
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

ESTUDIO GENÉTICO DE HIPOACUSIA EN FAMILIAS DE ARGENTINA

Raúl A Reynoso*; Silvia Hendl*; Maria E Barteik*; Carlos A Curet*; Luis Nicemboin**;
José Moreno Barral*. Montserrat Rodríguez Ballesteros***; Ignacio Del Castillo***; Felipe
Moreno***

*Cátedra de Bioquímica. y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. UNC. Córdoba.

Cátedra de Otorrinolaringología. Facultad de Ciencias Médicas. UIA. Rosario. *Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid-España.

RESUMEN

Los últimos avances en genética molecular como así también el desarrollo de estrategias para la prevención y control de las hipoacusias no sindrómicas (HNS), han contribuido al esclarecimiento de las causas hereditarias de las mismas. En este estudio, se seleccionaron 32 familias argentinas con uno (esporádico) o más (familiar) individuos afectados. El análisis genético consistió en la búsqueda de tres genes autosómicos nucleares y uno en el ADN mitocondrial. Estos genes se localizaron en un gran número de casos familiares o esporádicos de sorderas congénitas en Caucásicos. El alelo mutado 35 del G de la conexina 26 (GJB2, locus DFNB1 en 13q12) se presentó en tres familias. Además se investigó el gen que codifica otoferlina (OTOF, locus DFNB9 en 2p22-23) encontrándose en dos familias la mutación Q829X en heterocigocidad. También se identificó en una familia portadora heterocigota la delección de 342 Kb en la conexina 30 (GJB6, locus DFNB1 en 13q12). Por otro lado, no encontramos ningún paciente con la mutación mitocondrial. Debido a que la búsqueda de otras mutaciones es demasiado costosa, nuestro principal objetivo es investigar aquellas más frecuentes en la población argentina, a fin de desarrollar tests simples y específicos para cada una de ellas.

Palabras Clave: Hipoacusia, GJB2, GJB6, DFNB1, DFNB9, Q829X, Conexina 26, Conexina 30, Otoferlina, OTOF.

ABSTRACT

Recent advances in molecular genetics as well as improved strategies for the prevention and control of non-syndromic hearing loss (NSHL) have contributed to the rising importance of their inherited causes. In this study we report 32 families from Argentine with one (sporadic) or more (familial) individuals affected. All the families were initially screened for mutations in three autosomal nuclear genes and one mutation in mitochondrial DNA. These genes have been found in a great number of familial or sporadic cases of congenital deafness in Caucasians. The mutant allele 35 del G of connexin 26 (GJB2, locus DFNB1 on 13q12) was present in three families. We have investigated the gene encoding otoferlin (OTOF, locus DFNB9 on 2p22-p23) and we found the Q829X mutation in heterocigosity in two families. We have also identified in heterocigosity the 342-kb deletion of connexin 30 (GJB6, locus DFNB1 on 13q12) in one family. On the other hand, we have not found any patient with mitochondrial mutation. Since the screening for other mutations is very expensive, our main goal is to investigate the most frequent mutations in each separate gene in the argentine population

and to develop simple and specific tests for each frequent mutations.

INTRODUCCIÓN

La hipoacusia puede aparecer a cualquier edad y con un grado variable de severidad. Las consecuencias personales y sociales del daño auditivo están enormemente influenciadas por la gravedad del daño y por la edad a la que se manifiesta (4, 18). Si aparece en los primeros años de vida (prelocutiva), tiene efectos dramáticos sobre la adquisición del lenguaje y también sobre el desarrollo cognitivo y psicosocial de la persona (15). Por otro lado, si el defecto en la audición aparece a una edad más tardía (postlocutiva), compromete seriamente la calidad de vida debido a la exclusión social del individuo afectado (2, 3, 8).

