

TRABAJOS ORIGINALES

Hospital Pediátrico Docente "William Soler"

MUTACIONES DEL GEN DE LA CONEXINA 26 (GJB2) EN FAMILIAS CUBANAS CON SORDERAS NO SINDRÓMICAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS

Dra. Ibis Menéndez, Dr. Ignacio del Castillo, Dra. Blanca Carrillo, Dra. Manuela Villamar, Dra. Maribel Ponce de León, Dra. Ana Uriarte y Dr. Felipe Moreno

RESUMEN

Las mutaciones del gen de la conexina 26 (locus DFNB1, en el brazo largo del cromosoma 13) dan cuenta de 60 % de las familias con sorderas neurosensoriales no sindrómicas autosómicas recesivas en poblaciones caucásicas. La prueba para la detección de la mutación 35delG, el análisis de heteroduplex y la secuenciación de la región codificante del gen de la conexina 26 en miembros de 15 familias cubanas con este tipo de sordera, arrojaron los resultados siguientes: en 10 de 15 familias (66,66 %) se observaron mutaciones en ambos alelos de la conexina 26, por lo que se clasificaron como sorderas tipo DFNB1. En estas familias DFNB1, 25/32 cromosomas analizados contenían la mutación 35delG para una frecuencia de 0,781. Las mutaciones E47X y W77R se observaron en heterocigosis con la 35delG. En 2 hipoacúsicos se detectaron también en heterocigosis las mutaciones puntuales M34T/R143W y V95M/R184P, respectivamente. Los hallazgos permitieron apreciar la alta frecuencia del tipo de sordera DFNB1 entre las sorderas no sindrómicas autosómicas recesivas que existían en la población cubana. El aspecto más destacable de la investigación es la similitud de sus resultados con los encontrados en poblaciones caucásicas relacionadas con el origen étnico de la población cubana. Este trabajo constituye la primera comunicación de estos estudios en el medio cubano.

DeCS: Sordera/congénito; SORDERA/genética; CONEXINAS; MUTACIÓN; ENFERMEDADES HEREDITARIAS/diagnóstico; CUBA; CROMOSOMAS HUMANOS PAR 13; ALELOS.

Las sorderas no sindrómicas prelocutivas constituyen el defecto sensorial hereditario más frecuente que se conoce.^{1,2} Las mutaciones en el gen de la conexina 26 (CX26), locus DFNB1, en el brazo largo del cromosoma 13,

dan cuenta de 60 % de estas hipoacusias con herencia recesiva, de 20 % de todas las sorderas infantiles y se han encontrado en portadores sanos de poblaciones caucásicas con una frecuencia que oscila entre 1 a 2,8 %.²⁻⁵

Las conexinas son una familia de proteínas integrales de membranas que forman 4 dominios transmembranales, que se encuentran en las uniones intercelulares de tipo hendidura. Estas uniones o canales intercelulares, constituyen el sistema principal de comunicación e intercambio de electrolitos, metabolitos y mensajeros secundarios entre las células.^{6,7} Cada canal se compone de 2 mitades denominadas conexiones y cada conexión está constituida por 6 moléculas de conexina. En mamíferos se han descrito hasta el momento 13 tipos de conexinas diferentes, cada una de las cuales presenta una localización tisular específica.⁸⁻¹⁰

El gen de la conexina 26 (CX26) se expresa en varias estructuras del oído interno, como son la estría vascular, la prominencia espiral y el limbo espiral de la cóclea.¹¹ Se ha postulado que el papel principal de los canales de CX26 a ese nivel, sería asegurar el flujo de los iones potasio requeridos para el mecanismo fisiológico de la audición.^{8,11} Aun cuando se conoce por diferentes estudios epidemiológicos que las sorderas son un problema de salud mundial,^{1,12} y que las investigaciones genético-moleculares sobre estas han alcanzado resultados impresionantes,^{13,14} los estudios de este tipo han estado delimitados a poblaciones determinadas, ya sea por razones de recursos o por idoneidad de la población en cuestión.^{2,4-6,11,15} Se desconoce el papel que pudieran desempeñar las mutaciones del gen de la conexina 26 en familias cubanas con sorderas neurosensoriales no sindrómicas con herencia autosómica recesiva. Este trabajo constituye la primera comunicación de este tipo de investigación en el medio cubano.

