

# Estudio de seis mutaciones en el gen *gjb2* en pacientes cubanos con sorderas neurosensoriales no sindrómicas

✉ Yenitse Perea<sup>1</sup>, Jorge Mato<sup>2</sup>, Isis Amores<sup>2</sup>, Raúl Ferreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Subdirección de Inmunoquímica, Centro de Inmunoensayo, CIE Calle 134 y Ave. 25, AP 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: iqbmolecular4@cie.sld.cu

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética Molecular, Hospital Clínico-Quirúrgico Hermanos Ameijeiras

## RESUMEN

La sordera es una pérdida parcial o total de la audición, que puede manifestarse a cualquier edad y con diferente grado de severidad. El 50% de las afectaciones de la audición presentan un origen genético, y entre ellas, las sorderas neurosensoriales no sindrómicas representan el 70%. Las más frecuentes son las de herencia autosómica recesiva, que constituyen más del 80% de los casos. En Cuba, las sorderas autosómicas recesivas a nivel molecular no se han caracterizado suficientemente. El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de seis mutaciones en el gen *gjb2*, en pacientes cubanos con sorderas neurosensoriales no sindrómicas. Para la pesquisa de las mutaciones W24X, M34T, E47X, V95M, W77R y 35delG en este gen, se empleó la técnica PCR-RFLP y la técnica de heteroduplex. De las seis mutaciones, solamente cuatro se detectaron mediante la técnica PCR-RFLP, y la 35delG (70%) y M34T (20%) resultaron más frecuentes. Cada una de las otras dos mutaciones (W77R y E47X) representó el 5%. El análisis de heteroduplex resultó ser muy informativo al detectarse la formación de siete heteroduplex en los fragmentos analizados, correspondientes a seis pacientes, y en un paciente se observó la formación de heteroduplex en dos fragmentos amplificadas. En dos de los pacientes, el heteroduplex complementó una mutación anteriormente detectada por la técnica PCR-RFLP. Se identificaron cinco familias en las que el diagnóstico de los portadores de la sordera hereditaria autosómica recesiva llevó a definir el genotipo responsable de la enfermedad.

**Palabras clave:** *gjb2*, conexina 26, mutación, PCR-RFLP, heteroduplex

*Biotecnología Aplicada 2007;24:236-240*

## ABSTRACT

**Study of six mutations in the *gjb2* gene in Cuban patients with nonsyndromic sensorineural deafness.** Deafness is a partial or total hearing loss that can appear at any ages and with different degrees of severity. About 50% of hearing disorders have a genetic origin, and among them, the nonsyndromic sensorineural deafness represents 70% of the cases. Out of these, the 80% correspond to autosomal recessive inheritance deafness. Autosomal recessive deafness has not been characterized enough at molecular level in Cuba. The purpose of this work was to determine the frequency of six *gjb2* mutations in the nonsyndromic sensorineural deafness. In order to detect W24X, M34T, E47X, V95M, W77R, and 35delG mutations in the *gjb2* gene, we employed the PCR-RFLP and the heteroduplex techniques. Four out of the six tested mutations were detected only by using the PCR-RFLP technique, being the most frequent mutations 35delG (70%) and M34T (20%). The other two mutations detected employing this technique (W77R and E47X) represented 5% each one. The heteroduplex analysis was very informative because we detected the formation of seven heteroduplexes in the analyzed fragments, corresponding to six different patients. The formation of heteroduplexes was obtained in two amplified fragments corresponding to one of these patients. In two of these patients, the heteroduplex complemented one mutation previously detected by the PCR-RFLP technique. This work allowed us to identify five families in which the carrier diagnosis of the autosomal recessive inheritance deafness led to the definition of the genotype responsible for the illness.

**Keywords:** *gjb2*, Connexin 26, mutation, PCR-RFLP, heteroduplex

## Introducción

La sordera es una pérdida parcial o total de la audición, que afecta del 6 al 8% de la población en los países desarrollados [1]. Esta puede expresarse a cualquier edad y con diferente grado de severidad.

