

HIPOACUSIAS DE ORIGEN GENÉTICO ACTUALIZACIÓN

GENETIC SENSORINEURAL HEARING LOSS: UP TO DATE

DRA. VIVIANA DALAMÓN (PH.D.) (1), DRA. ANA BELÉN ELGOYHEN (PH.D.) (1, 2).

1. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR (INGEBI)- CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS, UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES (CONICET).

2. DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

RESUMEN

La hipoacusia es el desorden neurosensorial con mayor prevalencia en los países desarrollados. Cerca del 50% de las hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva son causadas por mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6*. Hasta la fecha se han identificado los genes responsables de más de cuarenta sorderas no sindrómicas y se han identificado más de 140 loci involucrados en las distintas formas de hipoacusias. El diagnóstico certero de la causa de la hipoacusia puede proveer información acerca del pronóstico del paciente y es esencial para un correcto asesoramiento genético. La estrategia de evaluación para abordar un estudio genético requiere: construcción del árbol genealógico de la familia, examen clínico en busca de rasgos asociados a hipoacusia sindrómica y análisis de las audiometrías para elegir el gen "candidato" a analizar. En este trabajo se revisan las causas más comunes de hipoacusia, así como los estudios genéticos existentes y las nuevas terapias celulares en desarrollo.

Palabras clave: Sordera, *GJB2*, *GJB6*, estudios genéticos, terapia génica.

SUMMARY

Sensorineural hearing loss is the most prevalent sensory disorder in developed countries. Approximately 50% of autosomal recessive non-syndromic deafness is caused by mutations in the *GJB2* and *GJB6* genes. To date the genes responsible for more than forty non-syndromic hearing impairments and over 140 loci involved in different forms of

hearing loss have been identified. The correct diagnose of the specific cause of hearing loss in an individual can provide information concerning prognosis and is essential for the accurate genetic counseling. The following is usually required: a three-generation family history, a clinical examination looking for features associated with syndromic deafness and an audiometric analysis to identify "candidate genes" to analyze. In this paper, we review the most common causes of hearing loss, the current genetic studies and new promising cellular therapies.

Key words: Deafness, *GJB2*, *GJB6*, genetic studies, genetic therapy.

INTRODUCCIÓN

Se estima que 1 de cada 1.000 recién nacidos posee algún tipo de deficiencia auditiva, resultando en alteraciones del lenguaje, del habla, del desarrollo cognitivo y psico-social, limitando drásticamente la calidad de vida del afectado. La disfunción auditiva es causada tanto por factores ambientales como genéticos y la proporción de casos que pueden ser atribuidos a causas hereditarias aumenta en forma continua. En más de la mitad de los casos la causa de la sordera es genética y se conocen actualmente numerosos genes que pueden relacionarse con el daño auditivo.

Gracias a los programas obligatorios de exploración auditiva en recién nacidos, que se han implementado en todo el mundo, es posible detectar hoy en día la pérdida auditiva de manera temprana, momento en el cual la intervención en cualquiera de sus formas tiene sus mejores resultados. La tecnología auditiva disponible estimula los centros corticales

de los afectados desde edad temprana, facilitando la plasticidad neuronal y favoreciendo la interpretación posterior del significado del sonido. La falta de estimulación precoz puede afectar en forma permanente la habilidad de un niño para oír y para entender, aún cuando se comience un tratamiento con posterioridad. Se ha demostrado que la estimulación temprana es crítica para el desarrollo de los centros corticales involucrados en la audición y es por ello que todos los métodos que ayuden o faciliten al diagnóstico precoz se vuelven de suma importancia. La privación auditiva temprana se asocia con una pobre adquisición de la capacidad de lectura y de la comunicación tanto oral como escrita. Es por ello que resulta invaluable el trabajo conjunto de padres y educadores, mediando en primer término una intervención auditiva temprana ya sea a través de amplificación, cirugía otológica o implante coclear. El conocimiento profundo y detallado de las causas genéticas de cada una de las hipoacusias genéticas y la implicancia funcional de las alteraciones genéticas en los distintos componentes de la audición, así como el diagnóstico precoz y aún prenatal de los pacientes o parientes de afectados tienen un impacto inmediato en la implementación de terapias con el objetivo de una estimulación auditiva temprana. Actualmente pueden realizarse, en laboratorios especializados, estudios genéticos que pueden ser utilizados no sólo para el manejo clínico del paciente sino para la toma de decisiones personales del afectado y su familia.

PREVALENCIA

La prevalencia reportada de hipoacusia varía en las publicaciones, básicamente debido a diferencias en el criterio diagnóstico, el seguimiento

y los protocolos de screening utilizados. Se considera que 1 de cada 1.000 recién nacidos posee algún tipo de deficiencia auditiva, aunque la incidencia de la hipoacusia neurosensorial continúa aumentando durante la infancia hasta alcanzar valores de 2,7 de cada 1000 niños menores a 5 años y 3,5 de cada 1000 durante la adolescencia (1). El advenimiento del screening neonatal ha provocado la disminución de la edad de diagnóstico de los 24-30 meses a los 2-3 meses en los países desarrollados (2).

La hipoacusia es el desorden neurosensorial con mayor prevalencia en los países desarrollados. Este aumento de la incidencia con la edad, refleja claramente el impacto de la interacción de la genética con el ambiente, así como el disparo generado por el ambiente ante la predisposición genética del individuo, como se demuestra en la ototoxicidad generada por los aminoglucósidos, la otitis media secretora y la otoesclerosis (3).

Las alteraciones auditivas de origen genético se dividen de acuerdo a su forma de presentación en no sindrómicas (70%) y sindrómicas (30%) (4). La forma más común de hipoacusia hereditaria es la forma no sindrómica de herencia autosómica recesiva (80%), es decir en donde ambos padres poseen alguna alteración genética que transmitieron a su descendencia (aún cuando ellos no necesariamente presenten síntomas). El 20% restante se distribuye entre las formas autosómica dominante (12-15%), en donde sólo uno de los progenitores posee alguna alteración genética y su transmisión es suficiente para la aparición de los síntomas, aquellas ligadas al cromosoma X (1-5%) y las de herencia materna por mutaciones en el ADN mitocondrial (1-5%) (Figura 1).

