool (2009) estipularon que, debido a la variación significativa en la estructura helicoidal en el dominio TM1 entre la proteína mutante y la proteína normal, la variación R32L es patogénica. En este estudio, realizado en la población Kerala, India, esta mutación fue encontrada en tres de los 86 (3,5%) afectados. En el año 2011 Hayashi y colaboradores identificaron una mutación nueva, R32S; en el mismo estudio se encontraron las otras mutaciones R32 previamente identificadas, R32H, R32C y R32L. Esta observación llevó a estos autores a proponer que R32 es un “hot spot” mutacional.

En el presente estudio, la mutación R32L conformó 6,7% de los alelos totales, haciéndola la tercera variación más común (Tabla 3). Se la encontró en estado heterocigoto compuesto con la mutación Q7X y el polimorfismo V27I en cuatro individuos (Tabla 5) pertenecientes a tres familias distintas (Anexo 5). También se la identificó en estado heterocigoto compuesto con el polimorfismo V27I en estado homocigoto recesivo (V27I/V27I/R32L). De igual modo la frecuencia alélica del alelo mutado T resultó ser la tercera más alta (0,03 para la población general). Es decir que en este estudio, a diferencia de otras poblaciones (Arenas-Sordo *et al.*, 2012), no resultó ser tan rara. No se encontró a otra mutación con cambio de sentido en el codón R32.

La mutación W77R ha sido encontrada en varios otros estudios en frecuencias relativamente bajas (Menéndez *et al.*, 2001; Dalamón *et al.*, 2005; Marlin *et al.* 2005). Fue descrita por primera vez en un pueblo árabe-israelí al sur de Galilea y fue, posteriormente,

hallada en individuos de ascendencia española (Rabionet *et al.*, 2000). En el presente estudio fue la cuarta mutación más común, con 4,8% (4/104) de los alelos totales.

En una población de Ghana la mutación R143W fue encontrada con una alta prevalencia, 21 individuos en 11 familias distintas (Brobbly *et al.*, 1998). Este hecho fomenta la observación de que las frecuencias de las variaciones alélicas tienen relación directa con la etnia de la población, y que posiblemente hayan surgido debido a un ancestro común. En el año 2010 en un análisis genético del gen *GJB2* descrito por Gravina y colaboradores demuestra que esta mutación, en Argentina, fue la segunda más común (4/68). De igual modo, fue considerada una de las más frecuentes en un estudio sobre la población iraní (Bazazzadegan *et al.*, 2012).

En cuanto a este estudio, las frecuencias genotípicas y alélicas (Tabla 5) de esta mutación, al igual que la frecuencia entre los alelos totales, (Tabla 3) estuvieron relativamente bajas en comparación con las otras mutaciones. Sin embargo, se debe considerar que esto puede deberse a la poca cantidad de pacientes afectos no emparentados involucrados en el estudio y que posiblemente las frecuencias aumentarían con una población de estudio mayor.

Es interesante notar que en un estudio realizado por Tamayo y colaboradores en el año 2009 sobre una población en Bogotá, Colombia, se encontró a la mutación, S199F, en mayor frecuencia que la mutación 35delG (17,9% y 17,0% de los alelos totales, respectivamente). En su estudio, la frecuencia de la mutación S199F se diferencia considerablemente de las frecuencias representadas en otros estudios, donde la frecuencia de la mutación S199F llega únicamente al 1%. (Green *et al.*, 1999). En el presente estudio, en cambio se encontró igual número de alelos mutados para ambas variantes, 35delG S199F, 3 alelos (2,8% de los alelos

totales). En comparación con el estudio por Tamayo y colaboradores (2009), las frecuencias de estas mutaciones son bajas en esta población.

La mutación con cambio de sentido N206S fue la menos común de las ocho variaciones. Se encontraron solamente dos alelos (1,9% de los alelos totales) en la población total. Esta mutación ha sido hallada en frecuencias relativamente bajas en varios estudios. En una cohorte de individuos hipoacúsicos seleccionados por tener mutaciones bialélicas en el gen *GJB2* o en heterocigosis compuesta con la delección del(*GJB6-D13S1830*), Marlin y colaboradores en el año 2005 hallaron seis alelos entre 207 pacientes no emparentados. Pandya y colaboradores en el año 2003 encontraron dos alelos en 737 pacientes afectados con HNSR. También ha sido descrita en la población italiana (Primignani *et al.*, 2009), argentina (Gravina *et al.*, 2010) y recientemente en la población portuguesa (Matos *et al.*, 2010).

En cuanto al análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg, se demostró que en todos los casos se cumple con los supuestos para la ley y, por lo tanto, las frecuencias de cada variación en la población se encuentran bajo equilibrio.

Para realizar el cálculo de las frecuencias de cada variación alélica (mutación) en relación a los alelos totales y para los cálculos de las frecuencias genotípicas y alélicas las mutaciones se analizaron en estado heterocigoto simple; este estado, sin embargo, no representa el genotipo verdadero de cada individuo. La mayoría de los individuos afectados presentaron las mutaciones en estado heterocigoto compuesto y no simple. Es muy frecuente que en el gen *GJB2* hayan casos de pacientes heterocigoto compuestos, individuos con dos mutaciones patogénicas distintas. Este estudio no es la excepción. La Tabla 5 muestra cuales fueron los genotipos que se encontraron dentro del grupo de individuos afectados, sanos y

familiares. A primera vista se observa que los genotipos V27I/wt y V27I/V27I están distribuidos homogéneamente entre los tres grupos; de igual modo las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo se encuentran distribuidas de modo homogéneo entre los tres grupos (Tabla 4). Esto más las frecuencias altas de V27I en el estudio demuestra que existe una fuerte presencia de la misma en la población ecuatoriana y recalca su clasificación como polimorfismo.

Los genotipos compuestos por al menos dos alelos patogénicos producen, en todos los casos, hipoacusia; estos serán los genotipos Q7X/Q7X, Q7X/V27I/R32L, Q7X/S199F, 35delG/W77R y W77R/R143W. Como se indica en la Tabla 6, podemos ver que estos genotipos produjeron hipoacusia severa o profunda; con la excepción de un individuo con el genotipo Q7X/S199F del cual no se disponía de tal información y fue clasificado bajo hipoacusia de grado n/a. Entre los familiares podemos observar que, al estar emparentados con los individuos afectados, tienen mutaciones patogénicas; éstas, sin embargo, están en heterocigosis compuesto con el polimorfismo benigno V27I o en estado heterocigoto simple (e.g. Q7X/wt). En estos estados, los alelos patogénicos parecen no afectar la audición del individuo; es decir que todos los individuos del grupo familiares (con la excepción de los individuos con los genotipos V27I/V27I y V27I/wt) son portadores de los alelos patogénicos recesivos. Podríamos suponer que un individuo heterocigoto, con la delección truncante Q7X o con la delección con cambio de marco de lectura 35delG debería tener cierto nivel de pérdida de audición, ya que el alelo no produce proteína. Sin embargo, en este estudio observamos que ninguno de los individuos con heterocigosis con un solo alelo patogénico presenta hipoacusia, con la excepción del individuo con el genotipo N206S/wt. Tomando en cuenta que los alelos

mutados son recesivos, el alelo normal parece compensar la falta de proteína por terminación prematura de la cadena.

Hay, sin embargo, dos casos desconcertantes. El primero presenta el genotipo V27I/V27I/R32L. En este caso, dos individuos pertenecientes a la misma familia lo portan y, sin embargo, uno padece de pérdida auditiva y el otro no. Hay otro individuo con el mismo genotipo pero de otra familia, también tiene hipoacusia, igualmente de severidad desconocida. En este caso debemos suponer que la heterogeneidad genética podría estar involucrada; sin embargo, podríamos suponer que su condición está relacionada con la edad o algún factor ambiental.

El otro caso es de un individuo con una sola mutación patogénica (N206S) con o hipoacusia moderada en el oído izquierdo y severa en el derecho; este individuo pertenece a la misma familia de otro individuo con el genotipo N206S/V27I sin hipoacusia. Podríamos suponer, al igual que en el primer caso, que este individuo debe estar afectado por otra mutación en otro locus o que la edad o ambiente podría estar involucrado. En este caso también debemos tomar en cuenta que el fenómeno conocido como penetrancia incompleta podría estar involucrado. Es incierta la razón por la cual estos individuos tienen hipoacusia, faltaría incluir otros genes para poder solucionar esta duda.

Según Meşe y colaboradores (2004), pacientes con la mutación sin sentido N206S presentan hipoacusia leve a moderada. Lo cual también se observó en este estudio; el único individuo con esta variación con hipoacusia presenta severidad moderada en el oído izquierdo pero severa en el derecho.

Es interesante que el genotipo patogénico más común haya sido Q7X/V27I/R32L, ya que Q7X, como ya se ha mencionado, ha sido identificada una sola vez en un individuo ecuatoriano heterocigoto en un estudio previo (Pandya *et al.*, 2003); y R32L, porque también es considerada una variación rara (Arenas-Sordo *et al.*, 2012). Debido a la alta frecuencia de la mutación Q7X en este estudio, es posible que Q7X sea predominante y característico de la población ecuatoriana, ya que ha pasado antes con otras mutaciones (35delG en caucásicos, 235delC en asiáticos, W24X en la población india y S199F en la población colombiana); según Gasparini y colaboradores (2000) las frecuencias de las mutaciones en el gen *GJB2* están asociadas con la etnicidad de las poblaciones. Para sustentar esto sería necesario realizar un estudio involucrando más pacientes no emparentados.

Poblacionalmente, es curioso notar que los genotipos Q7X/Q7X y Q7X/S199F fueron encontrados como los segundos genotipos más comunes. La mutación Q7X, siendo la única patogénica con individuos (tres) en estado homocigoto demuestra cuán presente está en esta población de estudio. S199F, es en cambio, como ya se mencionó, la mutación más frecuente en Bogotá, Colombia. Al ser el país fronterizo del norte no es de sorprender que aquí también resultara ser común. La idea de mutaciones propias de etnias también se sustenta al considerar esto.

En otros estudios se ha visto, al igual que en este, que el genotipo 35delG/W77R resulta en hipoacusia profunda (Dalamón *et al.*, 2005; Gravina *et al.*, 2010). Sin embargo, solamente se halló un individuo con este genotipo, lo cual no nos permite sacar una conclusión válida sobre su presencia en la población ecuatoriana. Simplemente, que, en esta población de estudio, la delección 35delG tiene una frecuencia relativamente baja.

Un tamizaje neonatal o prelingual que permita la identificación temprana de la condición resultaría beneficioso, ya que una identificación tardía podría implicar problemas durante el desarrollo del lenguaje, lo cual podría tener impactos a largo plazo en cuanto al desarrollo social y educativo del individuo afectado (Farpón y Bañales 2011). Para un tamizaje, el método de detección es importante, ya que procedimientos de secuenciación son efectivos más efectivos pero, tomar en cuenta la heterogeneidad genética, habría incluir más genes para acertar el diagnóstico. Últimamente, se ha propuesto la utilidad y efectividad de utilizar chips para la detección de mutaciones específicas (Farpón y Bañales, 2011); estas sin embargo no permitirían la identificación de nuevas mutaciones.