Las consecuencias personales y sociales de la pérdida de la audición están muy influenciadas por la severidad del defecto auditivo y por la edad de aparición. Si el defecto es severo y se presenta tempranamente en la niñez, causa efectos dramáticos en la adquisición del habla, y con ello, importantes trastornos en el desarrollo cognoscitivo y psicosocial. Si aparece en edades avanzadas, afecta la calidad de vida, como resultado del aislamiento del individuo afectado.

El 50% de las afectaciones de la audición tienen un origen genético [2]. Entre ellas, las sorderas neurosensoriales no sindrómicas, en las que la hipoacusia aparece aislada, sin otros síntomas acompañantes, representan el 70% de los casos [3].

Las hipoacusias no sindrómicas son un grupo clínica y genéticamente heterogéneo. Las más frecuentes son las de herencia autosómica recesiva, que constituyen más del 80% de los casos [3].

Las sorderas hereditarias son genéticamente heterogéneas; se han localizado más de 100 genes responsables, diseminados en distintos cromosomas [4]. Entre estos el gen *gjb2*, localizado en el cromosoma

1. Petit C, Leveilliers J, Marlin S, Hardelin J. Multisystem inborn errors of development: Hereditary Hearing Loss (2001); 254: 6281-328.

2. Kirby Siemering, Shehnaaz SM Manji, Wendy M Hutchison, Desiree Du Start, Dean Phelan, Hans-Henrick M Dahl. Microarray-Based Approach. *J Mol Diag* (2006); 8:483-9.

3. Del Castillo I, Villamar M, Moreno F. Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y cuello. Hipoacusias genéticas (1999); 105:1461-95.

13q12, que codifica para la proteína Connexina 26 [5, 6]. Se ha demostrado que algunos defectos en este gen son responsables de sorderas, tanto con patrones de herencia autosómica dominante como recesiva [1, 7].

El diagnóstico molecular de las sorderas hereditarias permite la detección de portadores y orientar su conducta reproductiva. El asesoramiento genético define el riesgo que presenta una pareja de tener hijos afectados y ofrece también la posibilidad del diagnóstico prenatal.

Otro beneficio que reporta el diagnóstico molecular es la clasificación de la enfermedad en función del defecto genético que se presenta, lo cual se considera de gran importancia a la luz de las nuevas opciones en el tratamiento personalizado de las enfermedades genéticas.

La gran heterogeneidad genética de esta afección dificulta su enfrentamiento molecular, pues en cada caso es necesario definir el patrón de herencia que se presenta y, de acuerdo con este, los posibles genes involucrados. Esto se complica cuando el patrón es autosómico recesivo, pues muchas veces no es factible su precisión y la afección puede considerarse esporádica, ya que en la entrevista que se realiza al individuo afectado no reporta familiares enfermos, ni causas ambientales de su enfermedad, a pesar de que pueda tener familiares portadores de algunas de las mutaciones del gen *gjb2* en forma heterocigótica.

Las variantes que presentan las afectaciones del gen *gjb2* en las sorderas autosómicas recesivas, permiten establecer una estrategia para su enfrentamiento molecular, que consiste en el estudio inicial mediante el análisis de este gen.

No obstante, este estudio tampoco resulta fácil, pues el gen *gjb2* posee una gran heterogeneidad molecular: se han descrito más de 90 mutaciones diferentes en él [8].

Por tal razón, lo más indicado es comenzar el estudio por aquellas mutaciones del gen *gjb2* que se presentan con mayor frecuencia en la población de interés. De no ser detectadas, es conveniente utilizar métodos de análisis que permiten localizar la mutación en un segmento restringido del gen, lo cual facilita su caracterización.