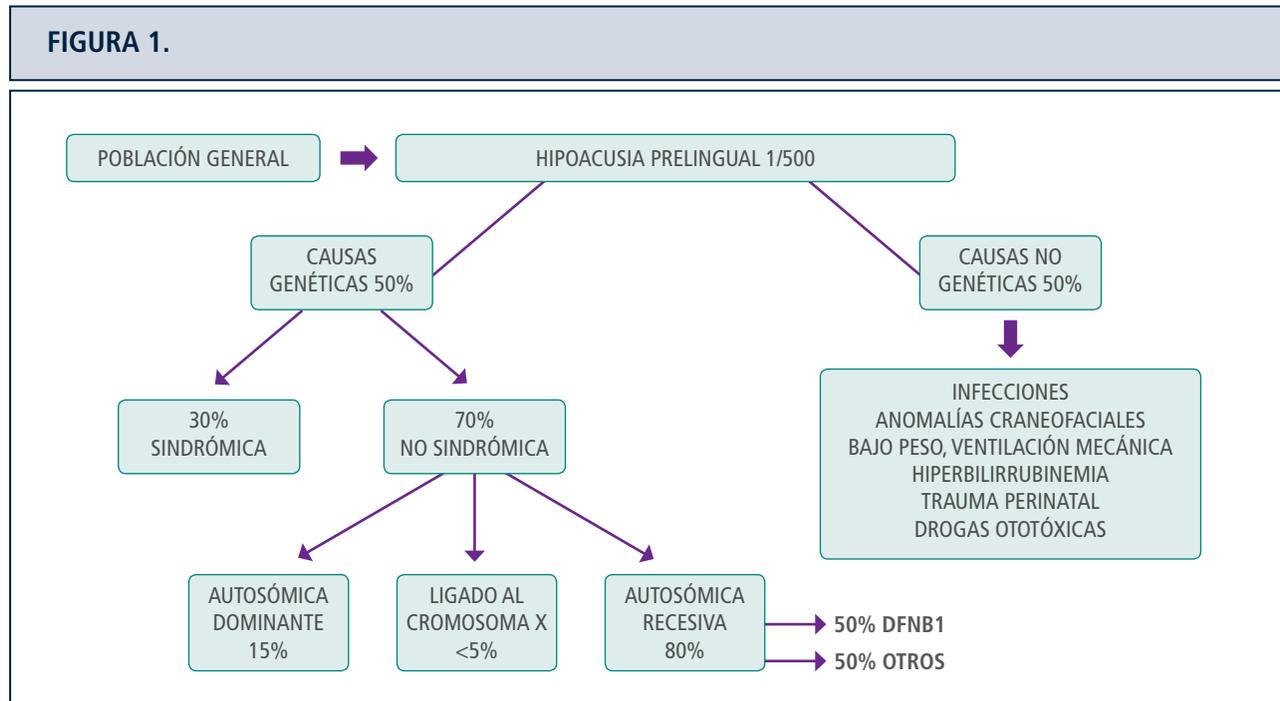


Figura 1. Las alteraciones auditivas de origen genético se clasifican de acuerdo a su forma de presentación. La forma más común de hipoacusia hereditaria es la forma no sindrómica de herencia autosómica recesiva.

LA SORDERA Y LOS GENES

Hasta la fecha se han identificado los genes responsables de más de 40 sorderas no sindrómicas y se han identificado más de 140 zonas en el genoma que se encontrarían involucradas en las distintas formas de hipoacusias. Cada una de estas localizaciones en el genoma se denomina "locus" y se interpreta como la dirección en el ADN en donde se localiza la zona a estudiar. La nomenclatura de cada uno de estos loci se basa en la forma de herencia en la que se transmite la patología. Aquellos locus (o direcciones genéticas) donde se encuentren genes que produzcan hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica dominante se denominarán **DFNA**, numerados actualmente del 1 al 57; las formas de herencia autosómica recesiva se denominan **DFNB**, numerados del 1 al 77; las formas ligadas al cromosoma X se denominan **DFN** numerados del 1 al 8 (una lista actualizada puede consultarse en: Hereditary Hearing loss Homepage: <http://webh01.ua.ac.be/hhh/>).

Si bien es muy difícil hacer generalizaciones, podríamos decir que la mayoría de los loci de herencia autosómica recesiva causan hipoacusia prelingual severa-profunda, con excepción del locus DFNB8, el cual se relaciona con una hipoacusia postlingual y rápidamente progresiva. La mayoría de los loci de herencia autosómica dominante causan hipoacusia postlingual, con excepción de DFNA3, DFNA8, DFNA12 y DFNA19. Los loci ligados al cromosoma X (DFN) pueden ser pre o post linguales.

Varios loci han demostrado estar relacionados con hipoacusias tanto de herencia recesiva como dominante. En estos casos se ha detectado que se debe a distintas mutaciones en el mismo gen, cada una de las cuales produce un fenotipo distinto. Por ejemplo, el loci denominado DFNB1 y DFNA3, los cuales mapean en 13q12, son causados por distintas mutaciones en el gen *GJB2*, algunas de las cuales producen una patología de herencia dominante y otras recesiva. Los loci DFNB2 y DFNA11, que mapean en 11q13.5, son producidos por distintas mutaciones en el gen *MYO7A*.

ESTUDIOS GENÉTICOS

Aproximadamente el 50% de las hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva son causadas por mutaciones en el brazo largo del cromosoma 13 (13q11-q12), en el locus llamado DFNB1. Estudios genéticos de clonado, ligamiento e inmunohistoquímica han establecido que los genes responsables son los llamados *GJB2* y *GJB6*, que codifican para las proteínas conexina 26 y conexina 30, respectivamente (5-8). El otro 50% de los casos se debería a otras mutaciones en cualquiera de los numerosos genes descritos, muchas de las cuales sólo han sido encontradas en una o dos familias.