Se estima que aproximadamente uno de cada 1.000 nacidos vivos padece hipoacusia (1). Más del 60% de estos casos tiene una causa genética (6, 9). Se clasifican en dos grandes grupos: *sindrómicas*, en las que la hipoacusia está asociada a otros síntomas o signos clínicos, y *no sindrómicas*, en las que la hipoacusia aparece aislada (19).

Por su parte, las *hipoacusias no sindrómicas* han sido hasta hace pocos años las menos conocidas, aún siendo las más frecuentes (70 % de los casos) y constituyen un grupo muy heterogéneo por sus diferentes etiologías. Presentan modos de herencia muy variados: autosómicas recesivas (35 loci DFNBs), autosómicas dominantes (41 loci DFNA), ligadas al sexo (4 loci DFNs), y de herencia materna (mitocondrial-dos genes) (10, 16, 20). El elevado número de genes implicados y la diversidad funcional de las proteínas codificadas son consecuencias lógicas de la natural complejidad anatómica y fisiológica del oído interno humano (11, 12).

Teniendo en cuenta la herencia mayormente europea-mediterránea de nuestra población y los antecedentes bibliográficos, nuestro objetivo general fue realizar un estudio epidemiológico, investigando mediante el análisis genético:

Las mutaciones responsables de las hipoacusias no sindrómicas de herencia monogénica en Argentina. Determinar la frecuencia global de las mutaciones en los loci DFNB1 (conexina 26 y conexina 30) y DFNB9 (otoferlina), incluida la mutación mitocondrial 1555 A>G en los hipoacúsicos de Argentina.

Incluir en nuestro laboratorio el diagnóstico genético precoz de las sorderas neurosensoriales no sindrómicas, ya que la estimulación temprana conlleva a reducir las repercusiones personales y sociales de esta minusvalía. Realizar el consejo genético oportuno en los casos donde se diagnostique la mutación que causa la hipoacusia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de Estudio: Incluimos en el estudio a 32 familias argentinas (Córdoba, Rosario, San Juan y La Rioja), cuyos árboles genéticos presentan uno o más integrantes con hipoacusia prelocutiva o postlocutiva no sindrómica y a sus familiares sanos.

Colección y Clasificación de las Familias: Los ORL caracterizaron la hipoacusia siguiendo los protocolos comúnmente empleados, y remitieron el correspondiente informe clínico a nuestro laboratorio. La investigación de las familias se basó en los siguientes aspectos:

- Examen físico general con la finalidad de conocer las alteraciones físicas o signos asociados con la hipoacusia (descartar patología sindrómica).
- Examen audiológico a los individuos enfermos y sanos de la familia.

Confeccionamos el árbol genealógico a partir del "probando" afectado por sordera neurosensorial de presentación familiar o esporádica sin otra afectación clínica acompañante. Los datos se obtuvieron en el interrogatorio de dos o más integrantes del grupo familiar.

Consentimiento Informado, firmado por cada paciente, por medio del cual se autoriza la realización del estudio genético. En caso de menores de edad, son los padres quienes firmaron el consentimiento.

Obtención del ADN: El ADN que se utilizó en los estudios genéticos, fue extraído de sangre periférica en tubo estéril y con el agregado de EDTA como anticoagulante, según la metodología clásica (4).

Estudio de las Mutaciones: Se aplicaron cinco tests específicos para las mutaciones más frecuentes, para dos loci cromosómicos y un locus mitocondrial.

Locus DFNB1

- Mutación 35 del G en el gen *GJB2* (Conexina 26) (17).
- Deleción *GJB6-D13S1830* o *D30-1*, en el gen *GJB6* (Conexina 30) (5).

- Deleción *D30-2* en el locus *DFNB1* (Conexina 30), encontrada en la población española en el año 2002 por la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal - Madrid.

Locus DFNB9

- Mutación *Q829X* en el gen *OTOF* (Otoferlina) (13)

Mutación mitocondrial

- 1555 A>G (ototoxicidad a antibióticos aminoglucósidos) (7)

RESULTADOS

Locus *DFNB1* - Gen *GJB6*.