Para los individuos afectados y sus familiares portadores e incluso no portadores la utilidad del análisis genético lo observamos al considerar varios aspectos, el diagnóstico, el pronóstico, el tratamiento y la reproducción. En cuanto al diagnóstico, el hecho de conocer la causa de la sordera “con frecuencia ayuda al paciente y a sus familiares a confrontar emocionalmente el diagnóstico, acelerando la decisión de iniciar tratamientos y evitar pruebas adicionales innecesarias” (Farpón y Bañales, 2011). El pronóstico, en función al genotipo, podría predecir la evolución de la sordera. Para individuos con hipoacusia prelingual el pronóstico tendría implicaciones al considerar métodos de tratamiento y educativos ya que la mayoría de los individuos pierden la audición congénitamente o antes de iniciar el uso del lenguaje. El análisis genético también tiene implicaciones sobre el tratamiento ya que se ha demostrado que los individuos con mutaciones ocasionadas en el gen *GJB2* se benefician más de los implantes cocleares que los pacientes con hipoacusia hereditarias sin mutaciones en estos genes. Se ha propuesto que esto se debe a que, aparte de la hipoacusia, pacientes con sordera relacionada al gen *GJB2* son totalmente sanos; esto presumiblemente se debe a que

mutaciones en el gen *GJB2* afectan a la cóclea pero dejan intacto al octavo nervio craneal y al sistema vestibular de modo que las la funciones cognitivas superiores no se llegan a afectar (Green *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2003). Es decir, que de este estudio los 13 individuos con al menos dos mutaciones patogénicas en heterocigosis compuesta o homocigosis recesiva en el gen *GJB2* serían los mejores candidatos para un implante coclear. En cuanto a la reproducción, el diagnóstico genético permite determinar la probabilidad de tener un hijo con sordera (Farpón y Bañales, 2011). Esta probabilidad va según el cuadro de Punnet y las Leyes de Mendel.

## 7. CONCLUSIONES

En el caso del gen *GJB2*, la genotipificación se estandarizó mediante el uso del software Primer 3; para el gen *GJB6*, los iniciadores se tomaron (Cordeiro-Silva *et al.*, 2010), únicamente fue necesario adecuar el tiempo de duración entre etapas de PCR.

La variante más común y con las frecuencias genotípicas y alélicas más altas fue el polimorfismo V27I, este además fue la única variante hallada en los tres grupos de estudio, afectados, sanos y familiares. La identificación y frecuencia de éste concuerda con la observación de que es benigna y común en poblaciones de ascendencia hispánica, sin mencionar asiáticas. La segunda variante más común, con frecuencias genotípicas y alélicas más altas, fue Q7X; al tomar en cuenta solamente a las variantes patogénicas esta mutación es, en cambio, la más común. Es más, esta fue la única variante patogénica presente en estado de homocigosis recesiva. La alta frecuencia de esta mutación entre los individuos afectados provenientes de diferentes provincias geográficas del Ecuador, así como de sus familiares, sugiere que Q7X podría ser una mutación predominante de la población ecuatoriana, del mismo modo que la mutación S199F lo es en Bogotá, Colombia, R143W en Ghana, 167delT en la población judía asquenazí, 35delG entre los caucásicos de ascendencia europea, 235delC en la población asiática y W24X en la población hindú. No se halló ninguna mutación patogénica en el grupo de individuos sanos.

Se asume que la presencia de al menos dos mutaciones patogénicas en el gen *GJB2* desencadena en hipoacusia no sindrómica recesiva. Esta condición se logró identificar en 13 individuos; por lo que se considera que resultó en su patogenicidad. Se logró determinar que la

mutación sin sentido Q7X causa hipoacusia no sindrómica recesiva (HNSR) y no una forma de hipoacusia sindrómica, como se ha sugerido.

Interesantemente, la mutación del(*GJB6-D13S1830*) no fue hallada en ninguno de los 111 individuos analizados. Al realizar otra investigación aumentando la cantidad de individuos con hipoacusia no sindrómica recesiva podríamos esperar otros resultados. Al ser la segunda mutación más común en España se esperaba tener una frecuencia mayor de ésta en esta población analizada.

Ya que este estudio, primero de su clase en el Ecuador, contiene poca cantidad de individuos no emparentados, solamente nos presenta una noción sobre el estado del país con respecto a la hipoacusia no sindrómica recesiva, existe la necesidad de ampliar el número de individuos afectados no emparentados. Al hacer esto el potencial de hallar mayor diversidad de mutaciones patogénicas incrementaría y la frecuencia de cada mutación cambiaría y se aproximaría más a la realidad. Además, de este modo también se lograría afirmar la mutación Q7X como una mutación predominante en la población ecuatoriana. A más de ampliar el número de individuos afectados sería necesario incluir más genes en otros loci y mutaciones en regiones intrónicas. Esto permitiría diagnosticar la causa genética a un mayor porcentaje de individuos afectados. Para futuros estudios, se debe considerar la posibilidad de analizar las causas genéticas de la hipoacusia no sindrómica dominante para así completar el estudio de la HNS. Al conocer las principales causas genéticas de la HNSR se podrían diseñar protocolos de tamizaje eficaces y económicos e implementar tratamientos efectivos para la mayor parte de la población afectada.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Kelley, P., Kimberling, W. 2000. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *Journal of Medical Genetics* 37: 41-43.
- Ahmad S., Tang W., Chang Q., Qu Y., Hibshman J., Li Y., Sohl G., Willecke K., Chen P., Lin X. 2007. Restoration of connexin26 protein level in the cochlea completely rescues hearing in a mouse model of human connexin30-linked deafness. *Proc Natl Acad Sci* 104:1337–1341
- Arenas-Sordo, M., Menendez, I., Hernández-Zamora, E., Sirmaci, Diana Gutiérrez-Tinajero, D., McGetrick, M., Murphy-Ruiz, P., Leyva-Juárez, X., Huesca-Hernández, F., Dominguez-Aburto, J., Tekin, M. 2012. Unique spectrum of GJB2 mutations in Mexico. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 76 (11): 1678-1680
- Bauer, P. W., Geers, A. E., Brenner, C., Moog, J. S., Smith, R. J. H. 2003. The effect of GJB2 allele variants on performance after cochlear implantation. *The Laryngoscope* 1139: 2135-2140.
- Bazazzadegan, N., Nikzat, N., Fattahi, Z., Nishimura, C., Meyer, N., Sahraian, S., Jamali, P., Babanejad, M., Kashef, A., Yazdan, H., Sabbagh Kermani, F., Taghdiri, M., Azadeh, B., Mojahedi, F., Khoshaeen, A., Habibi, H., Reyhanifar, F., Nouri, N., Smith, R., J., H., Kahrizi, K., Najmabadi, H. 2012. The spectrum of GJB2 mutations in the Iranian population with non-syndromic hearing loss-A twelve year study. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 76: 1164-74.

- Brooby, G. W., Muller-Myhsok, B., Horstmann, R. D. 1998. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *New Eng. J. Med.* 338: 548-550.
- Carrasquillo, M. M., Zlotogora, J., Barges, S., Chakravarti, A. 1997. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Human Molecular Genetics* 6: 2163-2172.
- Cordeiro-Silva, M. D. F., Barbosa, A., Santiago, M., Provetti, M., Rabbi-Bortolini, E. 2010. Prevalence of 35delG/GJB2 and del (GJB6-D13S1830) mutations in patients with non-syndromic deafness from a population of Espírito Santo-Brazil. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 76: 428-432.
- Dalamón, V., Béheran, A., Diamante, F., Pallares, N., Diamante, V., Elgoyhen, A. B. 2005. Prevalence of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hearing Research* 207: 43-49.
- Del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., Del Castillo, F. J., Alvarez, A., Tellería, D., Menéndez, I., Moreno, Felipe 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *The New England Journal of Medicine* 346: 243-249.
- Del Castillo, F. J., Rodríguez-Ballesteros, M., Álvarez, A., Hutchin, T., Leonardi, E., de Oliveira, C. A., Azaiez, H., Brownstein, Z., Avenarius, M. R., Marlin, S., Pandya, A., Shahin, H., Siemering, K. R., Weil, D., Wuyts, W., Aguirre1, L. A., Martín1, Y.,

- Moreno-Pelayo, M. A., Villamar, M., Avraham, K. B., Dahl, H-H. M., Kanaan, M., Nance, W. E., Petit, C., Smith, R. J. H., Van Camp, G., Sartorato, E. L., Murgia, A., Moreno, F., del Castillo, I. 2005. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6- d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin – 26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J. Med. Genet.* 42: 588-594.
- Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M. A., Wilcox, S. A., Lench, N. J., Allen-Powell, D. R., Allen-Powell, D. R., Osborn, A. H., Dahl, H. H., Middleton, A., Houseman, M. J., Dodé, C., Marlin, S., Boulila-ElGaïed, A., Grati, M., Ayadi, H., BenArab, S., Bitoun, P., Lina-Granade, G., Godet, J., Mustapha, M., Loiselet, J., El-Zir, E., Auboïs, A., Joannard, A., Petit, C. 1997. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics* 6: 2173-2177.
- Eisen, M. D., Ryugo, D. K. 2007. Hearing molecules: contributions from genetic deafness. *Cellular and molecular life sciences CMLS* 64: 566-580.
- Elzouki, A.Y., Nazer, H., Stapleton, F.B., Whitley, R. J., William, O.H., Harfi, H.A. 2012. *Textbook of Clinical Pediatrics. Volume I Second Edition.* Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K. pg. Elzouki, Abdelaziz Y. *Textbook of clinical pediatrics* (2 ed.). Berlin, Springer pp. 601-602.
- Farpón, R., Bañales, J. 2011. Hereditary hearing loss: genetic counselling. *Acta otorrinolaringológica española* 63 (3): 218–29.

- Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G., Melchionda, S., Petersen, M., Brøndum-Nielsen, K., Metspalu, A., Oitmaa, E., Pisano, M., Fortina, P., Zelante, L., Estivill, X. 2000. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *European journal of human genetics* EJHG 8: 19-23.
- Gerido, D. A. y White, T. W. 2004. Review. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662: 159-170.
- Gravina, L. P., Foncuberta, M. E., Prieto, M. E., Garrido, J., Barreiro, C., Chertkoff, L. 2010. Prevalence of DFNB1 mutations in Argentinean children with non-syndromic deafness. Report of a novel mutation in GJB2. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 74: 250-254.
- Green, G. E., Scott, D. A., McDonald, J. M., Woodworth, G. G., Sheffield, V. C., Smith, R. J. 1999. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *Jama The Journal Of The American Medical Association* 281: 2211-2216.
- Grifa, A., Wagner, C. A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M. D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., Gasparini, P. 1999. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nature Genet.* 23: 16-18.
- Hayashi, C., Funayama, M., Li, Y., Kamiya, K., Kawano, A., Suzuki, M., Hattori, N., Ikeda, K. 2011. Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in

- Japanese children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75: 211-214.
- Irwin, J. 2006. *Basic Anatomy and Physiology of the Ear. Infection and Hearing Impairment* 1-16.
- Joseph, A. Y., Rasool, T. J. 2009. High frequency of connexin26 (GJB2) mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the population of Kerala, India. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 73: 437-443.
- Kelley, P. M., Abe, S., Askew, J. W., Smith, S. D., Usami, S. I., Kimberling, W. J. 1999. Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 62: 172-176.
- Kenneson, A., Van Naarden Braun, K., Boyle, C. 2002. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. *Genetics in Medicine* 4: 258-274.
- Kiang, D. T., Jin, N., Tu, Z. J., Lin, H. H. 1997. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 199: 165-171.
- 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, M. B. 2008. Strong linkage disequilibrium for the frequent