MÉTODOS

PACIENTES

Se estudiaron 47 individuos afectados de sordera neurosensorial no sindrómica,

bilateral, congénita o prelocutiva, de intensidad severa a profunda pertenecientes a 15 familias, documentados en los Departamentos de Audiología y Genética Clínica del Hospital Pediátrico Docente "Willian Soler". EL diagnóstico de sordera autosómica recesiva se basó en los criterios mendelianos establecidos para este tipo de patrón de herencia, para lo que se trazaron los árboles genealógicos y se recogieron datos de 3 generaciones o más en cada una de las familias en cuestión.¹² Se incluyeron los resultados de 4 familias que presentaban un solo miembro afectado sin antecedentes prenatales, perinatales y posnatales de interés. Los padres respectivos estaban vivos y presentaban audición normal, también confirmada audiométricamente.

DETECCIÓN DE MUTACIONES

Se aplicaron 3 tipos de técnicas:

1. Prueba para la detección de la mutación 35delG en el gen de la conexina 26.
2. El análisis de heteroduplex de la región codificante del gen CX26.
3. Secuenciación automatizada del fragmento en cuestión.

Se obtuvo DNA de sangre periférica en los afectados y sus familiares por métodos estándares. El ADN genómico se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (RCP), utilizando los *primers* siguientes:

Upper primer: 5- CAAACCGCCCAGAGTAGAAG-3

Lower primer: 5-CATAATGC AAAAATGAAGAGG-3

Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer 9600.

La prueba para la detección de la mutación 35delG fue creada por los especia-

listas de la referida Unidad de Genética Molecular,¹⁶ y se basa en la determinación precisa del tamaño de un fragmento del gen para detectar la pérdida de un nucleótido en el alelo 35delG. En aquellos casos en que no se detectó la delección 35delG o esta apareció en heterocigosis, se realizó análisis por heteroduplex y secuenciación del fragmento en cuestión por electroforesis capilar, que se llevó a cabo en un *Abi Prism 310 Genetic Analyzer* (Perkin-Elmer). Los resultados se presentan en tablas confeccionadas al efecto.

RESULTADOS

En 10 de 15 familias (66,6 %) se observaron mutaciones en ambos alelos de la conexina 26, por lo tanto se clasificaron como DFNB1 (tabla 1). En las familias DFNB1, 25 de 32 cromosomas afectados analizados contenían la mutación 35delG, para una frecuencia de 0,781. Otras mutaciones del gen CX26 detectadas fueron la E47X, la W77R, la M34T, la R143W, V95M y R184P, cada una en un cromosoma respectivamente (tabla 2). En 18 cromosomas la delección 35delG apareció en homocigosis, mientras que en 7 cromosomas se observó en heterocigosis (tabla 3). Las mutaciones M34T y la R143W aparecieron en un paciente con una sordera familiar, neurosensorial, bilateral, de severa a profunda al momento del diagnóstico que no ha impedido un desarrollo normal del lenguaje. Las mutaciones V95M y la R184P aparecieron en otro paciente con una sordera neurosensorial, bilateral, congénita, profunda y esporádica. En un afectado con la 35delG, aún no se ha identificado la segunda mutación. Como era de esperar la mutación 35delG fue la más frecuente entre los portadores de las familias estudiadas (tabla 4).

TABLA 1. Familias con sorderas autosómicas recesivas según pesquisaje de mutaciones en el gen de la conexina 26

Tipo de sordera	Número de familias	%
DFNB1	10	66,6
No DFNB1	5	33,33
Total	15	100

TABLA 2. Mutaciones detectadas en las familias DFNB1

Mutación	Número de cromosomas	Tipo de mutación
35delG	23/32	Delección/CML
E47X	3/32	Sin sentido
W77R	1/32	Sentido erróneo
M34T	1/32	Sentido erróneo
V95M	1/32	Sentido erróneo
R184P	1/32	Sentido erróneo
R143W	1/32	Sentido erróneo

CML: corrimiento del marco de lectura.

TABLA 3. Comportamiento de las mutaciones 35delG

Comportamiento	Número de cromosomas	Otra mutación
Homocigotas	18	-
Heterocigotas	5	3E47X; 1W77R; 1NI

NI: no identificada.