Familia ASF030 (Fig. 1): apareció la deleción *GJB6-D13S1830* o *D30-1* (Conexina 30) como la mutación causante de hipoacusia. La madre (I:2) y los tres hijos (II:1, II:2 y II:3) de la familia son heterocigotos para la deleción. Como II:1 y II:2 presentan hipoacusia prelocutiva no sindrómica y la herencia es recesiva, se buscó la otra mutación acompañante en el padre con los tests empleados y dio negativo (heterocigotos compuestos), abriendo la posibilidad de investigar la otra mutación.

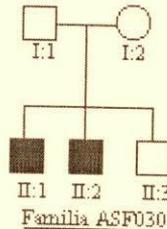


Figura 1. Familia portadora de la deleción A30-1. Locus *DFNB1*, Conexina 30

Locus *DFNB1*- Gen *GJB2*.

Todas las familias fueron evaluadas para la mutación 35 del G en el gen *GJB2* (conexina 26). Esta es una deleción de una guanina en la posición 35 del exón 2 del gen.

Familia ASF008 (Fig. 2): presenta todos los individuos afectados de hipoacusia neurosensorial prelocutiva no sindrómica y todos (I:1, I:2, II:1 y II:2) son portadores homocigóticos de la mutación.

Familia ASF012 (Fig.2) Ambos padres (III:6 y III:7) y una de las hijas (IV:3) son portadores, dos hijas (IV:1 y IV:2) y un tío paterno (III:5) son homocigotos para la mutación y presentan hipoacusia neurosensorial prelocutiva no sindrómica. La *Familia ASF023* (Fig. 1) es similar a la anterior. Los padres (I:1 y I:2) son portadores de la mutación y ambas hijas homocigotas (II:1 y II:2). Como ocurre en otros países esta mutación es la responsable de la mayoría de las sorderas neurosensoriales.

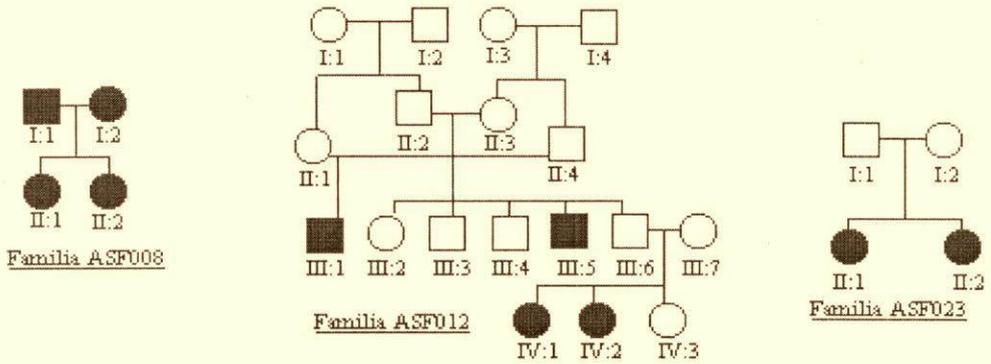


Figura 2. Familias diagnosticadas para la mutación 35 del G. Locus DFNB1, Conexina 26

Locus DFNB9 – Gen OTOF.

Familia AEF005 (Fig.3): un niño de 12 años sordo (II:1) con implante coclear, fue diagnosticado para la mutación Q829X del gen *OTOF*. Realizado el test a los padres y hermanos (II:2 y II:3) resultó la madre (I:2) portadora de la mutación. Toda la familia fue genotipada para los marcadores microsatélites D2S158, D2S2223, D2S2350, y D2S174 presentando el haplotipo asociado a la mutación Q829X (276-196-98-205). Como la hipoacusia se manifiesta en forma recesiva, se buscó en el padre la mutación

acompañante, no encontrándose el otro alelo.