- GJB2 35delG mutation in the Greek population. *American journal of medical genetics Part A* 146A: 2879-2884.
- Kudo, T., Ikeda, K., Kure, S., Matsubara, Y., Oshima, T., Watanabe, K. I., Kawase, T., Narisawa, K., Takasaka, T. 2000. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *American Journal of Medical Genetics* 90: 141-145.
- Mani, R. S., Ganapathy, A., Jalvi, R., Srikumari Srisailapathy, C. R., Malhotra, V., Chadha, S., Agarwal, A., Ramesh, A., Rangasayee, R. R., Anand, A. 2009. Functional consequences of novel connexin 26 mutations associated with hereditary hearing loss. *European journal of human genetics EJHG* 17: 502-509.
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., Tsukihara, T. 2009. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* 458: 597–602.
- Marlin, S., Feldmann, D., Blons, H., Loundon, N., Rouillon, I., Albert, S., Chauvin, P., Garabedian, E. N., Couderc, R., Odent, S., Joannard, A., Schmerbrg, S., Delobel, B., Leman, J., Journal, H., Catros, H., Lemarechal, C., Dollfus, H., Eliot, M M., Delaunoy, J. L., David, A., Calais, C., Drouin-Garraud, V., Obstoy, M. F., Goizet, C., Duriez, F., Fellmann, F., Helias, J., Vigneron, J., Montaut, B., Matin-Coignard, D., Faivre, L., Baumann, C., Lewin, P., Petit, C., Denoyelle, F. 2005. GJB2 and GJB6 mutations - Genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Archives of OtolaryngologyHead Neck Surgery* 131: 481-487.

- Martínez, A. D., Acuña, R., Figueroa, V., Maripillan, J., Nicholson, B. 2009. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxidants redox signaling* 11: 309-322.
- Matos, T. D., Simões-Teixeira, H., Caria, H., Rosa, H., O'Neill, A., Fialho, G. 2010. The controversial p.Arg127His mutation in GJB2: report on three Portuguese hearing loss family cases. *Genetic testing and molecular biomarkers* 14: 141-144.
- Menéndez, I., del Castillo, I., Carrillo, B., Villamar, M., Ponce de León, M., Uriarte, A., Moreno, F. 2001. Mutaciones del gen de la conexina 26 (GJB2) en familias Cubanas con sorderas no sindrómicas autosómicas recesivas. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 20 (3): 167-72.
- Meşe, G., Londin, E., Mui, R., Brink, P. R., White, T. W. 2004. Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Human genetics* 115: 191-199.
- Norouzi, V., Azizi, H., Fattahi, Z., Esteghamat, F., Bazazzadegan, N., Nishimura, C., Nikzat, N., Jalalvand, K., Kahrizi, K., Smith, Richard J. H., Najmabadi, H. 2011. Did the GJB2 35delG mutation originate in Iran? *American journal of medical genetics Part A* 155A: 2453-2458.
- Ortolano, S., Di Pasquale, G., Crispino, G., Anselmi, F., Mammano, F., Chiorini, J. A. 2008. Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 18776-18781.

- Pandya, A., Arnos, K. S., Xia, X. J., Welch, K. O., Blanton, S. H., Friedman, T. B., Garcia Sanchez, G., Liu Md, X. Z., Morell, R., Nance, W. E. 2003. Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genetics in medicine official journal of the American College of Medical Genetics* 5: 295-303.
- Petit, C., Levilliers, J., Hardelin, J. 2001. *Molecular Genetics of Hearing Loss. Annu. Rev. Genet.* 35: 589-646.
- Primignani, P., Trotta, L., Castorina, P., Lalatta, F., Sironi, F., Radaelli, C., Degiorgio, D., Curcio, C., Travi, M., Ambrosetti, U., Cesarani, A., Garavelli, L., Formigoni, P., Milani, D., Murri, A., Cuda, D., Coviello, D. A. 2009. Analysis of the GJB2 and GJB6 genes in Italian patients with nonsyndromic hearing loss: frequencies, novel mutations, genotypes, and degree of hearing loss. *Genetic testing and molecular biomarkers* 13: 209-217.
- Putcha, G. V., Bejjani, B. A., Bleoo, S., Booker, J. K., Carey, J. C., Carson, N., Das, Soma Dempsey, M. A., Gastier-Foster, J. M., Greinwald, J. H., Hoffmann, M. L., Jeng, L. J. B., Kenna, M. A. Khababa, I., Lilley, M., Mao, R., Muralidharan, K., Otani, I. M., Rehm, H. L., Schaefer, F., Seltzer, W. K., Spector, E. B., Springer, M. A., Weck, K. E., Wenstrup, R. J., Withrow, S., Wu, B., Zariwala, M. A., Schrijver, I. 2007. A multicenter study of the frequency and distribution of GJB2 and GJB6 mutations in a large North American cohort. *Genetics in medicine official journal of the American College of Medical Genetics* 9: 413-426.

- Rabionet, R., Gasparini, P., Estivill, X. 2000. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Human Mutation* 16: 190-202.
- Rodriguez-Paris, J., Tamayo, M. L., Gelvez, N., Schrijver, I. 2011. Allele-specific impairment of GJB2 expression by GJB6 deletion del(GJB6-D13S1854). *PloS one*, 6, e21665.
- Rothrock, C. R., Murgia, A., Sartorato, E. L., Leonardi, E., Wei, S., Lebeis, S. L., Yu, Laura E., Elfenbein, J. L., Fisher, R. A., Friderici, K. H. 2003. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Human Genetics* 113: 18-23.
- Sabag, A. D., Dagan, O., Avraham, K. B. 2005. Connexins in hearing loss: a comprehensive overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 16: 101-116.
- Samanich, J., Lowes, C., Burk, R., Shanske, S., Lu, J., Shanske, A., Morrow, B. E. 2007. Mutations in GJB2, GJB6, and mitochondrial DNA are rare in African American and Caribbean Hispanic individuals with hearing impairment. *American journal of medical genetics Part A* 143A: 830-838.
- Shearer, A., Hildebrand, M. S., Smith, R. J. 2012. Solution-based targeted genomic enrichment for precious DNA samples. *BMC Biotechnology* 12 (20): 1-6.
- Tamayo, M. L., Olarte, M., Gelvez, M., Gómez, M., Frías, J. L., Bernal, J. E., Florez, S. Medina, D. 2009. Estudios Moleculares En El Gen GJB2 (Conexina 26) En La Poblacion Sorda De Bogotá, Colombia: Resultados De Un Programa De Tamizaje. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 73: 97-101.

Tang, H., Fang, P., Ward, P., A., Schmitt, E., Darilek, S., Manolidis, S., Oghalai, J., S., Roa, B., B. Alford R., L. 2006. DNA Sequence Analysis of GJB2, Encoding Connexin 26: Observations From a Population of Hearing Impaired Cases and Variable Carrier Rates, Complex Genotypes, and Ethnic Stratification of Alleles Among Controls. *American Journal of Medical Genetics* 140: 2401-2415.

Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Söhl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J., Petit, C., Willecke, K. 2003. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Human Molecular Genetics* 12: 13-21.

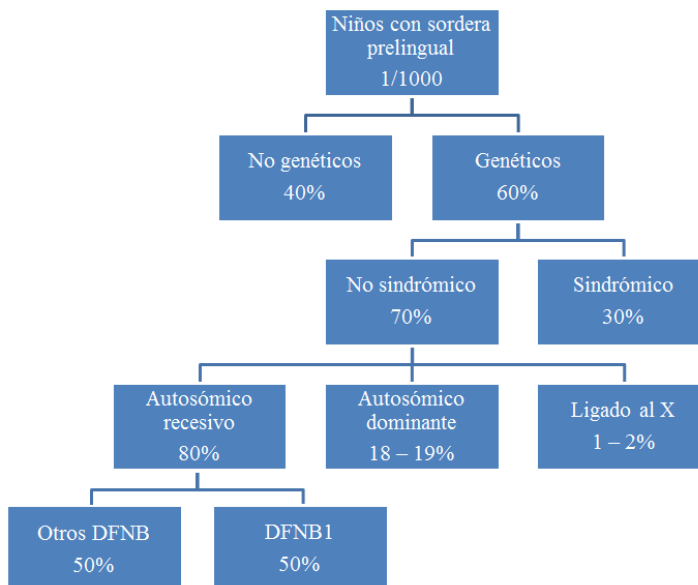
Van Laer, L., Coucke, P., Mueller, R. F., Caethoven, G., Flothmann, K., Prasad, S. D., Chamberlin, G. P., Houseman, M., Taylor, G. R., Van De Heyning, C. M., Fransen, E., Rowland, J., Cucci, R. A., Smith, R. J. H., Van Camp, G. 2001. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *Journal of Medical Genetics* 38: 515–518.

Vicepresidencia de la República del Ecuador; Misión Solidaria Manuela Espejo; Ministerio de Salud Pública del Ecuador; Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos; Fuerzas Armadas del Ecuador; República de Cuba; Organización Panamericana de la Salud. Primer Estudio Biopsicosocial Clínico Genético de las Personas con Discapacidad en el Ecuador. Datos previos a publicación. Quito, Ecuador. 133- 138.

World Health Organization Fact sheet No°300. Deafness and hearing loss. 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>. Visitada septiembre 15 del 2013.

- Wu, B.-L., Lindeman, N., Lip, V., Adams, A., Amato, R. S., Cox, G., Irons, M., Kenna, M., Korf, B., Raisen, J., Platt, O. 2002. Effectiveness of sequencing connexin 26 (GJB2) in cases of familial or sporadic childhood deafness referred for molecular diagnostic testing. *Genetics in medicine official journal of the American College of Medical Genetics* 4: 279-288.
- Wu, B.-L., Kenna, M., Lip, V., Irons, M., Platt, O. 2003. Use of a multiplex PCR/sequencing strategy to detect both connexin 30 (GJB6) 342 kb deletion and connexin 26 (GJB2) mutations in cases of childhood deafness. *American journal of medical genetics Part A* 121A: 102-108.
- Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J., Petit, C. 1999. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nature Genetics* 21: 363-369.
- Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., Milá, M., Monica, M. D., Lutfi, J., Shohat, M., Mansfield, E., Delgrosso, K., Rappaport, E., Surrey, S., Fortina, P. 1997. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics* 6: 1605-1609.
- Zoidl, G., Dermietzel, R. 2010. Gap junctions in inherited human disease. *Pflugers Archiv European journal of physiology* 460: 451-466.

