

## Frecuencia de mutaciones en el gen de la usherina (*USH2A*) en 26 individuos colombianos con síndrome de Usher, tipo II

Greizy López<sup>1</sup>, Nancy Yaneth Gelvez<sup>1</sup>, Martalucía Tamayo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Fundación Oftalmológica Nacional, Bogotá, D.C., Colombia

**Institución responsable:** Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El síndrome de Usher se caracteriza por hipoacusia neurosensorial congénita, retinitis pigmentaria y disfunción vestibular. Es la causa más frecuente de sordo-ceguera en el mundo. Se divide en tres tipos clínicos y doce subtipos genéticos. El tipo II es la forma más común y cerca de 80 % de los casos corresponden al subtipo 2 del síndrome de Usher.

**Objetivo.** Establecer la frecuencia de mutaciones en la isoforma corta del gen *USH2A* en individuos colombianos con síndrome de Usher, tipo II.

**Materiales y métodos.** Se estudiaron 26 individuos colombianos con diagnóstico clínico de síndrome de Usher, tipo II. Se hizo análisis de SSCP para los 20 exones que codifican para la isoforma corta y se secuenciaron los patrones anormales. Además, se secuenció el exón 13 en todos los individuos, ya que allí se encuentra la mutación más frecuente de este gen.

**Resultados.** La mutación más frecuente es la c.2299delG, correspondiente al 27 % de la población. La segunda mutación identificada es la p.R334W, con una frecuencia de 15 %. Se identificó un nuevo cambio, el g.129G>T, en la región 5'UTR del gen, correspondiente al 4 % de la población. Se identificaron cuatro cambios polimórficos, uno de ellos es una delección nueva identificada en el exón 20.

**Conclusiones.** Se logró establecer que, al menos, 38 % de la población analizada con síndrome de Usher, tipo II, presenta alguna mutación en la isoforma corta del gen de la usherina. El diagnóstico molecular se logró establecer en el 23 %.

**Palabras clave:** síndromes de Usher/genética, retinitis pigmentaria, pérdida auditiva neurosensorial; análisis de mutación de ADN, Colombia.

### Mutational frequencies in usherin (*USH2A* gene) in 26 Colombian individuals with Usher syndrome type II

**Introduction.** Usher syndrome is a disorder characterized by progressive retinitis pigmentosa, prelingual sensory hearing loss and vestibular dysfunction. It is the most frequent cause of deaf-blindness in humans. Three clinical types and twelve genetic subtypes have been characterized. Type II is the most common, and among these cases, nearly 80% have mutations in the *USH2A* gene.

**Objective.** The aim of the study was to establish the mutational frequencies for the short isoform of *USH2A* gene in Usher syndrome type II.

**Materials and methods.** Twenty-six Colombian individuals with Usher syndrome type II were included. SSCP analysis for 20 exons of the short isoform was performed and abnormal patterns were sequenced. Sequencing of exon 13 of the *USH2A* gene was performed for all the individuals because the most frequent mutation is located in this exon.

**Results.** The most frequent mutation was c.2299delG, identified in the 27% (n=8) of the sample. The second mutation, p.R334W, showed a frequency of 15%. A new variant identified in the 5'UTR region, g.129G>T, was present in 1 individual (4%). Four polymorphisms were identified; one of them is a new deletion in exon 20, first reported in this study.

**Conclusions.** Mutations in the usherin short isoform were identified in 38% of a sample of 26 *USH2A* cases. Molecular diagnosis was established in 7 of the 26.

**Key words:** Usher syndromes/genetics, retinitis pigmentosa; hearing loss, sensorineural; Genetics, DNA mutational analysis, Colombia.

El síndrome de Usher es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, que cursa con hipoacusia neurosensorial, retinitis pigmentaria progresiva y, en algunos casos, disfunción vestibular. Este síndrome es la causa más frecuente de sordera-ceguera en el mundo, y corresponde a 6 % de la población congénitamente sorda y a 18 % de toda la población con retinitis pigmentaria (1).

La prevalencia del síndrome de Usher se ha calculado en un rango de 3,5 a 6,2 casos por cada 100.000 habitantes (2); su frecuencia en Estados Unidos es de alrededor de 5 por 100.000 habitantes (1), en Escandinavia, de 3,0 por 100.000 (3) y en Colombia, de 3,2 por 100.000 habitantes, y corresponde a 9,6 % de la población sorda y a 10 % de la población ciega (4-6).