Locus DFNB1

La forma DFNB1 se caracteriza por su inicio prelingual. La severidad varía generalmente de moderada a profunda y se ve variación intrafamiliar, es decir que aún con la misma mutación puede encontrarse distinta evolución de la patología. La hipoacusia es generalmente bilateral, estable,

y las audiometrías son mayormente chatas o descendentes, afectando a todas las frecuencias.

Hasta la fecha se han detectado más de 100 mutaciones distintas en el gen *GJB2* (una lista actualizada se puede consultar en la página "Connexin Deafness Homepage": <http://davinci.crg.es/deafness/index.php>). Claramente existen mutaciones que se presentan con mayor frecuencia en determinadas poblaciones. Así, se ha descrito que una delección puntual de una guanina en la posición 35 del gen (c.35 del G) sería responsable del 80% de los alelos mutados en la población caucásica. Específicamente se calculó que representaría la causa de la sordera no sindrómica en 54 a 88% de los pacientes italianos, españoles, griegos y austriacos (9). La delección de la citosina 235 (c.235 del C) es la de mayor frecuencia en Japón, China y Corea (10). La delección de una timina en la posición 167 del gen (c.167 del T), se encontraría presente en el 4% de la población de judíos Ashkenazi (8).

La lista de mutaciones identificadas incluyen aquellas que producen pérdida de función por producir proteínas truncas (como la c.35 del G o la c.235 del C), pero también aquellas que cambian sólo un aminoácido por otro, alterando la secuencia proteica o la conformación de la proteína y generando por lo tanto un anclado incorrecto en la membrana, falla en el tráfico intracelular, alteraciones en la apertura del canal, o una incorrecta interacción entre proteínas.

Las conexinas

La conexina es miembro de una familia de proteínas ampliamente conservada, las cuales forman canales intercelulares que permiten el pasaje de diversos iones o pequeñas moléculas. Se denominan con un número de acuerdo a su masa molecular y se dividen en α y β según la similitud de secuencia aminoácídica. Los genes por lo tanto se mencionan como GJA o GJB seguido por un número. Así la conexina 26 es codificada por el gen *GJB2* y la conexina 30 por el *GJB6*. Cada conexina contiene 4 regiones transmembrana, dos loops extracelulares y 3 regiones intracitoplasmáticas. Los canales intercelulares se forman por la oligomerización en estructuras hexaméricas llamadas "conexones". Estos conexones formarían un hemicanal, y el canal intercelular se formaría cuando conexones compatibles de dos células adyacentes interactúan entre sí (Figura 2). Las conexinas varían en su patrón de expresión y selectividad iónica, otorgando distintas propiedades a los canales que forman, permitiendo el pasaje de metabolitos (azúcares, aminoácidos, glutatión, etc), iones citoplasmáticos y moléculas de bajo peso molecular como segundos mensajeros (AMPc, GMPc, ATP, etc) hasta de 1kDa (11, 12). Se ha demostrado que las uniones estrechas del tejido conectivo y epitelial de la cóclea son responsables del reciclado del potasio endolinfático (13). La diversidad de los canales se basa en parte en la formación de canales heteroméricos (en donde un hemicanal es formado por más de un tipo de conexina) o por los canales heterotípicos (producido por el ensamblado de dos hemicanales, cada uno producto de distintas conexinas). Estas combinaciones producen canales con propiedades funcionales distintas. Diversos genes de conexinas han sido relacionados con desórdenes genéticos, como cataratas, Charcot-Marie-

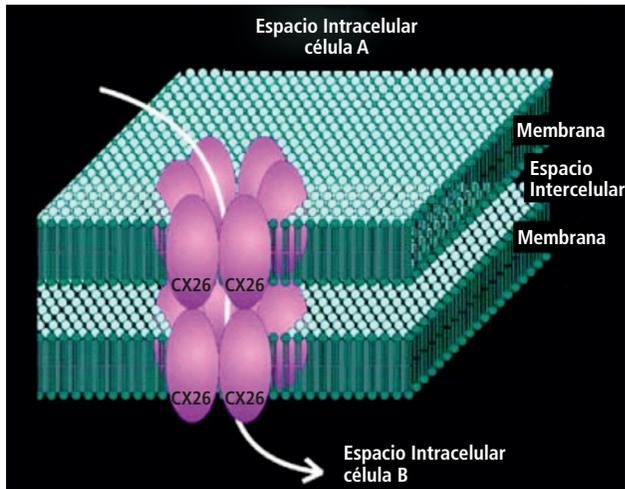


Fig.2. La conexina es una proteína que forma canales intercelulares, permitiendo el pasaje de iones y pequeñas moléculas. Los canales intercelulares se forman por la oligomerización en estructuras hexaméricas llamadas "conexones". Estos conexones formarían un hemicanal, y el canal intercelular se formaría cuando conexones compatibles de dos células adyacentes interactúan entre sí.

Tooth, oculodentodígito-displasia y sordera síndrómica y no síndrómica. Sin embargo, la hipoacusia es sin dudas la más importante en términos de frecuencia poblacional.

El gen *GJB6*

Si bien el 50% de los pacientes con hipoacusias prelinguales no síndrómicas de herencia autosómica recesiva poseen mutaciones en el gen *GJB2*, una gran fracción (10-42%) de los pacientes con mutaciones en *GJB2* poseen sólo una mutación identificada. Esto llevó a descubrir una gran delección de 309 Kb la cual involucra la región 5' del gen *GJB6*, la cual resulta la segunda mutación más frecuente en la población Española, luego de la c.35delG en la conexina 26. Se la denomina del (*GJB6-D13S1830*) y estudios multicéntricos determinaron que resulta altamente frecuente en España, Israel, Gran Bretaña y el sur de Francia (14).