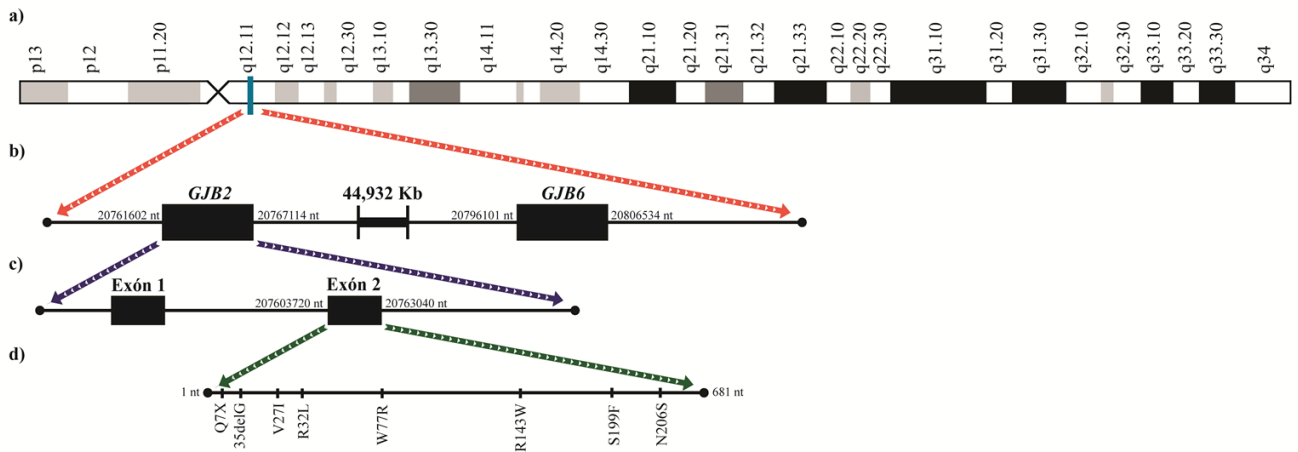
## **9. FIGURAS**



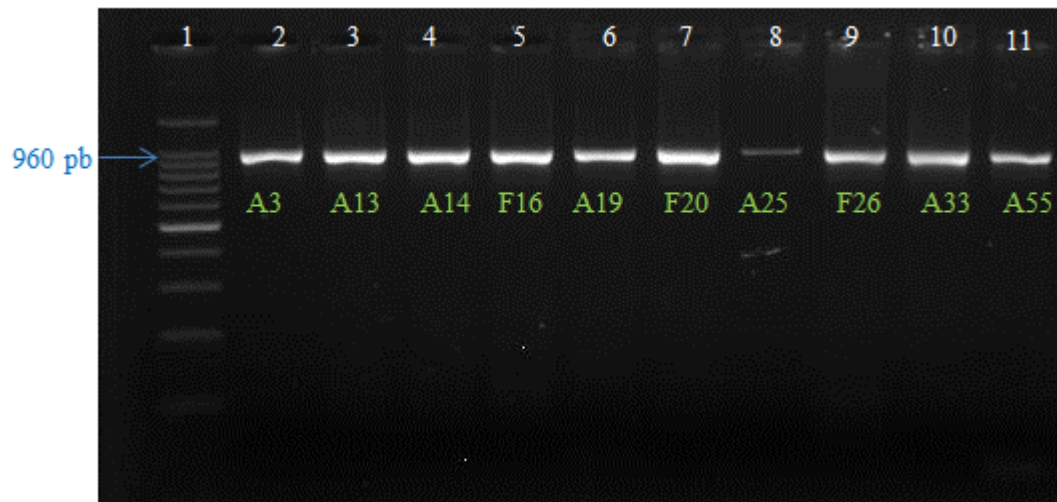
Adaptado de Shearer *et al.*, 2012

**Figura 1: Las causas más comunes para la sordera.** Se presentan los porcentajes de las causas genéticas y no genéticas; de las genéticas, el porcentaje de causas no sindrómicas y sindrómicas; entre las causas no sindrómicas, los diferentes patrones de herencia y el porcentaje de cada patrón dentro de la en los casos de hipoacusia no sindrómica; finalmente, el porcentaje de estos casos con alteraciones localizadas en el locus DFNB1 y no localizadas en este locus.

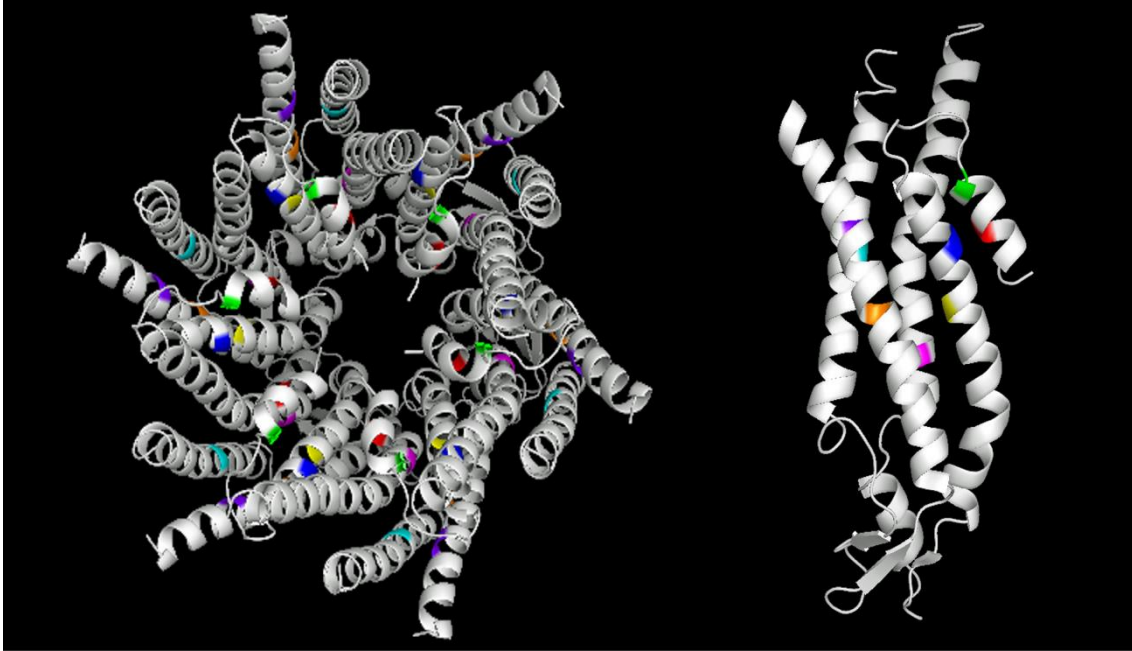
## Cromosoma 13



**Figura 2:** Ubicación del exón 2 del gen *GJB2* en el cromosoma 13. Representación del cromosoma 13 (a), los genes *GJB2* y *GJB6* se ubican en la región q12.11 en aquel cromosoma (b), el exón 2 se ubica en el gen *GJB2* (c). También se representan las ocho mutaciones halladas en este exón en esta población estudio (d).

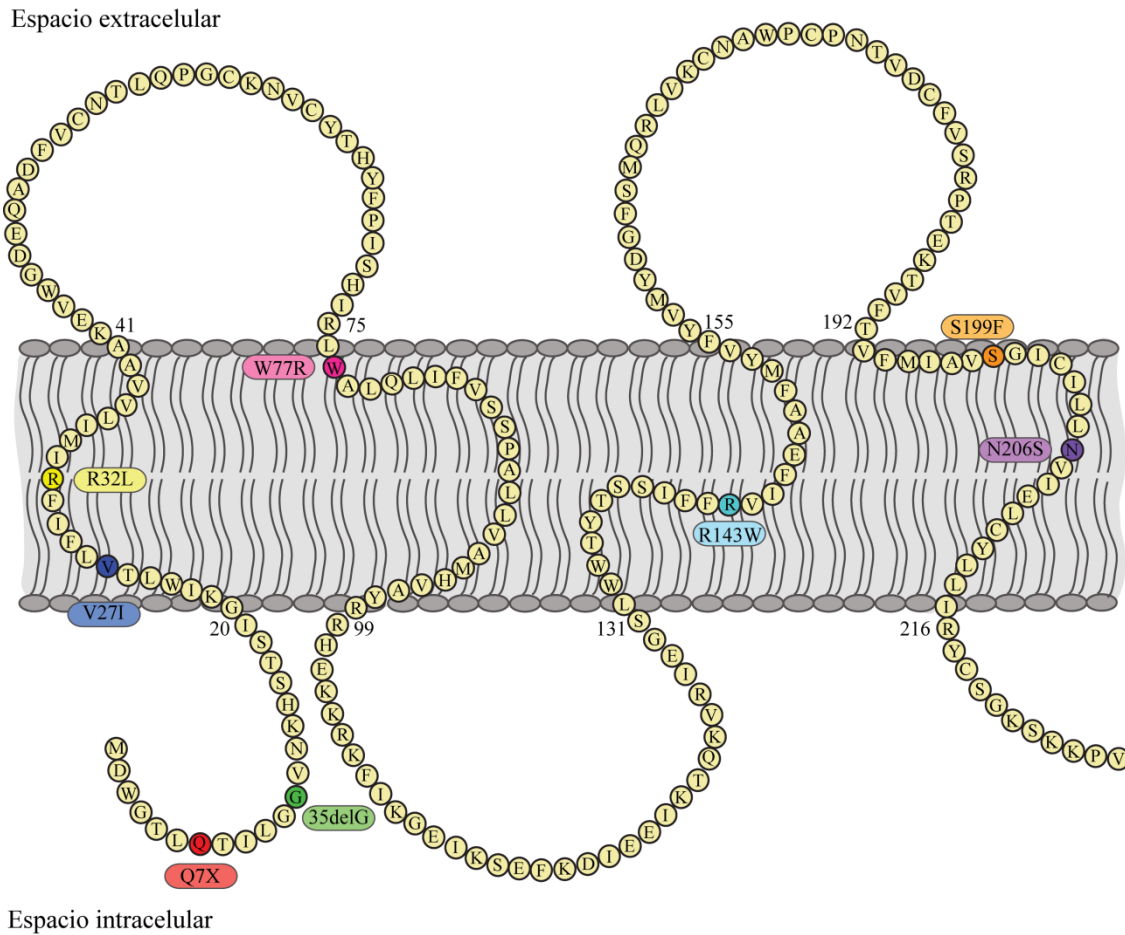


**Figura 3: Amplificación del gen *GJB2* mediante PCR.** Se representa un gel de agarosa al 1,5% con varias muestras de la población. Los iniciadores para esta PCR amplifican un fragmento de 960 pb (flecha azul) el cual contiene al exón 2 del gen *GJB2*. El pocillo #1 pertenece a la escalera molecular de 100 pb.