En Cuba no se han caracterizado suficientemente las sorderas autosómicas recesivas a nivel molecular. El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de seis mutaciones en el gen *gjb2*, en pacientes cubanos con sorderas neurosensoriales no sindrómicas.

## Materiales y métodos

### Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre periférica de 55 pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica, entre quienes no se pudo verificar ninguna relación familiar. De ellos, 23 presentaban antecedentes familiares, con patrones de herencia que por el análisis de su árbol genealógico podían considerarse autosómicos recesivos, y 32 eran casos esporádicos, en los que la entrevista familiar no reportó ningún familiar afectado.

Todos los pacientes se remitieron al Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Clínico-Quirúrgico Hermanos Ameijeiras y del Hospital Pediátrico William Soler. Todos dieron su consentimiento por escri-

to para que una muestra de su sangre fuera utilizada en esta investigación.

A cada paciente se le extrajeron 10 mL de sangre periférica, la cual se colectó en tubos que contenían 150 mL de EDTA al 5.6% y se conservó a 4 °C de 24 a 48 h.

Además, a cada paciente se le realizó una encuesta para la confección de sus árboles genealógicos.

### Extracción y purificación de ADN a partir de las muestras de sangre

La extracción de ADN se realizó por el método de Bunce y Welsh [9], basado en la precipitación salina de las proteínas de la muestra. Después de este proceso de purificación, el ADN se precipitó mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente, se lavó el precipitado con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en 150 µL de agua estéril calentada a 56 °C durante 30 min.

### Comprobación de la integridad del ADN purificado por electroforesis

Con vistas a verificar la integridad del ADN y hacer un estimado a su concentración, se le realizó la electroforesis submarina en geles de agarosa al 0.8% con 0.5 X TBE (Tris-borato-EDTA) como solución tampón de corrida [10].

La aplicación del ADN en el gel se realizó después de añadir una solución tampón de carga a su alícuota para la verificación, la cual aumentó la densidad por la presencia de Ficoll 400 e incorporó un colorante (bromofenol azul), que sirve para seguir la migración electroforética.

El ADN se visualizó en el gel mediante tinción con bromuro de etidio (concentración final: 0.5 µg/mL) y su exposición a luz ultravioleta (252 nm).

Para la aplicación de las muestras en el gel, se utilizaron 2 µL de muestras y 2 µL de solución tampón de carga bromofenol (LB-BFA 6X). Se completó con agua hasta un volumen final de 10 µL.

### Detección de las mutaciones

#### Diseño de los oligos

Mediante el programa PCGene [11] se analizó si cada mutación, de manera independiente, cambiaba el patrón de corte de alguna de las enzimas de restricción comercializadas, y el resultado fue satisfactorio, por lo que se diseñó un juego de cebadores que amplificara la región que contiene la mutación y que permitiera obtener fragmentos digeridos, fácilmente diferenciables electroforéticamente, mediante el programa OLIGO versión 4.1 (National Biosciences Inc.).

Se diseñaron sistemas PCR-RFLP (del inglés, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) para la detección de las siguientes cinco mutaciones: W24X, M34T, E47X, V95M y W77R, conjuntamente con el ya descrito para la detección de la mutación 35 delG [12], introducidos en el Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico-Quirúrgico Hermanos Ameijeiras (Tabla 1).

#### Técnica de PCR-RFLP

Para la detección de las mutaciones, se empleó la técnica de PCR-RFLP [10], que se basa en la diferenciación

4. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparallelled heterogeneity. *Am J Hum Genet* (1997); 60:758-64.

5. B Haack, K Schmalisch, M Palmada, CB Ohmer, N Kohlschmidt, A Keilmann. Deficient membrane integration of the novel p.N14D-gjb2 mutant associated with non-syndromic hearing impairment. *Hum Mutat* (2006); 27:1158-9.

6. Olafsson I, Hjaltadóttir G, Cook E, Thórórnsson H. Hereditary hearing impairment. Mutation analysis of connexin 26 and POU3F4 genes in Icelanders with nonsyndromic hearing impairment. *Laeknabladid* (2000); 86:833-9.

7. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldman D, Marlin S. *gjb2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet* (2005); 77:945-57.

8. Kenneson A, Braun K, Boyle C. *gjb2* (Connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A Huge review. *Genet Med* (2002); 4(4):258-74.

9. Bunce M, Procter J, Welsh KI. A DNA based detection and screening system for identifying HLA class I expression variants by sequence-specific primers. *Tissue Antigens* (1999); 53:498-506.

10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. In: Ford N, Nolan C, Ferguson M, editors. Tomo 1, 2 nd. ed. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); p. 5.3-6.46.

11. Cui Y, Yu L, Gong R, Zhang M, Fan Y, Yue P, Zhao S. Cloning and tissue expression characterization of a full-length cDNA encoding human neuronal protein p17.3. *Biochem Genet* (1999); 37:175-85.

12. Storm K, Wilcox S, Flothmann K, Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common *gjb2* (Connexin 26) 35delG mutation in the Belgian Population using an easy and reliable Screening Method. *Human Mutation* (1999); 14:263-6.

de los alelos para cada mutación mediante la digestión con enzimas de restricción de un fragmento amplificado del gen, que contuviera el sitio de la mutación.

Se emplearon sistemas PCR-RFLP para la detección de seis mutaciones: 35delG, W24X, M34T, E47X, V95M y W77R (Tabla 1).

La reacción de amplificación para ellas se realizó en las condiciones siguientes: 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM de cada desoxirribonucleótido, 0.7 μM de cada uno de los cebadores y 0.75 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa (Promega Corp.) utilizando la solución tampón suministrada por el fabricante. El volumen final de la reacción fue de 15 μL. La amplificación se realizó en el termociclador PTC 150 (MJ Research, EE.UU.).

Los programas utilizados para la amplificación de los fragmentos del gen *gjb2* para la pesquisa de las mutaciones mediante PCR-RFLP fueron los siguientes:

- Para las mutaciones W24X y M34T, la mezcla se desnaturizó a 94 °C durante 5 min y se sometió a 10 ciclos térmicos (94 °C, 15 s; 62 °C, 15 s; 72 °C, 30 s), y posteriormente a 30 ciclos térmicos (89 °C, 15 s; 62 °C, 15 s; 72 °C, 30 s), seguidos de una incubación final a 72 °C durante 10 min.

- Para las mutaciones E47X y W77R la mezcla se desnaturizó a 94 °C durante 5 min y se sometió a 10 ciclos térmicos (94 °C, 15 s; 65 °C, 15 s; 72 °C, 30 s) y posteriormente a 30 ciclos térmicos (89 °C, 15 s; 65 °C, 15 s; 72 °C, 30 s), seguidos de una incubación final a 72 °C durante 10 min.

- Para la V95M, la mezcla se desnaturizó a 94 °C durante 5 min y se sometió a un ciclo térmico (94 °C, 2 min; 58 °C, 1 min; 72 °C, 1 min), y posteriormente a 30 ciclos térmicos (94 °C, 40 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 1 min), seguidos de una incubación final a 72 °C durante 5 min.

- Para la detección de la mutación 35delG, la mezcla se desnaturizó a 94 °C durante 5 min y se sometió a 30 ciclos térmicos (94 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) seguidos de una incubación final a 72 °C durante 7 min.

En cada grupo de reacciones se preparó un control negativo (mezcla de PCR sin ADN) y un control positivo (mezcla de PCR con ADN que contiene la mutación específica).

El éxito de la amplificación se comprobó mediante electroforesis submarina en gel de agarosa 1.5% [10] y solución tampón de corrida 0.5X TBE, al aplicar 5 μL del producto de la reacción. En todos los geles se incluyó un marcador de peso molecular (100 pb ADN, Promega Corp., EE.UU.) como muestra independiente.