Familia AEF027 (Fig.3): tiene una niña de 12 años (II:1) con hipoacusia neurosensorial no sindrómica, portadora de la mutación Q829X, siendo en este caso el padre (I:1) y su hermano, (II:2) portadores de la mutación. Estas dos familias (*AEF005* Y *AEF027*) se clasificaron como sordera esporádica, no ubicándose en ninguno de los casos, la otra mutación acompañante. En las 26 familias restantes no se registraron mediante nuestros tests diagnósticos las mutaciones buscadas.

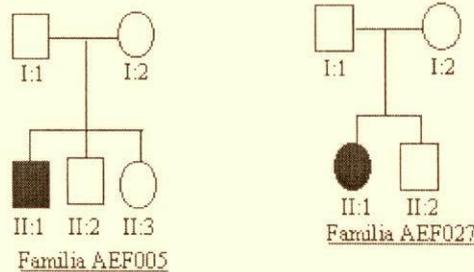


Figura 3. Familias con la mutación Q829X. Locus DFNB9 del gen Otofelina.

Análisis epidemiológico de las mutaciones		
CASOS FAMILIARES		
Herencia	Nº de Casos	Casos
Autosómica recesiva DFNB1	3	ASF008-A, ASF012, ASF023
Autosómica recesiva DFNB1?	1	ASF030
Autosómica recesiva otros DFNB	5	ASF002, ASF006, ASF029, ASF031, ASF032
TOTAL Autosómica recesiva	9	
Autosómica dominante	2	ASF003, ASF007
Ambigua	2	ASF001, ASF033
TOTAL FAMILIARES	13	

DFNB1 + DFNB1? representan el 44,4 % de las recesivas familiares

CASOS ESPORÁDICOS		
Herencia (Autosómica recesiva)	Nº de Casos	Casos
DFNB1	1	ASF008-A
DFNB9?	2	AEF005, AEF027
Otros DFNB	16	AEF004, AEF009, AEF010, AEF011, AEF013, AEF014, AEF015, AEF016, AEF017, AEF018, AEF019, AEF020, AEF021, AEF022, AEF026, AEF028
TOTAL ESPORÁDICOS	19	

DFNB1 representan el 5,3 % de las recesivas esporádicas
DFNB9? representan el 10,5 % de las recesivas esporádicas

DATOS TOTALES
DFNB1 + DFNB1? representan el 17,9 % (5 de 28) de las recesivas
DFNB9? representan el 7,1 % (2 de 28) de las recesivas

DISCUSIÓN

El análisis genético aplicado a las familias estudiadas ha permitido reconocer la herencia monogénica como causa de hipoacusia neurosensorial. En 6 familias (AEF005, AEF008, ASF012, ASF023, ASF027 y ASF030) fueron diagnosticados como causa de hipoacusia, genes autosómicos.

Tomando en conjunto los casos familiares y esporádicos, el porcentaje de la mutación 35 del G (Conexina 26) fue significativamente bajo comparado con los datos de la población española. Por el contrario la mutación Q829X (Otoferlina) destaca por su elevada frecuencia, 10,5 % del total de las familias analizadas. Dato a tener en cuenta en cuenta en el diagnóstico genético.

La baja frecuencia de la mutación 35 del G (Conexina 26) puede deberse a que en este tipo de hipoacusias sea el factor ambiental y no el genético el que este causando la patología. Además se conocen 50 mutaciones en el gen de la Conexina 26, y que sea alguna de ellas y no la 35 del G la que esté con mayor frecuencia en

Argentina, que será motivo de estudio. En dos familias no encontramos la segunda mutación acompañante (Q829X/otra y D30-1/otra) dando lugar a la presencia de dos alelos distintos en la misma familia (heterogeneidad genética alélica), lo que dificulta extraordinariamente su análisis genético. La ausencia de la mutación 1555 A>G, se debe a que nuestra selección se centro en familias con una aparente herencia recesiva de la patología.