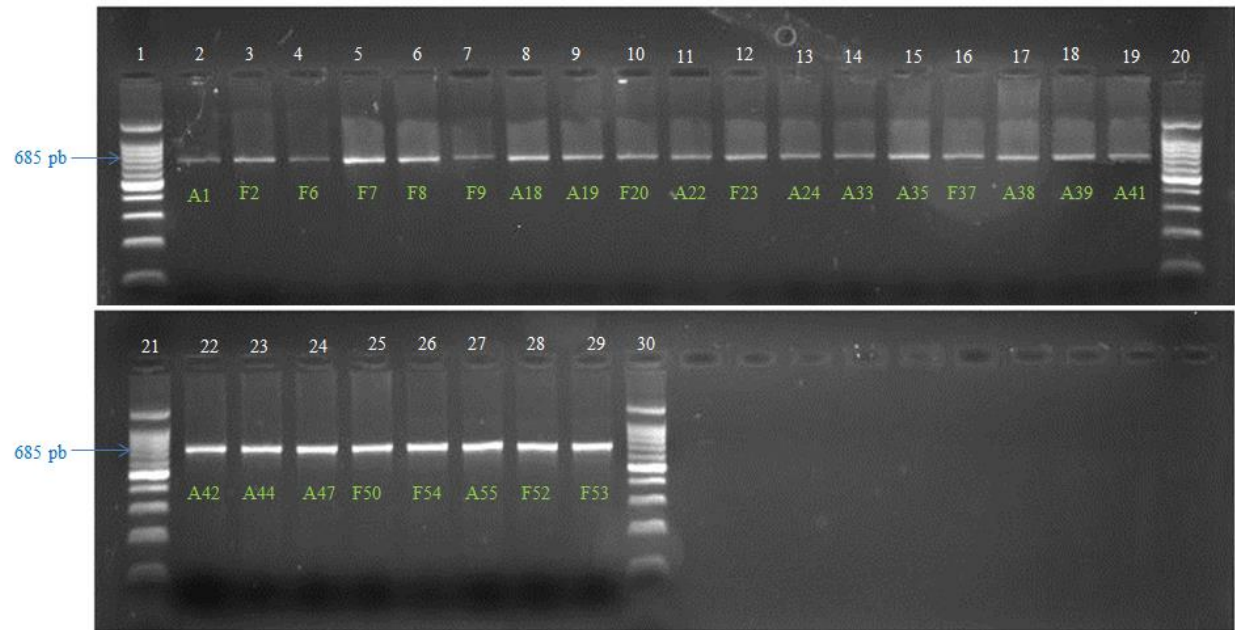


Adaptado de Maeda *et al.*, 2009

**Figura 4: La estructura tridimensional de la Cx26 a 3,5 Angstrom.** Un conexón compuesto por la Cx26 (izquierda); una sola conexina (derecha) compuesta de 226 aminoácidos. Cada mutación se la representa con un color distinto: Q7X (rojo), 35delG (verde), V27I (azul) R32L (amarillo), W77R (rosado), R143W (celeste), S199F (naranja) y N206 (purpura).

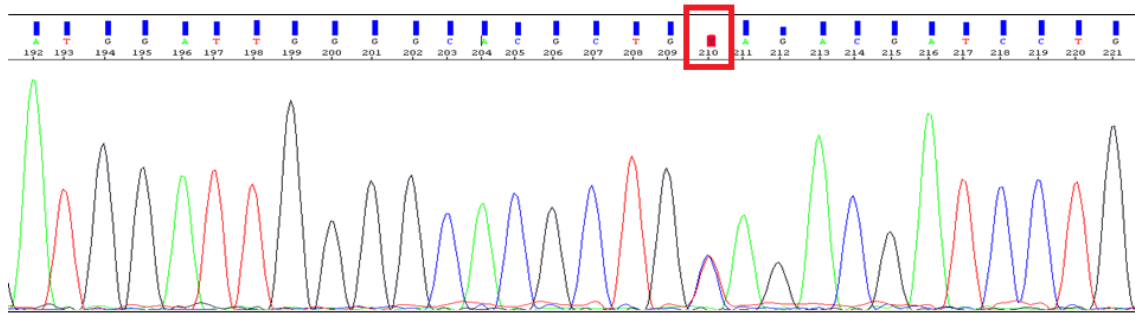


**Figura 5:** Esquema representativa de los aminoácidos que componen la conexina 26. Se representan los 226 aminoácidos de la conexina 26 más las ocho variaciones halladas en este estudio. La membrana plasmática permite visualizar el dominio de cada aminoácido.

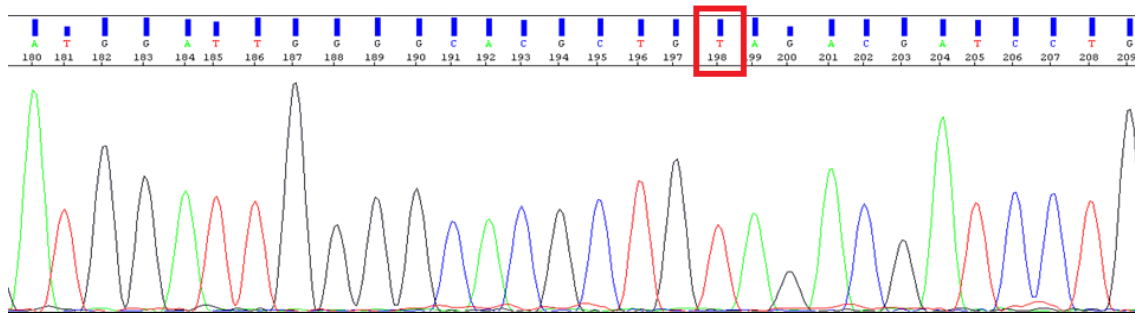


**Figura 6: Resultados de la PCR multiplex para la detección de la delección del(*GJB6-D13S1830*).** Se representan los resultados del análisis para varios individuos; el fragmento de 685 pb permite detectar el genotipo normal, la cual tienen todos; esto les hace homocigotos para el alelo silvestre.

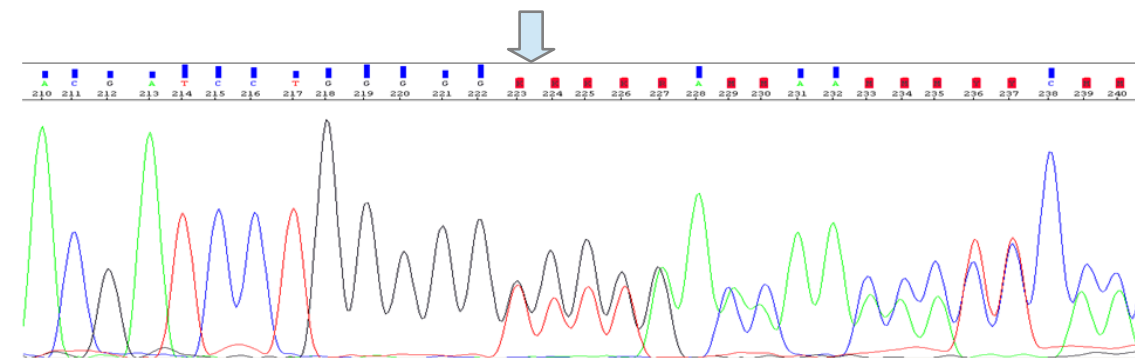
**Figura 7: Imágenes de las secuencias de cada variación alélica presentados por Seq Scape v2.6 de Applied Biosystems, (a) Q7X, (b) 35delG, (c) V27I, (d) R32L, (e) W77R, (f) R143W, (g) S199F, (h) N206S.**



(a) Estado heterocigoto de la mutación sin sentido Q7X.

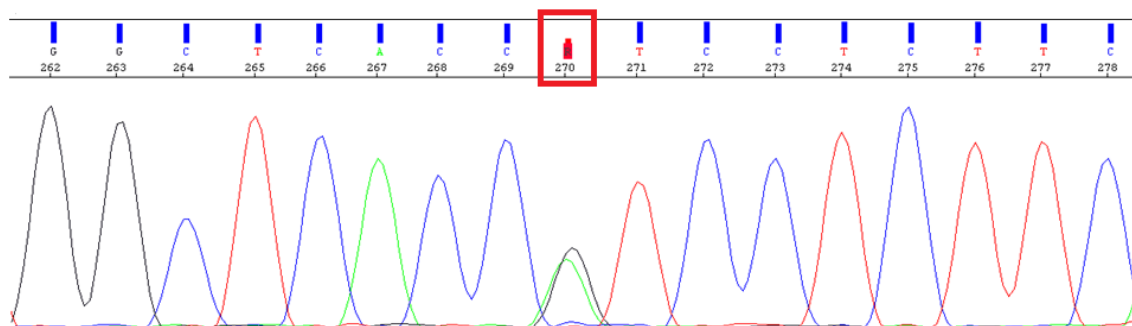


(a.1) Estado homocigoto de la mutación sin sentido Q7X.

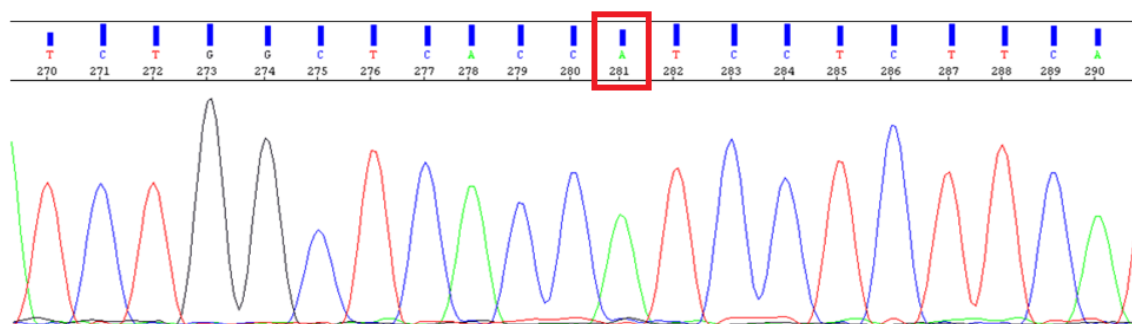


(b) Estado heterocigoto con cambio de marco de lectura 35delG.

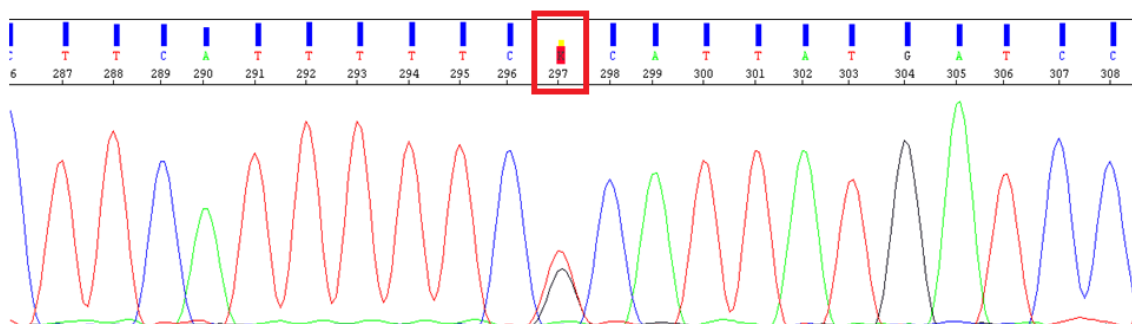
**Figura 7: Imágenes de las secuencias de cada variación alélica presentados por Seq Scape v2.6 de Applied Biosystems, (a) Q7X, (b) 35delG, (c) V27I, (d) R32L, (e) W77R, (f) R143W, (g) S199F, (h) N206S (Continuación...).**



(c) Estado heterocigoto de la mutación con cambio de sentido V27I.

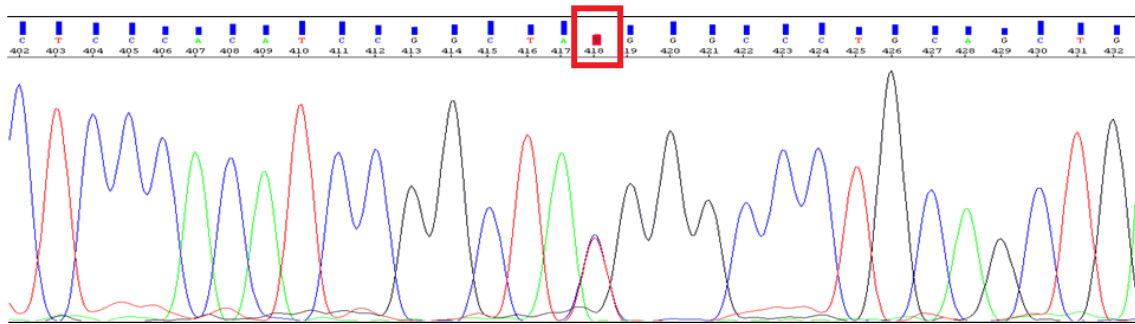


(c.1) Estado homocigoto de la mutación con cambio de sentido V27I.