TABLA 4. Detección de portadores de mutaciones en el gen de la conexina 26

Tipo de mutación	Número de individuos	%
35delG	13	76,4
E47X	1	5,8
W77R	1	5,8
V95M	1	5,8
R184P	1	5,8
Total	17	100

DISCUSIÓN

Los hallazgos permiten apreciar la alta frecuencia del tipo de sordera DFNB1 entre

las sorderas no sindrómicas autosómicas recesivas de la población cubana. El aspecto más destacable de la investigación es la similitud de los resultados obtenidos aquí, con los encontrados en poblaciones de origen caucásico,^{4,6} relacionadas con el origen étnico de la población cubana.

La población cubana está compuesta por 2 etnias principales: la formada por los descendientes de los emigrantes españoles, y la que fue introducida mediante el tráfico de esclavos africanos durante los siglos XVI, XVII, XVIII y parte del XIX. También existe un componente asiático de menor cuantía, como resultado de las inmigraciones estimuladas por los españoles al suprimirse la trata de esclavos. En la casuística de este trabajo se encontró un solo paciente negro, que resultó homocigoto para la mutación 35delG. En sus padres se confirmó molecularmente el estado de portador de esta mutación, la que se pensó pudiera haber sido heredada de sus ancestros de origen caucásico, dado el alto grado de mestizaje de la población cubana. La mutación 35delG es la causa más común de sordera recesiva en poblaciones norteamericanas y sureñas de Europa, incluida España.⁵ Si la alta frecuencia de la mutación 35delG en diferentes grupos étnicos apoya la hipótesis de la naturaleza hipermutable de las 6 guaninas en el gen de la CX26,^{5,6,11} el efecto fundador, sería la circunstancia o el mecanismo más probable que explique su origen y el de otras mutaciones CX26 en poblaciones mestizas como la cubana.

De las 15 familias con mutaciones en el gen de la conexina 26, 4 presentaron un solo miembro afectado (casos esporádicos). *Petit* y otros sugirieron el posible papel que podrían desempeñar estas mutaciones CX26.¹³ De los cromosomas afectados, 50 % (4 de 8) tenían la mutación 35delG en homocigosis o en heterocigosis. En un individuo con la delección 35delG no

se ha podido encontrar la mutación de origen materno. Existen otros casos similares comunicados en la literatura médica.⁶ El estudio de la región promotora del gen CX26 en el paciente y su madre fue normal. Dada la gran heterogeneidad genética de las sorderas recesivas^{1,14} y de la alta frecuencia de portadores de la delección 35delG en la población general,^{3,5,11,15} se proponen 3 explicaciones posibles:

1. Que se trata de un portador de la mutación 35delG, heredada por vía paterna, con la mutación materna en otro gen no CX26 (herencia digénica).
2. Que sea un portador de la delección 35delG con otro tipo de sordera recesiva.
3. Que sea un portador de la delección 35delG y que su sordera no sea de causa genética.

Se observaron proporcionalmente más mutaciones puntuales en los casos esporádicos que en los familiares. En términos de utilidad práctica se puede plantear que el pesquisar de mutaciones en el gen de la CX26 en pacientes con sorderas esporádicas, ha permitido clasificar etiológicamente la pérdida auditiva como sordera de causa genética y precisar los riesgos de recurrencia, antes desconocidos. Esto será motivo de un trabajo ulterior.

Todas las mutaciones que se encontraron en las familias cubanas, en el gen de la CX26 produjeron la pérdida de función de este gen y presentaron características muy variables (tabla 2) como delecciones con cambios en el marco de lectura, sustitución de un nucleótido por otro y apariciones de codones de terminación. Estas también han sido identificadas en otras poblaciones.^{3-7,11} Al parecer existe además de la frecuente delección 35delG, otra proporción importante de mutantes del gen de la CX26 que pudieran ocasionar la aparición de una proteína más corta.^{3,4,6} Por lo tanto detectar la lon-

gitud de la proteína podría ser un método rápido, que convendría evaluar, pues abarcaría en una sola prueba, un mayor número de mutaciones del gen de la CX26 que producen sorderas DFNB1. Queda aún por realizar por biólogos moleculares y clínicos un trabajo importante y extenso, relacionado con la correlación fenotipo-genotipo, para determinar el grado de hipoacusia asociado con los diferentes tipos de mutaciones del gen de la conexina 26, precisar la influencia de otros factores genéticos o ambienta-

les y conocer la respuesta a métodos terapéuticos novedosos como la ozonoterapia y el implante coclear.