Otra mutación más pequeña, de 232 Kb en la misma región, llamada del (*GJB6-D13S1854*) resulta la segunda mutación más común causal de hipoacusia neurosensorial de herencia autosómica recesiva en España, Francia, Israel, Gran Bretaña, Brasil, Estados Unidos, Bélgica y Austria (15). Diferentes estudios demuestran frecuencias disímiles para cada una de las delecciones, así como variados patrones de distribución geográfica. La mutación del (*GJB6-D13S1830*) parece tener un patrón más frecuente que la del (*GJB6-D13S1854*). Esta diferencia entre países ilustra la complejidad de la epidemiología genética de la hipoacusia no síndrómica.

OTROS GENES EN ESTUDIO

El gen *OTOF*

Un tercer locus relacionado con la forma recesiva no síndrómica de la hipoacusia se localiza en 2p23.1, donde se encuentra el gen *OTOF* que codifica para la proteína otoferlina (16). La mutación Q829X en el exón 22

de este gen, sería la tercera causa más frecuente de sordera en la población Española (17, 18). Las mutaciones en el gen *OTOF* cobran relevancia debido a que los pacientes pasan los programas universales de screening neonatal realizados mediante la medición de las emisiones otoacústicas (OAEs). La patología puede recién ser puesta de manifiesto al realizar otro tipo de mediciones como los potenciales evocados (BERA), lo cual se realiza habitualmente al percibir los síntomas en el afectado, provocando un retraso muy importante en el diagnóstico del recién nacido y demorando la implementación de la terapéutica adecuada. La identificación de las mutaciones en el gen *OTOF* permite reducir en forma significativa los falsos positivos producidos en los programas de screening universales establecidos mediante OAEs en las distintas poblaciones.

El gen *MTRNR1*: Hipoacusia no síndrómica mitocondrial

La mitocondria es la encargada de proveer energía a la célula que la alberga y llamativamente posee su propio ADN. Las enfermedades por alteraciones en el ADN mitocondrial afectan generalmente a tejidos con alto requerimiento energético, como los músculos y nervios. Es por esto que la mayoría de las mutaciones en los genes mitocondriales causan un amplio espectro de desórdenes multisistémicos de herencia materna, sin embargo las mutaciones en los genes mitocondriales *MT-RNR1* y *MT-TS1* causan principalmente hipoacusia no síndrómica. Se ha establecido por otro lado, que en las hipoacusias no síndrómicas de herencia materna, mutaciones en el ADN mitocondrial sensibilizarían a las células del oído interno a la toxicidad por aminoglucósidos (5), particularmente la estreptomycin y gentamicina, utilizadas en el tratamiento contra bacilos gram negativos. Estas drogas generarían la pérdida de las células ciliadas del oído interno y la merma de neuronas de esa región, con la consecuente disminución permanente de la audición (19).

El gen *MTRNR1* codifica para la subunidad 12S del ARN. Una mutación puntual en la posición 1555 del gen *MTRNR1* se ha reportado frecuentemente (A1555G) (19, 20). Los portadores de esta mutación muestran una susceptibilidad aumentada a los aminoglucósidos, aunque la hipoacusia puede desarrollarse aún en ausencia de tratamiento con estas drogas y se han asociado diferentes fenotipos a la misma mutación, consistente con el efecto de genes modificadores (5, 19, 21-23).

El gen *MT-TS1* codifica para el ARN de transferencia RNA^{Ser(UCN)}. Se ha reportado a la mutación A7445G en pacientes hipoacúsicos, sin embargo su penetrancia es baja (la lista de mutaciones reportadas puede consultarse en <http://webh01.ua.ac.be/hhh/>).

LOS AUDIOGRAMAS EN EL ESTUDIO MOLECULAR

Los estudios familiares de las formas de hipoacusia de herencia autosómica dominante han demostrado una gran heterogeneidad. A diferencia de las formas de herencia autosómica recesiva donde una gran cantidad de casos en muchas poblaciones presentan mutaciones en un determinado gen (*GJB2*), no se ha podido identificar un único gen responsable de la mayoría de los casos de herencia dominante. Es debido a esto que cobra suma importancia contar con los datos del audiograma, ya que su perfil

puede ser particular y por lo tanto volverse útil en predecir genes candidatos para el estudio genético. Por ejemplo las mutaciones en el gen *WFS1* se han detectado en el 75% de las familias con hipoacusia no síndrómica de herencia autosómica dominante, los cuales poseen un audiograma de afecta inicialmente las frecuencias bajas pero mantiene las altas.

Las mutaciones en el gen *TECTA*, el cual codifica para la α -tectorina, producen un cambio característico en al audiograma dependiendo de su localización. Las mutaciones en el dominio ZP causan hipoacusia estable o progresiva a frecuencias medias, mientras que las mutaciones en la zona ZA producen hipoacusia progresiva a altas frecuencias. Características de los audiogramas y los genes a los que se los relaciona son detallados brevemente en las Tablas 1 y 2.

ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN

El diagnóstico certero de la causa genética de la hipoacusia en un paciente provee información del pronóstico y la evolución de su enfermedad, y resulta esencial para el consejo genético del afectado y su familia. Debido al amplio número de genes implicados en la patología, para

proceder a su análisis se requiere:

- **Construcción del árbol genealógico de la familia:** se debe prestar atención a la presencia de otros afectados. El mismo debe incluir los estudios correspondientes a cada uno de ellos.

- **Examen clínico:** todo individuo hipoacúsico debe ser evaluado en busca de rasgos asociados a hipoacusia síndrómica, como ser hendidura branquial, quistes o fístulas, hoyuelos o mamelones preauriculares, hipertelorismo, heterocromía del iris, mechones blancos en el pelo, anomalías pigmentarias, alta miopía, retinopatía pigmentaria, bocio y anomalías craneofaciales, alteraciones renales y cardíacas u otras dismorfias. Los afectados con hipoacusia progresiva deben ser evaluados para el Síndrome de Alport (caracterizado por la afección renal, coclear y ocular), el Síndrome de Pendred (caracterizado por desarrollar hipoacusia neurosensorial bilateral severa a profunda, generalmente congénita, disfunción vestibular, anormalidades del hueso temporal y bocio eutiroideo), y el Síndrome de Stickler (afección del tejido conectivo que incluye miopía, cataratas, desprendimiento de retina, hipoacusia neurosensorial o conductiva, paladar hendido, perfil facial plano, displasia espón-dilo-epifisaria moderada y artritis precoz). Es importante tener en cuenta

TABLA 1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y GENES CONOCIDOS QUE PRODUCEN HIPOACUSIA NO SINDRÓMICA DE HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE.