Cuando se comprobó la amplificación del producto esperado, se realizó la digestión de 5 μL del producto amplificado con la enzima correspondiente durante 16 h, a la temperatura y con la solución tampón recomendada por el fabricante.

Para el genotipaje de la muestra, se realizó la corrida electroforética del producto digerido en gel de poli-acrilamida al 6% [10] a 500 V durante 3 h, y se visualizaron los fragmentos de restricción mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. El genotipo de cada individuo para cada mutación se definió en función del patrón de fragmentos de ADN que se observó en la electroforesis.

### Técnica de heteroduplex

Debido a la baja cobertura que pudieran reportar las seis mutaciones estudiadas en el gen *gjb2* en la po-

Tabla 1. Sistemas PCR-RFLP para la detección de las mutaciones estudiadas

Mutación	Cebadores	Secuencias (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	Enzima, restricción y fabricante	Tamaño de los alelos (pb)
35delG (**)	35delG -1 35delG -2	GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG CTGGTGGAGTGTGTTGCCAC	207	Bse I (Promega)	Normal: 207 Mutado: 181 + 26
W24X	W24X Cx26 del ID	GAGGTATAATTGACAGATGAA CAAACCGCCCAGAGTAGAAG	114	Xba I (Promega)	Normal: 114 Mutado: 88 + 26
M34T	M34T Cx26 del ID	CCTTTCAGCCACAACGAT* CAAACCGCCCAGAGTAGAAG	144	Bcl I (Promega)	Normal: 121 + 23 Mutado: 144
E47X	E47X-A E47X-B	GCAAAGGAGGTGTGGGGAGAC* GGATGTGGGAGATGGGGAAAGTA	106	Bfa I (Promega)	Normal: 106 Mutado: 85 + 21
V95M	Cx26-2B Cx26-E	CCAGGCTGCAAGAACGTGTG TCGAAGATGACCCGGAAGAA	279	Pml I (Promega)	Normal: 279 Mutado: 190 + 89
W77R	W77R-A W77R-B	CCATCTCCCACATCCGGCTC* GCCTTCGATGCGGACCTTCT	182	MspI (Promega)	Normal: 100 + 82 Mutado: 182

(\*) Bases que tuvieron que ser alteradas para crear el sitio de restricción de la enzima seleccionada.

(\*\*) Desarrollada por Storm K y cols. (1999) [12].

blación cubana, se empleó también la técnica de heteroduplex [13], metodología sencilla que permite detectar mutaciones, aunque no definir las.

Para ello, se diseñaron cuatro juegos de cebadores que amplifican cuatro fragmentos superpuestos del gen *gjb2* y que cubren toda la extensión de la región codificante para la proteína Conexina 26 (Tabla 2) [14].

La localización de las mutaciones caracterizadas en los cuatro fragmentos definidos para el análisis de heteroduplex es la siguiente:

Fragmento I: mutaciones 35delG, W24X, E47X y M34T.

Fragmento II: mutaciones W77R y V95M.

Fragmentos III y IV: ninguna de las mutaciones estudiadas.

Las seis mutaciones estudiadas provocan la formación del heteroduplex en sus respectivos fragmentos, lo cual se verificó antes de comenzar el estudio.

La reacción de amplificación para los cuatro fragmentos se realizó tal como se describe en el proceso de detección de mutaciones por la técnica de PCR-RFLP. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador de la MJ Research, modelo *Minicycler*.

Los programas para la amplificación de los cuatro fragmentos del gen *gjb2* sometidos a análisis por heteroduplex son los siguientes:

Fragmento I del gen *gjb2*: la mezcla se desnaturizó a 94 °C por 2 min y se sometió a 30 ciclos térmicos

13. Kapoor A, Jones M, Shafer RW, Rhee SY, Kazanjian P, Delwart EL. Sequencing-Based Detection of Low-Frequency Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug-Resistant Mutants by an RNA/DNA Heteroduplex Generator-Tracking Assay. *J Virol* (2004); 78:7112-23.

14. Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K, Sanger R. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol* (1992); 118:1213-21.

Tabla 2. Sistemas heteroduplex empleados para la localización de mutaciones en el gen *gjb2*

Fragmento del gen <i>gjb2</i>	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	Localización del fragmento*
I	CAAACCGCCCAGAGTAGAAG GTGATCGTAGCACACGTTCTTG	221	179 al 399
II	CCAGGCTGCAAGAACGTGTG TCGAAGATGACCCGGAAGAA	269	370 al 639
III	TCGAGGAGATCAAAACCCAGAAG GCAAATTCCAGACACTGCAATCA	255	550 al 804
IV	GCCTGTCCCAACTGTGGACT TGAGCACGGTTGCCTCATC	231	714 al 943

(\*) Según la secuencia nucleotídica del ARN mensajero reportada por Lee y cols. (1992) [14].

(94 °C, 45 s; 60 °C, 30 s, 72 °C, 30 s), seguidos de una incubación final a 72 °C durante 2 min.

Fragmento II del gen *gjb2*: la mezcla se sometió a un ciclo térmico (94 °C, 2 min; 58 °C, 1 min; 72 °C, 1 min), seguido de 30 ciclos térmicos (94 °C, 40 s; 58 °C, 30 s, 72 °C, 30 s) y finalmente a una incubación a 72 °C durante 5 min.

Fragmento III y IV del gen *gjb2*: la mezcla se desnaturizó a 94 °C durante 2 min y luego se sometió a 10 ciclos térmicos (94 °C, 15 s; 62 °C, 15 s; 72 °C, 30 s). Posteriormente se realizaron 30 ciclos (89 °C, 15 s; 62 °C, 15 s; 72 °C, 30 s), seguidos de una incubación final a 72 °C durante 10 min.

El éxito de la amplificación se comprobó tal como se describió en el proceso de detección de mutaciones por la técnica de PCR-RFLP.

El análisis de heteroduplex del fragmento correspondiente se realizó tomando una alícuota de 3 a 8 µL del producto amplificado, el cual se desnaturizó en un bloque térmico a 95 °C durante 5 min, y se renaturizó con el descenso natural de la temperatura hasta 37 °C. Posteriormente se colocó en baño de hielo, se le añadieron 2 µL de la solución tampón de carga BFA y se aplicó en un gel de MDE (FMC, EE.UU.) al 20% en una solución tampón 0.5X TBE con un tiempo de corrida de 16 a 20 h. Por medio de la tinción con bromuro de etidio, se visualizó la presencia o no del heteroduplex en un transiluminador de luz ultravioleta.

## Resultados y discusión

El desarrollo del estudio de seis mutaciones en el gen *gjb2*, se dividió en dos etapas en función de las diferentes estrategias de trabajo para cada una de ellas.

La estrategia seguida en una primera etapa se basó en la experiencia de estudios similares en España, los cuales permitieron considerar la hipótesis de que el gen de la conexina 26 tenía un peso importante en la etiopatogenia de las afecciones hipoacúsicas con patrón de herencia autosómico recesivo, y que las seis mutaciones introducidas representarían un alto porcentaje de las alteraciones en este gen. Sobre esta base se estableció la estrategia siguiente:

- En cada individuo afectado se buscaron las seis mutaciones descritas, comenzando siempre por la 35delG. De detectarse dos mutaciones (individuos heterocigotos compuestos) o verificarse el carácter homocigoto para una de ellas, se interrumpía la búsqueda de nuevas mutaciones.

- De no detectarse las dos mutaciones en el individuo, se realizaría el análisis de heteroduplex en el gen. De haberse detectado previamente una mutación, entonces no se realizaría el análisis del fragmento en que está localizada, pues su presencia implicaría la formación del heteroduplex.