El reconocimiento de familias con hipoacusia de causa claramente genética con mutaciones aún desconocidas, constituyen un material biológico de valor inapreciable para realizar estudios en busca de mutaciones (heteroduplex) y también de ligamiento que confirmen las ya reportadas o para la identificación de nuevos loci. Tales estudios nos permitirán en un futuro disponer de protocolos de diagnóstico y asesoramiento genéticos más refinados, que contribuyan a la prevención de las hipoacusias hereditarias, además de ampliar los conocimientos en su fisiopatología molecular y posible aplicación terapéutica.

CONCLUSIONES

Las sorderas recesivas que se han diagnosticado en nuestra población con localización cromosómica conocida fueron de diverso grado, desde severas y profundas hasta moderadas en algunos casos.

El hallazgo de un porcentaje elevado de familias con la mutación Q829X (Otoferlina) más alta, comparada con la población española y con la mutación 35 del G (Connexina 26), nos plantea un problema epidemiológico para seguir analizando nuestras familias.

Dado lo costoso que supone la investigación de todas las mutaciones posibles de hipoacusias, delimitar los tests que detecten la mayoría de las causas de hipoacusia genética en nuestro medio, facilitaría el estudio epidemiológico en beneficio de nuestra población.

El beneficio que supone desde el punto de vista social el diagnóstico de la hipoacusia, se impone la necesidad de implementar un programa de detección precoz para el diagnóstico de las hipoacusias congénitas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Angeli S, Utrera R, Dib, S, Chiossone E, Naranjo C, Henriquez O and Porta M. GJB2 Gene Mutations in Childhood Deafness. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 133-136.
2. Arnos KS, Cunningham M, Israel J, Marazita L. Innovative approach to genetics counseling service for the deaf population. *Am. J. Med. Genet.* 1992, 44:345-51.
3. Bergstrom L, Hemennway W, Downs M. A high risk to find congenital deafness. *Otolaryngol Clin. North. Am.* 1971, 4:369-99.
4. De Sebastián G, Badaracco J, Postan D. *Audiología Práctica*. Ed. Panamerica. 1999, 5ta. Edición.
5. Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria M, Menendez I and Moreno F. A Deletion Involving the Connexin 30 Gene in Nonsyndromic Hearing Impairment. *N. Engl. J. Med.*, 2002, Vol. 346, No 4.
6. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 35 del G mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 6:2173-2177.
7. Estivill et al., 1998, *Am. J. Hum. Genet.* 62:27-35.
8. Fischel-Ghodsian N, Mitochondrial deafness mutations revisited. *Hum. Mutat.* 1999; 13:261-270.
9. Hamasaki K, Rando RR. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* 1997; 36:12323-12328.
10. Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh.html>.
11. John WM., Weitznar G, Rozen R. and Scriver CR.. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*, 1991,19: 408.
12. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80-83.
13. Migliosi V, Modamio-Hoybjor S, Moreno-Pelayo MA, Rodriguez-Ballesteros M, Villamar M, Telleria D, Menéndez I, Moreno F and del Castillo I. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (*OTOF*), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *Journal of Medical Genetic.*, 2002, 39:502-506.
14. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Öztas S, Qiu WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genet.* 1993; 4: 289-294.
15. Reardon W. Genetic deafness. *J Med Genet.* 1992, 29: 521-6.
16. Richard G, Rouan F, Willoughby CE, Brown N, Chung P, Ryyänem M, et al. Missense mutations in *GJB2* encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-achthyosis-deafness syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; en prensa.

17. Storm et al., 1999. HUMAN MUTATION 14: 263-266.

18. Tekin M., Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. Lancet 2001; 358: 1082-1090.

19. Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. N. Engl. J. Med. 2000; 342: 1101-1109.

20. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salomon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, et al. A mutation in *OTOF*, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. Nature Genet. 1999; 21:363-369.