Locus	Gen	Localización	Edad de aparición	Audiograma
DFNA1	DIAPH1	5q31	Postlingual/1 ^{ra} Bajas frecuencias	Progresiva
DFNA2	GJB3	1p35.1	Postlingual/2 ^{da}	Altas frecuencias, progresiva
	KCNQ4	1p34		
DFNA3	GJB2	13q11-q12	Prelingual	
	GJB6	13q12		
DFNA4	MYH14	19q13	Postlingual	Chato/levemente descendiente
DFNA5		7p15	Postlingual/1 ^{ra}	Altas frecuencias, progresiva
DFNA6/14/38	WFS1	4p16.1	Prelingual	Bajas frecuencias, progresiva
DFNA8/12	TECTA	11q22-q24		Frecuencias medias
DFNA9	COCH	14q12-q13	Postlingual/ 2 ^{da}	Altas frecuencias, progresiva
DFNA10	EYA4	6q23	Postlingual/3 ^{ra} , 4 ^{ta}	Chato/levemente descendiente
DFNA11	MYO7A	11q13.5	Postlingual/1 ^{ra}	
DFNA13	COL11A2	6p21.3	Postlingual/2 ^{da}	Frecuencias medias
DFNA15	POU4F3	5q31	Postlingual	Altas frecuencias, progresiva
DFNA17	MYH9	22q11.2		
DFNA20/26	ACTG1	17q25		
DFNA22	MYO6	6q13		
DFNA28	TFCP2L3	8q22		Chato/levemente descendiente
DFNA36	TMC1	9q13-q21		
DFNA39	DSPP	4q21.3		Altas frecuencias, progresiva
DFNA44	CCDC50			Frecuencias bajas y medias, progresiva
DFNA48	MYO1A	12q13-q14		Progresiva

TABLA 2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y GENES CONOCIDOS QUE PRODUCEN HIPOACUSIA NO SINDRÓMICA DE HERENCIA AUTOSÓMICA RECESIVA.

Locus	Gen	Localización	Edad de aparición	Audiograma
DFNB1	GJB2	13q11-q12	Prelingual	Generalmente estable
	GJB6	13q12		
DFNB2	MYO7A	11q13.5	Prelingual, postlingual	
DFNB3	MYO15	17p11.2	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB4	SLC26A4	7q31	Prelingual, postlingual	Estable, progresiva
DFNB6	TMIE	3p21	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB7/11	TMC1	9q13-q21		
DFNB8	TMPRSS3	21q22.3	Postlingual	Estable, progresiva
DFNB10			Prelingual	
DFNB9	OTOF	2p22-p23	Prelingual	Generalmente severa a profunda; estable
DFNB12	CDH23	10q21-q22	Prelingual	Severa a profunda; estable
DFNB16	STRC	15q15		
DFNB18	USH1C	11p15.1		
DFNB21	TECTA	11q22-q24		
DFNB22	OTOA	16p12.2		
DFNB23	PCDH15	10p11.2-q21		
DFNB24	RDX	11q23		
DFNB28	TRIOBP	22q13		
DFNB29	CLDN14	21q22.3		
DFNB30	MYO3A	10p11.1		
DFNB31	WHRN	9q32-q34		—
DFNB35	ESRRB	14q24.1-24.3		
DFNB36	ESPN	1p36.31		Moderada a profunda; estable
DFNB37	MYO6	6q13		
DFNB49	MARVELD2	5q12.3-q14.1		
DFNB53	COL11A2	6p21.3		
DFNB59	PJKV	2q31.1-q31.3		
DFNB66/67	LHFPL5	6p21.2-22.3		Severa a profunda; estable

que las formas de hipoacusia de herencia autosómica dominante tienden a tener una expresividad variable, por lo que el diagnóstico certero depende en gran medida de un examen exhaustivo no solo del afectado, sino de su familia.

• **Datos audiológicos:** Las audiometrías deben ser analizadas no sólo con respecto a la severidad de la afección, sino teniendo en cuenta a las frecuencias que afectan y su evolución en el tiempo. Las hipoacusias repentinas o rápidamente progresivas deben ser analizadas en el contexto del Síndrome de Pendred, BOR ó neoplasmas como NF2. Es importante adjuntar las audiometrías del paciente al ordenar el estudio molecular, ya que las mismas pueden orientar al especialista acerca del gen o genes a estudiar.

ESTUDIOS GENÉTICOS ACTUALMENTE DISPONIBLES EN LABORATORIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El estudio de los genes *GJB2* y *GJB6* ya se realiza en forma casi rutinaria en la mayoría de los laboratorios, y debe ser considerado en los afectados con hipoacusia neurosensorial congénita no sindrómica. Aunque es importante recordar también que pueden encontrarse otras formas de presentación.

Si bien se han reportado una amplia gama de mutaciones y genes relacionados con la hipoacusia, no se recomienda un estudio a ciegas de cualquiera de ellos, en ausencia de datos adicionales que permitan deducir un gen "candidato" a ser estudiado (por ejemplo el hallazgo de neuropatía auditiva consistente con el screening de mutaciones en el gen *OTOF*), debido no sólo al costo prohibitivo de los estudios sino

a la alta probabilidad de obtener resultados negativos. Sin embargo, es posible deducir genes candidatos mediante el análisis exhaustivo de las audiometrías. Teniendo una sospecha con base clínica que oriente al laboratorio, es posible analizar actualmente casi cualquier gen.

Si se quisiera hacer un orden de méritos de los genes más frecuentemente implicados en la hipoacusia de herencia autosómica recesiva, *GJB2* es responsable de más del 50% de los casos, seguido de *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23* y *TMC1*. Ninguno de los genes asociados a las formas de herencia autosómica dominante representa una preponderancia de casos, sin embargo puede considerarse que se reportan más frecuentemente mutaciones en los genes *WFS1*, *KCNQ4*, y *COCH*.