Los resultados correspondientes a esta primera etapa indicaron una prevalencia de estas mutaciones inferior a la inicialmente considerada, por lo que se realizó un cambio en la estrategia que se siguió en una segunda etapa del trabajo: 1) Búsqueda de la mutación 35delG (única mutación con frecuencia en la primera etapa apreciable), 2) De no encontrarse homocigotismo para esta mutación, realizar análisis de heteroduplex, excluyendo el fragmento I en caso de heterocigotismo para la 35delG, y 3) De encontrarse heteroduplex en alguno de los fragmentos en los que están localizadas

las restantes 5 mutaciones (fragmentos I y II), realizar la detección directa de las correspondientes mutaciones.

En las condiciones de trabajo en que se realizó el estudio, se verificó que estas mutaciones provocan también la formación de heteroduplex, lo que valida el empleo de la estrategia 2.

Mediante la estrategia correspondiente a la etapa I se analizaron 18 pacientes con antecedentes familiares y 17 pacientes esporádicos. En la etapa 2 se analizaron cuatro pacientes con antecedentes familiares y 12 esporádicos.

Otros cuatro pacientes (uno familiar y tres esporádicos), casos ocasionales, se incorporaron tardíamente al estudio, por lo que solo fue posible llegar hasta la pesquisa de la mutación 35delG. Los resultados del estudio de estos pacientes se tuvieron en cuenta en este trabajo para los cálculos de frecuencia génica de esta mutación.

El análisis de heteroduplex se realizó a 17 de los pacientes estudiados, teniendo en cuenta ambas etapas de trabajo.

Por la técnica PCR-RFLP se detectaron solo cuatro de las seis mutaciones caracterizadas (Tablas 3 y 4). En total se detectaron 20 cromosomas portadores de alguna de estas cuatro mutaciones. En la tabla 5 se presenta el valor porcentual de cada una de estas mutaciones con respecto al total de alelos mutados.

Las mutaciones más frecuentes fueron la 35delG (70% de las mutaciones) y M34T (20%). Las demás

Tabla 3. Resultados del estudio molecular a pacientes con antecedentes familiares

Código Paciente	Detección directa de la mutación						Heteroduplex (fragmento)				Genotipo
	35delG	W77R	E47X	M34T	W24X	V95M	I	II	III	IV	
<b>Etapa I</b>											
0203	+/+										35delG / 35delG
3401	+/+										35delG / 35delG
6306	+/+										35delG / 35delG
7901	+/+										35delG / 35delG
0201	+	+									35delG / W77R
0101	+	-	-	-	-	-			+		35delG / III
0301	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35delG / ?
7103	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35delG / ?
0801	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	E47X / III
6709	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	M34T / ?
1301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6607	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Etapa II</b>											
0401	-						-	-	-	-	
0601	-						-	-	-	-	
4301	-						-	-	-	-	
4501	-						-	-	-	-	
<b>Casos ocasionales</b>											
7301	-										

(+) Presencia de mutación o de heteroduplex.

(-) Ausencia de heteroduplex.

(?) No se ha detectado la segunda mutación.

Casos ocasionales: pacientes que se incorporaron tardíamente al estudio.

mutaciones detectadas (W77R y E47X) representaron el 5% del total (Tabla 5).

El 70% de prevalencia de la mutación 35delG obtenida en este estudio, es muy similar a la reportada por Álvarez y cols. (74%) al estudiar pacientes afectados de España y Cuba [15], y por Moreno y cols. (67.8%) en un estudio a pacientes españoles. [16] La prevalencia de la mutación M34T fue inferior al 1% en el estudio de Álvarez y cols. [15], mientras que en este es la segunda más frecuente (20% de los cromosomas mutados). Las otras dos mutaciones detectadas (W77R y E47X) representan cada una el 5%, valor muy cercano al 4% reportado por Álvarez y cols. [15] y similar a los resultados reportados por Moreno y cols. (3.7%) para la mutación E47X en pacientes españoles y para la mutación W77R en pacientes cubanos (5.1%) [16].