Clínicamente se divide en tres tipos: el tipo I se caracteriza por sordera severa (sic.) congénita, ausencia de respuesta vestibular y aparición de retinitis pigmentaria progresiva en la primera década de la vida o a principios de la segunda; el tipo II, por sordera congénita de moderada a grave, respuesta vestibular normal, con inicio de retinitis pigmentaria progresiva en la segunda década de la vida, y el tipo III, por pérdida auditiva progresiva, respuesta vestibular variable y aparición de retinitis pigmentaria en edad variable (7).

El síndrome de Usher presenta una significativa heterogeneidad genética: a cada uno de los tres tipos clínicos del síndrome le corresponden subtipos genéticos.

Hasta el momento, se han identificado 12 *loci* asociados: siete responsables del síndrome de Usher de fenotipo 1 (*USH1B-H*), tres del síndrome de Usher de fenotipo 2 (*USH2A*, 2C y 2D) y dos del síndrome de Usher de fenotipo 3 (*USH3A* y 3B). Los tres genes responsables del fenotipo 2 ya han sido mapeados. De éstos, el primer gen identificado fue el *USH2A*, el cual codifica para la proteína usherina (8). Esta proteína es necesaria para el correcto mantenimiento de las células fotorreceptoras de la retina y para el desarrollo de las células ciliadas de la cóclea (9).

#### Correspondencia:

Martalucía Tamayo, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 40-62, edificio 32, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: (571) 320 8320, extensión: 2788 o 2787; fax: (571) 320 8320, extensión: 2793  
mtamayo@javeriana.edu.co

Recibido: 23/06/10; aceptado:30/09/10

Entre los tipos clínicos identificados hasta el momento, el de tipo II es la forma más común de síndrome de Usher, ya que se presenta en casi la mitad de los casos reportados (10-12). Algunos estudios han demostrado que de 74 % a 83 % de los casos con fenotipo 2, corresponden al subtipo 2A (13-16). Inicialmente, se describió que el gen *USH2A* constaba de 21 exones (14), pero posteriormente se definió que existe una segunda isoforma que comprende 51 exones adicionales a los ya conocidos, para un total de 72 (17).

El objetivo de este trabajo fue identificar las mutaciones en el gen que codifica para la isoforma corta de la usherina (gen *USH2A*) en individuos colombianos con síndrome de Usher, tipo II, con el fin de establecer la frecuencia de las mutaciones propias de la población colombiana.

## Materiales y métodos

### *Población de estudio*

Se estudiaron 26 individuos colombianos con diagnóstico clínico de síndrome de Usher, tipo II, que fueron seleccionados en tamizaciones realizadas por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana y la Fundación Oftalmológica Nacional en institutos para ciegos y sordos de 11 ciudades del país.

A todos los individuos se les hizo examen de fondo de ojo, electroretinograma, campimetría, angiografía, fotos de fondo de ojo y audiometría. Se tomaron muestras de 10 ml de sangre periférica por punción venosa, previa firma del consentimiento informado.

De la población estudiada, cinco individuos pertenecían a familias "informativas" (familias, al menos, con dos individuos afectados y, al menos, un familiar sano en primer grado), en las cuales se había establecido previamente el fenotipo 2A por medio de análisis de haplotipos, y 21 individuos pertenecían a familias no "informativas" (familias con un número insuficiente de individuos sanos y afectados) de *USH2*.

### *Pruebas moleculares*

El ADN se extrajo por medio de la técnica de fenol-cloroformo. Los iniciadores que se utilizaron para la amplificación de los 21 exones del gen *USH2A*, se muestran en el cuadro 1.

### *Análisis de secuenciación*

Se hizo el análisis de secuenciación bidireccional del exón 13 del gen *USH2A* para los 26 individuos del estudio.