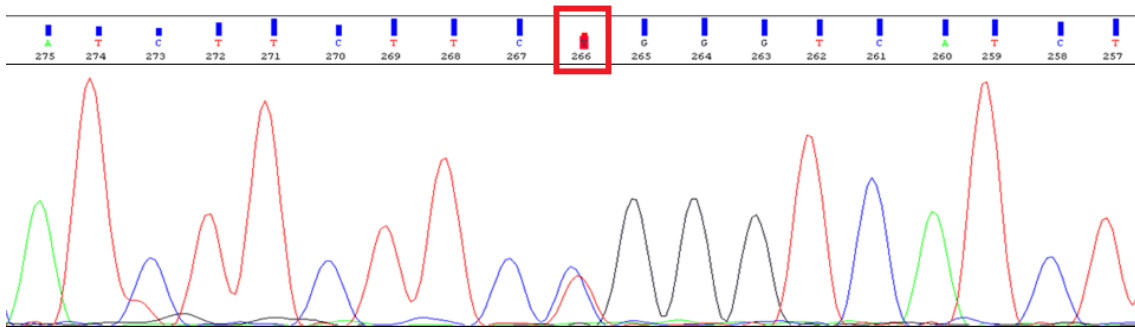


(d) Estado heterocigoto de la mutación con cambio de sentido R32L.

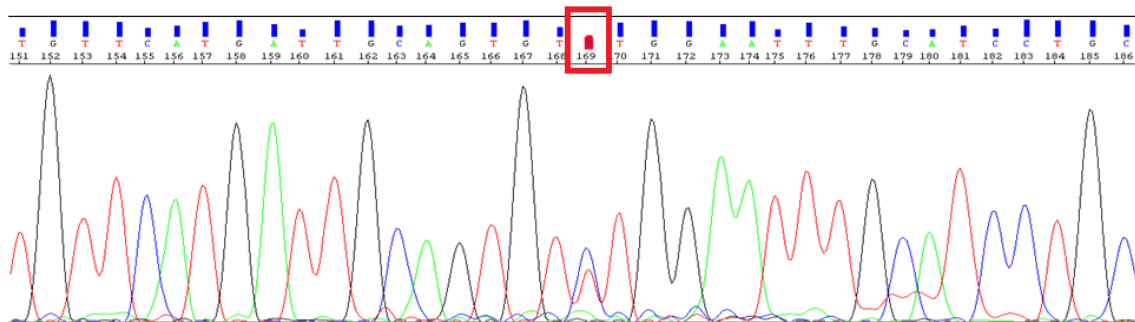
**Figura 7: Imágenes de las secuencias de cada variación alélica presentados por Seq Scape v2.6 de Applied Biosystems, (a) Q7X, (b) 35delG, (c) V27I, (d) R32L, (e) W77R, (f) R143W, (g) S199F, (h) N206S (Continuación...).**



(e) Estado heterocigoto de la mutación con cambio de sentido W77R.

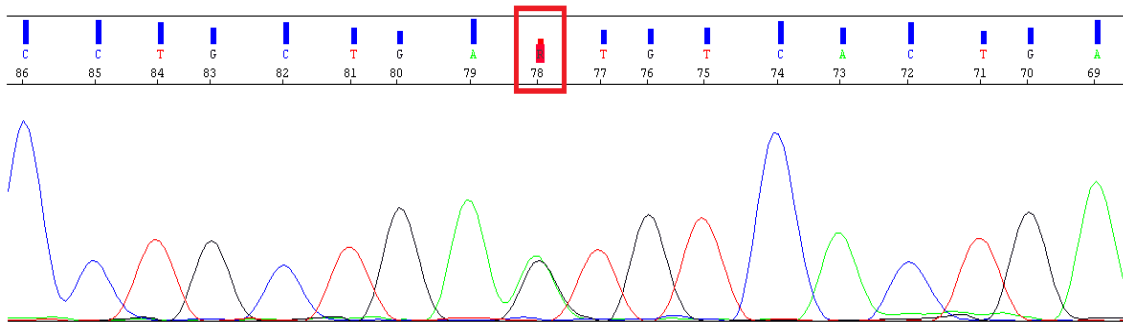


(f) Estado heterocigoto de la mutación con cambio de sentido R143W.



(g) Estado heterocigoto de la mutación con cambio de sentido S199F.

**Figura 7: Imágenes de las secuencias de cada variación alélica presentados por Seq Scape v2.6 de Applied Biosystems, (a) Q7X, (b) 35delG, (c) V27I, (d) R32L, (e) W77R, (f) R143W, (g) S199F, (h) N206S (Continuación...).**



(h) Estado heterocigoto de la mutación con cambio de sentido N206S.

## 10. TABLAS

**Tabla 1: Datos generales sobre los afectos de la población de estudio.**

Variable	n = 26
<b>Edad</b>	
<16	20
24-67	6
<b>Genero</b>	
F	9
M	17
<b>Clase de hipoacusia</b>	
Neurosensorial	19
Mixta	0
Conductiva	0
Mixto-neurosensorial	2
n/a <sup>a</sup>	5
<b>Edad de ocurrencia</b>	
Congénito	4
1m - 1a	1
>1a <2a	5
>2a - 3a	3
n/a	5

<sup>a</sup>Información no disponible

**Tabla 2: Número de afectos con mutaciones patogénicas en el locus DFNB1A (bialélica o monoalélica), en el locus DFNB1B (del(*GJB6-D13S1830*)) y sin mutaciones en el locus DFNB1.**

	<b>DFNB1A bialélica</b>	<b>DFNB1A monoalélica</b>	<b>DFNB1B</b>	<b>No DFNB1</b>
(n = 26)	13 (50%)	3 (11,5%)	0	10 (38,5%)

**Tabla 3: Descripción de cada una de las mutaciones y sus frecuencias.** Se describe el cambio nucleotídico y proteico, tipo de mutación, el dominio de la proteína de cada variación hallada y la frecuencia de cada variación en relación al número total de alelos.

<b>Cambio nucleotídico</b>	<b>Cambio proteico</b>	<b>Tipo de mutación</b>	<b>Dominio</b>	<b># de alelos / alelos totales (%)</b>
C19T	Q7X	Sin sentido	1 Intracelular (IC1)	19/104 (18,3)
35delG	G12V	Cambio en marco de lectura	1 Transmembranal (TM1)	3/104 (2,8)
G79A	V27I	Cambio de sentido	1 Transmembranal (TM1)	61/104 (58,9)
G95T	R32L	Cambio de sentido	1 Transmembranal (TM1)	7/104 (6,7)
T229C	W77R	Cambio de sentido	2 Transmembranal (TM2)	5/104 (4,8)
C427T	R143W	Cambio de sentido	3 Transmembranal (TM3)	4/104 (3,8)
C596T	S199F	Cambio de sentido	4 Transmembranal (TM4)	3/104 (2,8)
G617A	N206S	Cambio de sentido	4 Transmembranal (TM4)	2/104 (1,9)

**Tabla 4: Las frecuencias genotípicas de los afectos (Afct), sanos (San), familiares (Fam) y de los tres grupos juntos (Todos) para cada mutación, y las frecuencias alélicas de los afectos, sanos, familiares y todos. Se incluye el valor  $p$  del equilibrio Hardy-Weinberg para cada mutación de todos los individuos.**

Mutación	Genotipo	Frecuencia genotípica				Frecuencia alélica				HWE <sup>a</sup> , $P$
		Afct	San	Fam	Todos	Afct	San	Fam	Todos	
Q7X	CC	0,61	1	0,79	0,85	0,74	1	0,89	0,91	0,789
	CT	0,27	0	0,21	0,12					
	TT	0,12	0	0	0,03	0,26	0	0,11	0,09	
35delG	GG	0,96	1	0,93	0,97	0,98	1	0,96	0,99	0,987
	G/-	0,04	0	0,07	0,03					
	-/-	0	0	0	0	0,02	0	0,04	0,01	
V27I	GG	0,54	0,61	0,5	0,57	0,71	0,77	0,66	0,73	0,887
	GA	0,35	0,33	0,32	0,33					
	AA	0,11	0,06	0,18	0,1	0,29	0,23	0,34	0,27	
R32L	GG	0,77	1	0,96	0,94	0,89	1	0,98	0,97	0,896
	GT	0,23	0	0,04	0,06					
	TT	0	0	0	0	0,11	0	0,02	0,03	
W77R	TT	0,89	1	0,93	0,96	0,94	1	0,96	0,98	0,953
	TC	0,11	0	0,07	0,04					
	CC	0	0	0	0	0,06	0	0,04	0,02	
R143W	CC	0,92	1	0,93	0,96	0,96	1	0,96	0,98	0,966
	CT	0,08	0	0,07	0,04					
	TT	0	0	0	0	0,04	0	0,04	0,02	
S199F	CC	0,89	1	1	0,97	0,94	1	1	0,99	0,953
	CT	0,11	0	0	0,03					
	TT	0	0	0	0	0,06	0	0	0,01	
N206S	AA	0,96	1	0,96	0,98	0,98	1	0,98	0,99	0,983
	AG	0,04	0	0,04	0,02					
	GG	0	0	0	0	0,02	0	0,02	0,01	

<sup>a</sup> Equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los individuos.

**Tabla 5: Número de afectados, sanos y familiares con cada genotipo.** Debajo de cada columna se incluye la suma de los individuos dentro de cada grupo con uno de los 16 genotipos. Además, se incluye el total de individuos con cada genotipo (fila).