El criterio de selección para el estudio molecular en forma clínica se basa generalmente en:

1. Alta frecuencia de casos (ej: *GJB2*)
2. Asociación con otro rasgo reconocible (ej: *SLC26A4* y acueducto vestibular agrandado)
3. Audiograma con características propias (ej: *WFS1*).

La tecnología aplicada al estudio molecular está evolucionando en forma tan acelerada que se estima que en los próximos 5 años podría ser implementada al estudio diagnóstico, causando un avance inmenso en términos de costo y eficiencia. Su utilización haría posible el análisis de la mayoría, si no es que todos, los genes causantes de hipoacusia, en oposición al estudio de uno o unos pocos genes que se realizan actualmente en forma rutinaria. Este avance generará un progreso mayúsculo en el diagnóstico, brindando datos epidemiológicos y revelando nuevas correlaciones genotipo-fenotipo.

Entre las formas sindrómicas más estudiadas desde el laboratorio molecular se encuentra el Síndrome de Pendred. Es una forma relativamente común de hipoacusia de herencia autosómica recesiva, de aparición en la infancia. Existe una alteración en el transporte de yodo en el tirocito, lo cual produce el bocio característico del síndrome, aunque éste puede pasar desapercibido hasta la adolescencia o vida adulta, dificultando el diagnóstico temprano de la hipoacusia. Sin embargo se encuentran presentes, en forma casi invariable, anomalías estructurales de la cóclea y dilatamiento del acueducto vestibular. La causa genética del Síndrome de Pendred se basa en mutaciones en el gen ***SLC26A4***, el cual codifica para el transportador aniónico "pendrina". Se han reportado más de 90 mutaciones en el gen *SLC26A4*, localizadas a lo largo de toda la región codificante incluyendo mutaciones sin sentido, con cambio de sentido, en los sitios de splicing, con corrimiento del marco de lectura y hasta grandes deleciones parciales. La distribución de mutaciones varía acorde a la población en estudio, por lo que debe secuenciarse la totalidad de los 21 exones del gen con el objetivo de identificar alelos mutantes.

Existen más de 300 formas de hipoacusia sindrómica, en las cuales existen signos clínicos asociados característicos, en muchas de estas formas se conoce el gen causal, por lo que se analiza directamente el gen rela-

cionado (una lista bastante completa de los laboratorios internacionales puede consultarse en <http://www.genetests.org>).

En los casos familiares, en los que se encuentran disponibles varios familiares del afectado, es posible realizar estudios de ligamiento, mediante los cuales se deduce el locus o zona del genoma en donde, con alta probabilidad, se encontraría el gen causante de la patología. Estos estudios permiten achicar el espectro de genes a analizar cuando los datos audiométricos o la clínica del paciente no son contundentes.

El conocimiento profundo y detallado de las causas genéticas de las distintas formas de hipoacusia de origen genético y la implicancia funcional que las distintas variaciones de secuencia provocan en los distintos componentes de la audición, así como el diagnóstico precoz y aún prenatal de los pacientes o parientes de afectados tienen un impacto inmediato en la implementación de terapias con el objetivo de una estimulación auditiva temprana.

RESPUESTA POST IMPLANTE COCLEAR EN PACIENTES CON MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN *GJB2*

Actualmente existe una terapéutica ampliamente implementada para los pacientes con hipoacusias profundas mediante la utilización de implantes cocleares, y los pacientes responden al reemplazar la amplificación acústica por el estímulo eléctrico. A diferencia del audifono, no modifica el sonido haciéndolo más claro y fuerte sino que sortea las partes dañadas del sistema auditivo y estimula directamente el nervio auditivo, permitiendo a las personas profundamente sordas recibir el sonido. El implante coclear pasa por alto las células sensoriales dañadas, convierte el sonido en señal eléctrica y envía esta señal al nervio acústico.

El análisis de resultados post-implante en pacientes con mutaciones en el gen *GJB2* son controvertidos y hasta contrapuestos. El pronóstico de dichos implantes es altamente variable y depende de varios factores como la edad a la que se implanta, la audición residual y fundamentalmente la causa de la hipoacusia subyacente. Es claro pensar que se obtendrán resultados limitados cuando existe un daño central (ej: meningitis), comparado con algún daño periférico como los observados por los producidos por mutaciones genéticas en los genes *GJB2* y/o *GJB6*.

En un trabajo comparativo realizado en nuestro laboratorio entre pacientes con y sin mutaciones en el gen *GJB2* no encontramos diferencias significativas en la percepción del habla entre los dos grupos (24), resultados concordantes con lo reportado por otros grupos (25-27). Sin embargo, otros estudios han demostrado resultados opuestos, poniendo en evidencia una mejor evolución en pacientes con mutaciones en el gen *GJB2*, adquiriendo una mejor percepción del lenguaje y más rápido beneficio en los tests (28-31). Esta discrepancia puede deberse a diferencias en la batería de tests utilizados en cada trabajo para medir los resultados post-implante, o a factores tanto genéticos como no genéticos no tenidos en cuenta en los estudios comparados. Un análisis minu-

cioso de los trabajos muestra un seguimiento post-implante insuficiente, discapacidades motrices en los pacientes, bajo peso al nacer, autismo, retraso en el aprendizaje y desórdenes de déficit de atención que fueron especificados o excluidos en ciertos estudios, pero no tenidos en cuenta en otros (30-32).