El análisis de heteroduplex resultó ser muy informativo al detectarse la formación de siete heteroduplex en los fragmentos analizados, correspondientes a seis pacientes diferentes y en un paciente se observó la formación de heteroduplex en dos fragmentos amplificados. El heteroduplex complementó una mutación anteriormente detectada en dos de los pacientes.

Cinco de los heteroduplex formados correspondieron al fragmento III. En este fragmento está localizada la mutación R184P, descrita por Álvarez y cols. en la población cubana y española [15]. Este hallazgo convierte a la mutación R184P en una posible causa de las mutaciones que provocan sordera en la población cubana.

En siete de los 17 casos con antecedentes familiares (41% de los pacientes) en los que se realizó el estudio completo, se demostró que el gen *gjb2* es el responsable de la enfermedad, ya que se detectaron dos mutaciones de este gen, mediante la técnica directa o por la formación del heteroduplex (Tabla 3). En un estudio similar, Murgia A y cols. reportaron un rango de prevalencia entre 34 y 50% para los casos autosómicos recesivos [17].

En otros tres casos con antecedentes familiares hay grandes posibilidades de que el gen *gjb2* esté involucrado en la etiopatología de esta enfermedad, por haberse detectado una mutación por cualquiera de las dos técnicas.

Por lo tanto, en diez de los 17 casos familiares (59% de los pacientes) en los que se realizó el estudio completo, se demostró la presencia del gen *gjb2* en la etiopatología.

Este estudio permitió identificar cinco familias en las que el asesoramiento genético y los diagnósticos de portadores y prenatal, pueden realizarse con sus máximas implicaciones, por haberse definido totalmente el genotipo responsable de la enfermedad. Estos resultados demuestran la importancia de extender estos estudios a otras familias afectadas en la población cubana, con vistas a conocer mejor su afección y desarrollar un programa de prevención de las formas hereditarias.

Tabla 4. Resultados de los estudios moleculares a pacientes sin antecedentes familiares (esporádicos)

Código Paciente	Detección directa de la mutación						Heteroduplex (fragmento)				Genotipo
	35delG	W77R	E47X	M34T	W24X	V95M	I	II	III	IV	
Etapa I											
0801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1101	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35delG / ?
1201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1701	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1801	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	I / III
1901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2201	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	M34T / ?
2301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2701	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	M34T / ?
2901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	M34T / ?
3501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3701	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Etapa II											
0501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	? / IV
2001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3201	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	? / III
3301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3601	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7701	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8101	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	? / III
8201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Casos ocasionales											
6001	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35delG / ?
7501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7601	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(+) Presencia de mutación o de heteroduplex.

(-) Ausencia heteroduplex.

(?) No se ha detectado la segunda mutación.

Casos ocasionales: pacientes que se incorporaron tardíamente al estudio.

Tabla 5. Prevalencia de las distintas mutaciones en los alelos afectados

Mutación	Alelos afectados	%
35delG	14	70
M34T	4	20
W77R	1	5
E47X	1	5
Total	20	100

15. Álvarez A, Uriarte A, Villamar M, Del Castillo I, Menéndez I, Romero L, Moreno F. P1470 Analysis of mutation in the *gjb2* gene in spanish and cuban families. Posters: Molecular Basis of Mendelian Disorders. Décimo Congreso Internacional de Genética Humana (2001); Viena, Austria.

16. Moreno F, San Millán JL, Hernández C, Del Castillo I. Contribuciones científicas al conocimiento de las bases moleculares de cuatro enfermedades genéticas. 1ra ed. Madrid (España): Real Patronato sobre Discapacidad; 2003.

17. Murgia A, Orzan E, Polli R et al. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. J Med Genet (1999); 36:829-32.

Recibido en marzo de 2007. Aprobado en diciembre de 2007.