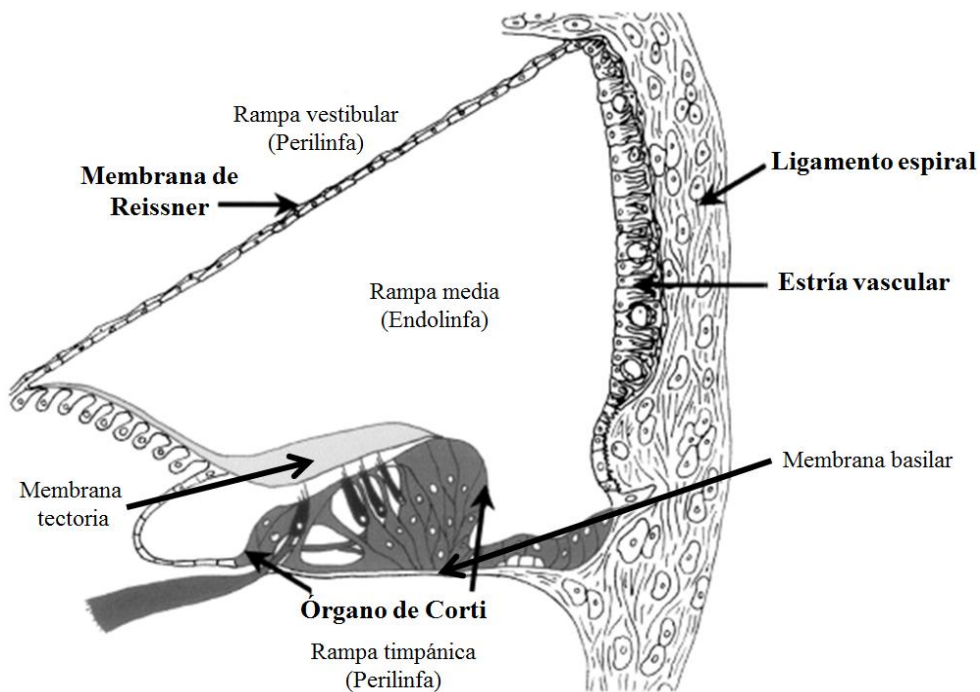
<b>Genotipo, n = 16</b>	<b>Afectos, n = 26</b>	<b>Sanos, n = 57</b>	<b>Familiares, n = 28</b>	<b>Total</b>
Q7X/Q7X	3	-	-	3
Q7X/V27I/R32L	4	-	-	4
Q7X/S199F	3	-	-	3
35delG/W77R	1	-	-	1
W77R/R143W	2	-	-	2
Q7X/V27I	-	-	3	3
V27I/V27I	1	3	5	9
V27I/V27I/R32L	2	-	1	3
V27I/35delG	-	-	1	1
V27I/N206S	-	-	1	1
Q7X/wt	-	-	3	3
V27I/wt	5	19	4	28
35delG/wt	-	-	1	1
W77R/wt	-	-	2	2
R143W/wt	-	-	2	2
N206S/wt	1	-	-	1
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>67</b>

**Tabla 6: Tabla comparativa de los 14 genotipos con al menos un alelo patogénico.** Los genotipos se encontraron en 30 individuos de los grupos afectados y familiares (n = 54). No se encontró ninguno individuo con hipoacusia de grado leve.

<b>No. de genotipos por grado de hipoacusia de los afectados y familiares (n = 54)</b>						
<b>Genotipo, n = 14</b>	<b># de individuos</b>	<b>Moderada</b>	<b>Severa</b>	<b>Profunda</b>	<b>Grado de hipoacusia n/a</b>	<b>Sin hipoacusia</b>
Q7X/Q7X	3	-	-	3	-	-
Q7X/V27I/R32L	4	-	2	2	-	-
Q7X/S199F	3	-	-	2	1	-
35delG/W77R	1	-	-	1	-	-
W77R/R143W	2	-	-	2	-	-
Q7X/V27I	3	-	-	-	-	3
V27I/V27I/R32L	3	-	-	-	2	1
V27I/35delG	1	-	-	-	-	1
V27I/N206S	1	-	-	-	-	1
35delG/wt	1	-	-	-	-	1
Q7X/wt	3	-	-	-	-	3
W77R/wt	2	-	-	-	-	2
R143W/wt	2	-	-	-	-	2
N206S/wt	1	0,5 <sup>a</sup>	0,5	-	-	-
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>0,5</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>14</b>

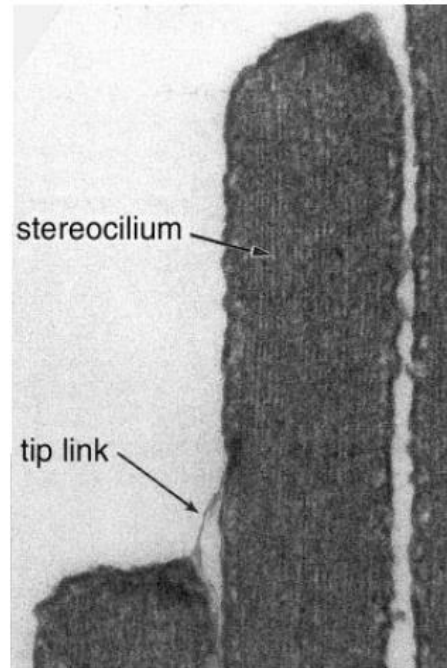
<sup>a</sup>0,5 representa 1 individuo con hipoacusia moderada en el oído izquierdo y severa en el oído derecho.

## **11. ANEXOS**



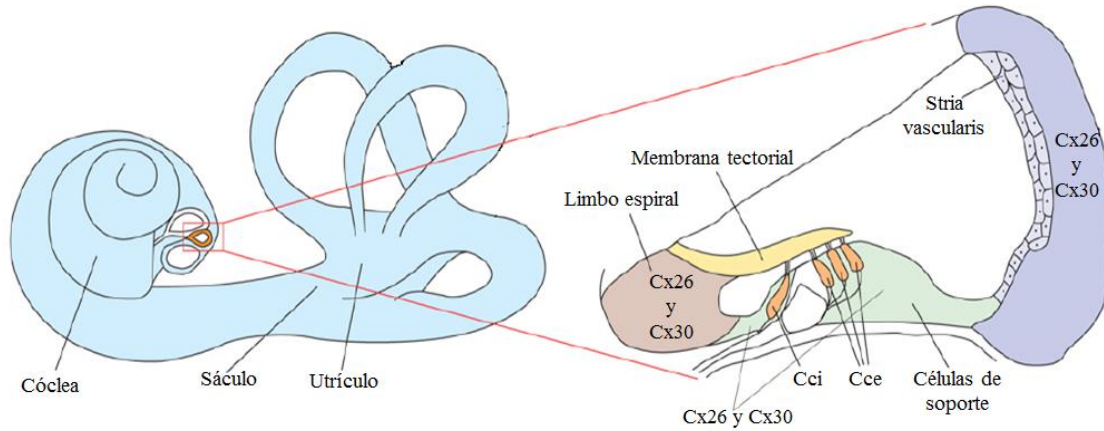
Adaptado de Irwin, 2006

**Anexo 1: Corte transversal de una sección de la cóclea.** La imagen del corte transversal permite visualizar el órgano de Corti ubicado sobre la membrana basilar y por debajo de la membrana tectoria, la membrana de Reissner, el ligamento espiral, la estría vascular y las tres rampas: la vestibular, la timpánica y la media, las primeras dos con perilinfa y la última con endolinf.



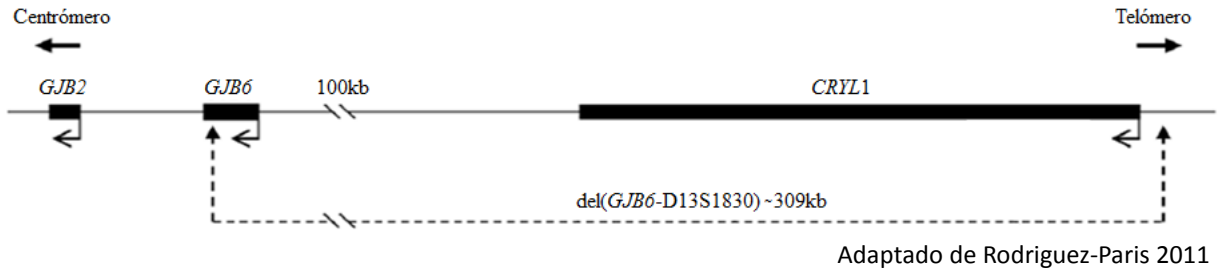
Adaptado de Petit *et al.*, 2001

**Anexo 2: Imagen detallada de los estereocilios.** Tres estereocilios adyacentes y un enlace de punta (tip link) que los conecta.



Adaptado de Sabag *et al.*, 2005

**Anexo 3: Localización de las conexinas 26 y 30 en la cóclea.** Las conexinas se hallan en el limbo espiral, las células de soporte y en la estría vascular; además, se representa, la ubicación de las células ciliadas internas y células ciliadas externas y la membrana tectoria.



**Anexo 4: Ubicación del gen *GJB6* y región afectada por del(*GJB6*-D13S1830).** Diagrama a escala representando la ubicación relativa de 3 genes (*GJB2*, *GJB6* y *CRYL1*), el sitio del inicio de transcripción de cada uno (flechas curvas), la dirección en la que se encuentra el centrómero y el telómero y el rango delecionado por la deleción del(*GJB6*-D13S1830) (línea de puntos).

**Anexo 5: Base de datos, incluye información tomada de las fichas médicas de los individuos del grupo afectos (A#) junto con información referente de los parientes (F#) de los mismos y la representación de los genotipos de ambos grupos referente al gen *GJB2* (a). HN representa hipoacusia neurosensorial. Presentación del genotipo para cada uno de los individuos sanos (S#) no emparentados con los casos (b).**

**(a)**

Código	Edad	Familia	Sexo	Estado clínico	Origen geográfico de los abuelos	Edad de inicio de sordera	Mutación							
							Q7X	35delG	V27I	R32L	W77R	R243W	S199F	N206S
A44	3a6m	F1	M	HN profunda bilateral	Loja-Esmeraldas	Congénito	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F43	24a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F52	49a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F53	28a		M	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F54	24a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A18	10a5m	F2	M	HN profunda bilateral	Bolívar	Congénito	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
A19	56a		F	HN moderada OI y severa OD	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AG
A47	24a		M	Hipoacusia n/a	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F20	28a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AG
F23	29a		M	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F46	2a7m		M	No	n/a	n/a	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
A49	14a	F3	F	HN profunda bilateral	Tungurahua	1a	TT	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F48	40a		M	No	n/a	n/a	CT	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F50	17a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
F51	39a		F	No	n/a	n/a	CT	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
A3	5a3m	F4	M	HN profunda bilateral	Cotopaxi	3m	CT	GG	GG	GG	TT	CC	CT	AA
A4	26a		F	Hipoacusia n/a	n/a	n/a	CT	GG	GG	GG	TT	CC	CT	AA
A5	8a		M	HN profunda bilateral	Cotopaxi	1a8m	CT	GG	GG	GG	TT	CC	CT	AA

**Anexo 5: Base de datos, incluye información tomada de las fichas médicas de los individuos del grupo afectos (A#) junto con información referente de los parientes (F#) de los mismos y la representación de los genotipos de ambos grupos referente al gen *GJB2* (a). HN representa hipoacusia neurosensorial. Presentación del genotipo para cada uno de los individuos sanos (S#) no emparentados con los casos (b) (Continuación...).**

**(a)**

Código	Edad	Familia	Sexo	Estado clínico	Origen geográfico de los abuelos	Edad de inicio de sordera	Mutación							
							Q7X	35delG	V27I	R32L	W77R	R243W	S199F	N206S
F2	28a		F	No	n/a	n/a	CT	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A42	41a	F5	F	Hipoacusia n/a	n/a	n/a	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
A8	2a11m		M	HN severa bilateral	Tungurahua-Guayas	8m	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F37	58a		M	No	n/a	n/a	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
F7	6a8m		M	No	n/a	n/a	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F9	27a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
A13	8a	F6	M	HN severa bilateral	Chimborazo-Pichincha	Congénito	CT	GG	GA	GT	TT	CC	CC	AA
A14	12a4m		M	HN severa bilateral	Chimborazo-Pichincha	1a8m	CT	GG	GA	GT	TT	CC	CC	AA
A24	35a		M	Hipoacusia n/a	n/a	n/a	CC	GG	AA	GT	TT	CC	CC	AA
F15	39a		M	No	n/a	n/a	CC	GG	AA	GT	TT	CC	CC	AA
F16	35a		F	No	n/a	n/a	CT	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A10	4a4m	F7	M	HN profunda bilateral	Azuay	4m	TT	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A17	5a6m		F	HN profunda bilateral	Azuay	11m	TT	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A22	11a2m		F	HN profunda bilateral	Azuay	1a6m	CT	GG	GA	GT	TT	CC	CC	AA
F11	30a		F	No	n/a	n/a	CT	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F12	28a		M	No	n/a	n/a	CT	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A35	11a3m	F8	F	HN profunda bilateral	Azuay	2a	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
A38	9a2m		M	HN profunda bilateral	Azuay	Congénito	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA

**Anexo 5: Base de datos, incluye información tomada de las fichas médicas de los individuos del grupo afectos (A#) junto con información referente de los parientes (F#) de los mismos y la representación de los genotipos de ambos grupos referente al gen *GJB2* (a). HN representa hipoacusia neurosensorial. Presentación del genotipo para cada uno de los individuos sanos (S#) no emparentados con los casos (b) (Continuación...).**

(a)

Código	Edad	Familia	Sexo	Estado clínico	Origen geográfico de los abuelos	Edad de inicio de sordera	Mutación							
							Q7X	35delG	V27I	R32L	W77R	R243W	S199F	N206S
A39	12a1m		M	HN severa OI y mixta moderada OD	Azuay	3m	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A41	15a4m		M	HN profunda OI y mixta moderada OD	Azuay	3a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F34	37a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F36	43a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F40	40a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
A55	67a	F9	M	Hipoacusia n/a	n/a	n/a	CC	GG	AA	GT	TT	CC	CC	AA
A56	5a		M	HN profunda bilateral	Imbabura	2m	CT	GG	GA	GT	TT	CC	CC	AA
A1	4a6m	F10	F	HN bilateral profunda	Manabí	1a	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F6	23a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
A25	5a	F11	M	HN profunda bilateral	Napo-Tungurahua	1a6m	CC	G-	GG	GG	TC	CC	CC	AA
A32	15a		F	HN profunda bilateral	Napo-Tungurahua	3m	CC	GG	GG	GG	TC	CT	CC	AA
A33	5a		M	HN profunda bilateral	Napo-Tungurahua	1a	CC	GG	GG	GG	TC	CT	CC	AA
F26	37a		M	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TC	CC	CC	AA
F27	25a		F	No	n/a	n/a	CC	G-	GA	GG	TT	CC	CC	AA
F28	2a4m		F	No	n/a	n/a	CC	G-	GG	GG	TT	CC	CC	AA
F29	39a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CT	CC	AA
F30	12a		F	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TT	CT	CC	AA
F31	41a		M	No	n/a	n/a	CC	GG	GG	GG	TC	CC	CC	AA

**Anexo 5: Base de datos, incluye información tomada de las fichas médicas de los individuos del grupo afectos (A#) junto con información referente de los parientes (F#) de los mismos y la representación de los genotipos de ambos grupos referente al gen *GJB2* (a). HN representa hipoacusia neurosensorial. Presentación del genotipo para cada uno de los individuos sanos (S#) no emparentados con los casos (b) (Continuación...).**

**(b)**

<b>Código</b>	<b>Q7X</b>	<b>35delG</b>	<b>V27I</b>	<b>R32L</b>	<b>W77R</b>	<b>R143W</b>	<b>S199F</b>	<b>N206S</b>
S2	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S3	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S4	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S5	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S6	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S7	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S9	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S10	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S12	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S13	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
S14	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S29	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S30	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S31	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S32	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S34	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S35	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S36	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S37	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S38	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S39	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S40	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S41	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S42	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S43	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA

**Anexo 5: Base de datos, incluye información tomada de las fichas médicas de los individuos del grupo afectos (A#) junto con información referente de los parientes (F#) de los mismos y la representación de los genotipos de ambos grupos referente al gen *GJB2* (a). HN representa hipoacusia neurosensorial. Presentación del genotipo para cada uno de los individuos sanos (S#) no emparentados con los casos (b) (Continuación...).**

**(b)**


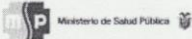
<b>Código</b>	<b>Q7X</b>	<b>35delG</b>	<b>V27I</b>	<b>R32L</b>	<b>W77R</b>	<b>R143W</b>	<b>S199F</b>	<b>N206S</b>
S44	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S45	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S46	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S47	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S48	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S49	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S50	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S51	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S52	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S53	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S54	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S55	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S56	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S57	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S58	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S59	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S60	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S61	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S62	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
S63	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S64	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S65	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S66	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S67	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S68	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA

**Anexo 5: Base de datos, incluye información tomada de las fichas médicas de los individuos del grupo afectos (A#) junto con información referente de los parientes (F#) de los mismos y la representación de los genotipos de ambos grupos referente al gen *GJB2* (a). HN representa hipoacusia neurosensorial. Presentación del genotipo para cada uno de los individuos sanos (S#) no emparentados con los casos (b) (Continuación...).**

**(b)**

<b>Código</b>	<b>Q7X</b>	<b>35delG</b>	<b>V27I</b>	<b>R32L</b>	<b>W77R</b>	<b>R143W</b>	<b>S199F</b>	<b>N206S</b>
S69	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S70	CC	GG	AA	GG	TT	CC	CC	AA
S71	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S72	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S73	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA
S74	CC	GG	GG	GG	TT	CC	CC	AA
S75	CC	GG	GA	GG	TT	CC	CC	AA

## Anexo 6: Copia de la declaración del consentimiento informado.

Hospital Pediátrico Baca Ortiz

(ANEXO 3)  
DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Sr./Sra. ...., de .... años de edad y con cédula de identidad n° ....., como representante legal del niño/a ....., manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer la extracción/toma de sangre o material biológico o procedimiento terapéutico para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado:

“.....” con el fin de mejorar los resultados clínicos de del Hospital Baca Ortiz.

He sido informado/a de los posibles perjuicios que la extracción/toma de sangre o material biológico o tratamiento terapéutico que puede tener sobre mi bienestar y salud.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la Declaración de Helsinki y Código de Ética Médica del Ecuador.

He sido informado de que el material biológico que cedo será utilizado exclusivamente con finalidad de investigación sin ánimo de lucro, o bien hacerlo constar así en un escrito firmado por el cedente.

Tomando ello en consideración, **doy mi consentimiento** a que esta extracción/toma tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Quito, a .... de ....., de 20....

Fdo. Sr/Sra

[WWW.hospitalbacaortiz](http://WWW.hospitalbacaortiz) (aquí va la dirección on-line de descarga)

**Anexo 7: Copia de la ficha médica para cada paciente.****HIPOACUSIAS HEREDITARIAS**

Nombre:  
 Fecha de nacimiento:  
 Dirección particular:  
 Teléfono:  
 Origen geográfico de los abuelos:  
 Origen racial (rellenar sólo si es relevante; ej. gitanos, judíos, raza negra, etc...):  
 Fecha de envío:

**ANTECEDENTES FAMILIARES (adjuntar siempre un árbol genealógico).**

De hipoacusia: Sí  No   
 Fenotipo o enfermedad familiar:

**ANTECEDENTES PERSONALES**

Otóxicos: Sí  No  ¿cúal?  
 Exposición a ruido: Sí  No   
 Características clínicas sugerentes de hipoacusia sindrómica: Sí  No  ¿Cuáles?  
 Anomalías dermatológicas o en la pigmentación:  
 Anomalías en los dedos:  
 Anomalías oculares:  
 Anomalías óseas:  
 Trastornos endocrinológicos o metabólicos (tiroides, diabetes...)  
 Trastornos neurológicos (epilepsia, retraso mental....)  
 Otros (especificar):

**PATOLOGÍA ACTUAL**

Edad de inicio de la sordera:  
 Evolución (progresiva /estable /fluctuante):  
 Etiología más probable:  
 Síntomas asociados: Acúfenos (Tinnitus)  Mareos  Otros:

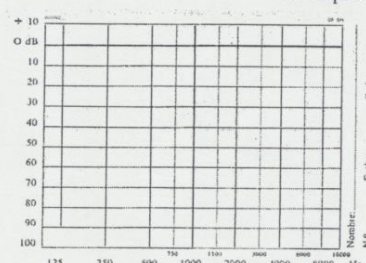
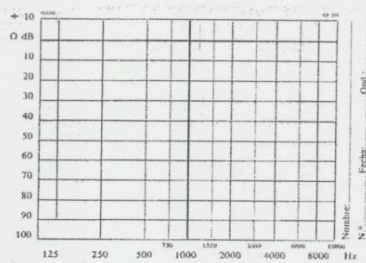
**EXPLORACIÓN FÍSICA Y PRUEBAS COMPLEMENTARIAS**

Anomalías en pabellón auricular o conducto auditivo externo:  
 Otoscopia:

Audiometría:

O. Dcho.

O. Izqdo.



Timpanograma: Normal  Aplanado  Desviado

**OTROS DATOS DE INTERÉS**

Resultados (si los hay) de:

Test del perclorato, ECG, pruebas vestibulares, estudio oftálmico.  
 Otoemisiones acústicas:  
 PEATC:  
 TAC:  
 RMN:

**Anexo 8. Iniciadores para la detección de los genes (a) *GJB2* y (b) del(*GJB6-D13S1830*) del gen *GJB6*.**

<b>(a) <i>GJB2</i></b>	Secuencia 5'-3'	Longitud	Tm	GC%
Forward	ACACGTTCAAGAGGGTTTGG	20	60.01	50.00
Reverse	CCTCATCCCTCTCATGCTGT	20	60.22	55.00
Tamaño de fragmento	960 pb			
<b>(b) <i>GJB6</i></b>	Secuencia 5'-3'	Longitud	Tm	GC%
Forward	TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT	24	66.00	42.00
Reverse1	CACCATTGCGTAGCCTTAACCATTTT	25	66.00	44.00
Reverse2	TCATCGGGGGTGTCAACAAACA	22	68.00	50.00
Tamaño de fragmento f-rv1	= 685 pb			
Tamaño de fragmento f-rv2	= 460 pb			

**Anexo 9: Volúmenes y concentraciones para la PCR del gen *GJB2*.**

<b>Reactivos</b>	<b>[Stock]</b>		<b>[Diluido]</b>		<b>[Final]</b>		<b>Vol x1</b>
Buffer	10	x			1,50	x	3,75
MgCl <sub>2</sub>	50	mM			1,50	mM	0,75
dNTPs	100	mM	10	mM	0,50	mM	1,25
FW	100	μM	10	μM	0,40	μM	1,00
RV	100	μM	10	μM	0,40	μM	1,00
Taq Pol	5	U/μl			1,00	U/μl	0,20
ADN			5	ng/μl	5,00	ng/μl	2,00
H <sub>2</sub> O							15,05
Volumen Total							25

**Anexo 10: Volúmenes y concentraciones para la PCR de la delección del(*GJB6-D13S1830*).**

<b>Reactivos</b>	<b>[Stock]</b>		<b>[Diluido]</b>		<b>[Final]</b>		<b>Vol x1</b>
Buffer	10	x			1,50	x	3,75
MgCl <sub>2</sub>	50	mM			1,50	mM	0,75
dNTPs	100	mM	10	mM	0,40	mM	1,00
Fw	100	μM	10	μM	0,25	μM	0,63
Rv1	100	μM	10	μM	0,25	μM	0,63
Rv2	100	μM	10	μM	0,25	μM	0,63
Taq Pol	5	U/μl			0,75	U/μl	0,15
ADN			5	ng/μl	5,00	ng/μl	2,00
H <sub>2</sub> O							15,48
<b>Volumen Total</b>							<b>25</b>