TERAPIA GÉNICA Y CELULAR PARA ENFERMEDADES DEL OÍDO INTERNO

A diferencia de las células responsables del tacto, gusto y olfato, las células sensoriales del oído no son capaces de regenerarse en humanos, por lo que su pérdida genera un déficit de audición permanente. La audición depende en gran medida del funcionamiento de las células ciliadas y de sus neuronas asociadas al ganglio espiral, por lo que defectos en cualquiera de estas células llevará a hipoacusia. La pérdida de función del sistema auditivo debido a la degeneración o al mal funcionamiento de las células que lo componen, puede recomponerse, en parte, mediante los implantes cocleares. Sin embargo, su funcionamiento dependerá de que exista una vía de conducción eficaz. Este tratamiento ofrece una restauración parcial de la función auditiva y es indicado en un número limitado de casos. El dispositivo tiende a reproducir la función de las células sensoriales. Sin embargo se ha demostrado ampliamente que los implantes son incapaces de restaurar el espectro completo de frecuencias que el oído humano es capaz de percibir, y la supervivencia morfológica y funcional del sistema de conducción es fundamental. Con ese objetivo existen numerosos enfoques tendientes a restaurar la audición, incluyendo la terapia celular de reemplazo utilizando *stem cells*, terapia génica para incorporar material genético exógeno e inducción farmacológica tendiente a favorecer la regeneración intrínseca del tejido (33, 34). Existen también estudios tendientes a inducir la aparición de nuevas células ciliadas en el epitelio auditivo de mamíferos (35), así como otros que se esfuerzan en reducir la degeneración de las células ciliadas y sus neuronas asociadas mediante agentes de protección (36, 37). Los experimentos con neurotrofinas han demostrado un efecto protector, así como inhibidores de la apoptosis y antagonistas del glutamato han demostrado la habilidad de promover la supervivencia de las células ciliadas (38, 39). La terapia celular podría convertirse en un tratamiento efectivo para proteger o reemplazar a las células ciliadas y a sus neuronas asociadas, como estrategia novedosa con el objetivo de reparar el sistema nervioso al restaurar las células perdidas. Sorprendentemente se ha observado que algunas células derivadas del Sistema Nervioso Central que son transplantadas al epitelio vestibular exhiben marcadores celulares característicos de las células ciliadas, indicando que estas células poseen la habilidad de diferenciarse in vivo (40). Se han publicado recientemente varios trabajos que describen la existencia de células con potencial proliferativo, fuentes de precursores que servirían para reemplazar a las células ciliadas perdidas. La capa ependimal del ventrículo lateral contendría células que comparten características morfológicas y funcionales con las células ciliadas internas, y las células de la zona subventricular del ventrículo lateral podrían diferenciarse a células del ganglio espiral (41, 42). Esto demuestra que la plasticidad funcional de células renovables y las condiciones que promuevan su

reprogramación funcional pueden ser utilizadas para la terapia celular tendiente a reestablecer el sistema auditivo.

Es sabido que luego de la pérdida de células ciliadas, muchas células del ganglio retraen sus sinapsis y degeneran. Las terapias con factores neurotróficos tienden a prevenir la denervación aferente (43), sin embargo en muchos casos el daño puede haber avanzado demasiado y requerir por lo tanto de terapias de implante/reemplazo celular. El desafío planteado es proveer fuentes potenciales de células que substituyan a las células ciliadas perdidas, así como generar neuronas que conecten funcionalmente con ellas, reconstituyendo el circuito neurosensorial del oído interno.

Por otro lado se desarrollan actualmente modelos animales para elucidar los procesos fisiopatológicos en la cóclea, como ratones con neuropatía auditiva por falta de otoferlina, con Síndrome de Usher o alteraciones en la conexina (44). Trabajos realizados en nuestro laboratorio con ratones genéticamente modificados, han demostrado que puede aumentarse la protección al daño acústico incorporando mutaciones en los genes que codifican para las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de receptores colinérgicos nicotínicos. La sustitución de un sólo aminoácido en la región transmembrana 2, es suficiente para aumentar la función de la proteína codificada por este gen en las células ciliadas de la cóclea, fortaleciendo considerablemente la protección al trauma acústico que el sistema eferente olivoclear ejerce en el oído interno. Esto abre un campo fértil para la prevención farmacológica de patologías derivadas como la hipoacusia y el tinnitus (45).

CONCLUSIÓN

El conocimiento detallado y en profundidad de las causas genéticas de cada una de las formas de hipoacusia tiene un impacto inmediato en la implementación de terapias tendientes a una estimulación auditiva temprana en cualquiera de sus formas. Actualmente pueden realizarse, en laboratorios especializados, diversos estudios genéticos que resultan invaluable para el manejo clínico del paciente, así como para la toma de decisiones personales del afectado y su familia. Los avances tecnológicos y el conocimiento adquirido acerca del funcionamiento del sistema auditivo en cada una de sus partes han resultado una herramienta poderosa y han multiplicado de manera exponencial el conocimiento previo. En este trabajo hemos resumido algunos de los avances más importantes en el conocimiento de las bases genéticas de la hipoacusia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Morton, C.C. and W.E. Nance, Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 2006; 354: p. 2151-64.
2. Harrison, M., J. Roush, and J. Wallace, Trends in age of identification and intervention in infants with hearing loss. *Ear Hear* 2003; 24: p. 89-95.
3. Hilgert, N., R.J. Smith, and G. Van Camp, Forty-six genes causing

nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res* 2008.

4. Cremers, C.W., H.A. Marres, and P.M. van Rijn, Nonsyndromal profound genetic deafness in childhood. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 630: p. 191-6.

5. Estivill, X., P. Fortina, S. Surrey, et al., Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351: p. 394-8.

6. Lee, S.W., C. Tomasetto, D. Paul, K. Keyomarsi, and R. Sager, Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol* 1992; 118: p. 1213-21.

7. Kelsell, D.P., J. Dunlop, H.P. Stevens, et al., Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: p. 80-3.

8. Zelante, L., P. Gasparini, X. Estivill, et al., Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997; 6: p. 1605-9.

9. Gasparini, P., R. Rabionet, G. Barbutani, et al., High carrier frequency of the 35 del G deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35 del G. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: p. 19-23.

10. Liu, X.Z., X.J. Xia, X.M. Ke, et al., The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002; 111: p. 394-7.

11. Saez, J.C., V.M. Berthoud, M.C. Branes, A.D. Martinez, and E.C. Beyer, Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003; 83: p. 1359-400.

12. Willecke, K., J. Eiberger, J. Degen, et al., Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002; 383: p. 725-37.