Los autores de este trabajo coinciden con otras comunicaciones en que las DFNB1 se colocan en la misma categoría de enfermedades monogénicas tan comunes como la sickleemia y la fibrosis quística,⁶ por lo que debe ser conocida por los especialistas con vistas a realizar las investigaciones pertinentes para su confirmación diagnóstica y prevención.

SUMMARY

Mutations in the connexin 26 genes (locus DFNB1) in the long arm of the chromosome 13 account for 60% of the families with non-syndromic autosomal recessive deafness in Caucasian populations. The test for detection of 35delG mutation, the heteroduplex analysis and the connexin 26 gene coding region sequencing in members of 15 Cuban families with this type of hearing loss yielded the following results: in 10 of the 15 families (66,66%) mutations of both connexin 26 alleles were observed, so their deafness was classified as DFNB1-type. In this DFNB1-type families, 25 of the 32 analyzed chromosomes showed 35delG mutation for a frequency of 0.781. E47X and W77R mutations were observed in heterozygosis with the 35delG mutation. M34T/R143W and V95M/R184P punctual mutations were also detected in heterozygosis in two hypoacoustic patients respectively. The findings demonstrated the high frequency of DFNB1 deafness among the non-syndromic autosomal recessive deafness affecting the Cuban population. The most striking aspect of this research work is the similarity between these results and those found in Caucasian populations in relation with the ethnic origin of the Cuban population. This paper is the first communication of these studies in Cuba.

Subject headings: DEAFNESS/congenital; DEAFNESS/genetics; CONNEXINS; MUTATION; HEREDITARY DISEASES/diagnosis; CUBA; CHROMOSOMES; HUMAN, PAIR 13; ALLELES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 1991;630:16-31.
2. Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Wissenbach J, Petit C. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13 q. *Nature Genet* 1994;6:24-8.
3. Keisell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NH, Liangs JN. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997;387:80-3.
4. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, Dagruma L. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean. *Hum Mol Genet* 1997;6(9):1605-9.
5. Denoyelle F, Well D, Maw M, Wilcox SA, Lench NJ. Prelingual deafness: high prevalence of a 30 del G mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997;6(12):2173-7.
6. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler SD, Kimberling WJ. Novel mutations in the Connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998;62:792-9.

7. Goodenough DA, Goliger JA, Paul LD. Connexins, connexons and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 1996;65:475-502.
8. Kikuchis T, Kimura RS, Paul DL, Adanis JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol* 1995;191:101-18.
9. Wolburg H, Rohlmann A. Structure-function relationship in gap junction. *Int Rev Cytol* 1995;157:315-73.
10. Haefliger JA, Bruzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL. Four novel members of the connexin family of gap-junction proteins: molecular cloning, expression and chromosome mapping. *J Biol Chem* 1992;267:2057-64.
11. Carrasquillo MM, Zlotora J, Barges S, Chakravarti A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Mol Genet* 1997;6(12):2163-72.
12. Menéndez I, Ponce de León M, Carrillo B, Gil JL. Sorderas neurosensoriales no sindrómicas. Análisis de la herencia en 10 familias. *Rev Cubana Pediatr* 1998;70(2):92-9.
13. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998;7(10):1589-97.
14. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness symphony of a thousand. *Nature Gene* 1996;8:385-91.
15. Morell RJ, Kim HF, Hood LJ, Goforth L, Friderici K. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998;339(21):1500-5.
16. Castillo I del, Villamar M, Sarduy M, Romero L, Herraiz C, Hernández FJ, *et al.* A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum Mol Gen* 1996;5:1383-7.

Recibido. 15 de diciembre de 1999. Aprobado: 13 de abril del 2000.

Dra. *Ibis Menéndez*. Hospital Pediátrico Docente "William Soler". San Francisco y Perla. Altahabana, municipio Boyeros. Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10800.