13. Rabionet, R., P. Gasparini, and X. Estivill, Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat* 2000; 16: p. 190-202.

14. Marlin, S., D. Feldmann, H. Blons, et al., GJB2 and GJB6 mutations: genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131: p. 481-7.

15. Esmaili, M., M. Bonyadi, and M. Nejadkazem, Common mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in affected families with autosomal

recessive non-syndromic hearing loss from Iran: simultaneous detection of two common mutations (35delG/del(GJB6-D13S1830)) in the DFNB1-related deafness. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71: p. 869-73.

16. Yasunaga, S., M. Grati, M. Cohen-Salmon, et al., A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 1999; 21: p. 363-9.

17. Migliosi, V., S. Modamio-Hoybjor, M.A. Moreno-Pelayo, et al., Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2002; 39: p. 502-6.

18. Rodriguez-Ballesteros, M., F.J. del Castillo, Y. Martin, et al., Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat* 2003; 22: p. 451-6.

19. Prezant, T.R.A., J. V.; Bohlman, M. C.; Bu, X.; Oztas, S.; Qiu, W.-Q.; Arnos, K. S.; Cortopassi, G. A.; Jaber, L.; Rotter, J. I.; Shohat, M.; Fischel-Ghodsian, N. ; Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genet.* . 1993; 4: p. 289-294.

20. Usami, S., S. Abe, M. Kasai, et al., Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope* 1997; 107: p. 483-90.

21. Del Castillo, I., M.A. Moreno-Pelayo, F.J. Del Castillo, et al., Prevalence and evolutionary origins of the del (GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 2003; 73: p. 1452-8.

22. van Camp, G., Smith RJ, Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet* 2000; 57: p. 409-414.

23. Kokotas, H., M.B. Petersen, and P.J. Willems, Mitochondrial deafness. *Clin Genet* 2007; 71: p. 379-91.

24. Dalamon, V., V. Lotersztejn, M. Lipovsek, et al., Performance of speech perception after cochlear implantation in DFNB1 patients. *Acta Otolaryngol* 2009; 129: p. 395-8.

25. Wiley, S., D. Choo, J. Meinzen-Derr, L. Hilbert, and J. Greinwald, GJB2 mutations and additional disabilities in a pediatric cochlear implant population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: p. 493-500.

26. Taitelbaum-Swead, R., Z. Brownstein, C. Muchnik, et al., Connexin-associated deafness and speech perception outcome of cochlear implantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132: p. 495-500.

27. Dahl, H.H., M. Wake, J. Sarant, et al., Language and speech

perception outcomes in hearing-impaired children with and without connexin 26 mutations. *Audiol Neurotol* 2003; 8: p. 263-8.

28. Sinnathuray, A.R., J.G. Toner, A. Geddis, et al., Auditory perception and speech discrimination after cochlear implantation in patients with connexin 26 (GJB2) gene-related deafness. *Otol Neurotol* 2004; 25: p. 930-4.

29. Sinnathuray, A.R., J.G. Toner, J. Clarke-Lytle, et al., Connexin 26 (GJB2) gene-related deafness and speech intelligibility after cochlear implantation. *Otol Neurotol* 2004; 25: p. 935-42.

30. Fukushima, K., K. Sugata, N. Kasai, et al., Better speech performance in cochlear implant patients with GJB2-related deafness. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 62: p. 151-7.

31. Connell, S.S., S.I. Angeli, H. Suarez, et al., Performance after cochlear implantation in DFNB1 patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 137: p. 596-602.

32. Bauer, P.W., A.E. Geers, C. Brenner, J.S. Moog, and R.J. Smith, The effect of GJB2 allele variants on performance after cochlear implantation. *Laryngoscope* 2003; 113: p. 2135-40.

33. Izumikawa, M., R. Minoda, K. Kawamoto, et al., Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005; 11: p. 271-6.

34. Kesser, B.W., G.T. Hashisaki, K. Fletcher, H. Eppard, and J.R. Holt, An in vitro model system to study gene therapy in the human inner ear. *Gene Ther* 2007; 14: p. 1121-31.

35. Kawamoto, K., S. Ishimoto, R. Minoda, D.E. Brough, and Y. Raphael, Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 2003; 23: p. 4395-400.

36. Miller, J.M., D.H. Chi, L.J. O'Keeffe, et al., Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int J Dev Neurosci* 1997; 15: p. 631-43.

37. Shinohara, T., G. Bredberg, M. Ulfendahl, et al., Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: p. 1657-60.

38. Nakagawa, T., T.S. Kim, N. Murai, et al., A novel technique for inducing local inner ear damage. *Hear Res* 2003; 176: p. 122-7.

39. Cunningham, L.L., A.G. Cheng, and E.W. Rubel, Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *J Neurosci* 2002; 22: p. 8532-40.

40. Tateya, I., T. Nakagawa, F. Iguchi, et al., Fate of neural stem cells grafted

into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 2003; 14: p. 1677-81.

41. Wei, D., S. Levic, L. Nie, et al., Cells of adult brain germinal zone have properties akin to hair cells and can be used to replace inner ear sensory cells after damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: p. 21000-5.

42. Collado, M.S. and J.R. Holt, Can neurosphere production help restore inner ear transduction? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: p. 8-9.

43. Miller, J.M., A.L. Miller, T. Yamagata, G. Bredberg, and R.A. Altschuler, Protection and regrowth of the auditory nerve after deafness: neurotrophins, antioxidants and depolarization are effective in vivo. *Audiol Neurotol* 2002; 7: p. 175-9.

44. Leibovici, M., S. Safieddine, and C. Petit, Mouse models for human hereditary deafness. *Curr Top Dev Biol* 2008; 84: p. 385-429.

45. Taranda, J., S.F. Maison, J.A. Ballester, et al., A point mutation in the hair cell nicotinic cholinergic receptor prolongs cochlear inhibition and enhances noise protection. *PLoS Biol* 2009; 7: p. e18.

Los autores declaran no tener conflictos de interés con los laboratorios.