**Cuadro 1.** Iniciadores utilizados para la amplificación de los 21 exones de la isoforma corta del gen *USH2A*.

Exón	Iniciadores	Tamaño del fragmento (pb)
1	F: 5' AAAGCTTGGGCAGCTCAGTTCCAA 3' R: 5' ACACATGGATCCCTAATACTGTGC 3'	307
2	F: 5' AAAGGTGCAGCAGCTTTCCCTTGA 3' R: 5' TGGGGACCTATGAAAGCTTATACC 3'	775
3	F: 5' GGTTGGATGCTGACCTTTTCTCTC 3' R: 5' CTGCAGATTTTGTGAGTAGATGCC 3'	304
4	F: 5' CAGTCTCCAGCTGAACAAAGTA 3' R: 5' GCCCTAGAAGATGAATACACGTAG 3'	366
5	F: 5' GTTCGATCAGTAAATAGGCTGGCC 3' R: 5' GGAGTTCCTCAAGAGTAGCACTAG 3'	514
6	F: 5' AGCTCTTTGTCCTTACAGTCTCCC 3' R: 5' GGGCATTGTTGCAATAACCACAG 3'	391
7	F: 5' GGGCTATGAAGTTTCTGGATGTCT 3' R: 5' ACCAGCCTAGAGAGCTAGCATACT 3'	420
8	F: 5' GTGTGGCTTTCTATGATAATCCTG 3' R: 5' GCTTGAAATCTGGCTTGCTCTGAC 3'	493
9	F: 5' GAGTTGGTGTTCCTTAGGAGTGTG 3' R: 5' GAACCTAGGGTTTGGTTTCAG 3'	376
10	F: 5' GTGCTTACTTCTGGTAAAGGCC 3' R: 5' TAGATAGAAGCACACAGGCCTCCA 3'	344
11	F: 5' GCTCTGGATCACTAAATTGGCAGG 3' R: 5' GAGGATTTCTGGCAAATGCAGTC 3'	400
12	F: 5' CTCCTCCCTGTCTTGACCTAAT 3' R: 5' CCAGCCTGTCTTGAGCAAAGAAAT 3'	394
13	F: 5' CGTATCATCTGCAGTAGCATTG 3' R: 5' AAGCCACAAACCAGAAACAGGG 3'	822
14	F: 5' GAGGCACCCAAAGTCCAATGTAGAT 3' R: 5' AGCCACCAAGCCGGGCAAAAAA 3'	504
15	F: 5' CAAGCCGTCTTACTCTACAATGCT 3' R: 5' TCCCCTGTATGATGCTGCTTCACA 3'	318
16	F: 5' GAATCAGAAAGACCTCTTTGCTGG 3' R: 5' ACACCTGTGCGCAGACAGGAAA 3'	370
17	F: 5' GCAATGATTCTTACCAACTTGTG 3' R: 5' TGACCAAAAAGGGGAATCTCAGCC 3'	593
18	F: 5' TCCCTACCCTACCCCTAAAGTAAC 3' R: 5' CCCCTAGAACTTGCTGCAAGTACT 3'	539
19	F: 5' GGGACGACATTCATTGTTTTGATG 3' R: 5' GCCCTAAGCCAATTCTGAAAGGAC 3'	264
20	F: 5' CCCTCTGTCTGAATTCATGGAAGT 3' R: 5' AGCAATCAGAGTTAGTGAGGGAGG 3'	371
21	F: 5' CAGTTCCTAGAGCCATACAGATAC 3' R: 5' AACATTTTGGAGCTTCGTGTCTCC 3'	433

El procedimiento utilizado para la secuenciación fue el siguiente: una vez obtenido el producto de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), se purificó y se realizó la reacción de secuenciación con 2 µl de mezcla de reacción, 2 µl de solución tampón 5X, 1 µl de iniciador y 5 µl de producto purificado.

Las condiciones de temperatura fueron: 95 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos y 60 °C por 4 minutos, durante 35 ciclos. Se realizó la precipitación de la reacción de secuenciación por el método de etanol. Las análisis de secuenciación se realizaron en el *ABI-PRISM 3100-Avant™* con el estuche de secuenciación *BigDye terminator™*, versión 3.1. Finalmente, se analizaron las secuencias con el *software DNASTar™*.

### **Análisis de Single Strand Conformation Polymorphism**

Se hizo análisis de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) para los 21 exones que codifican para la isoforma corta del gen *USH2A*. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador *icycler BIO-RAD™*. Se utilizó el siguiente protocolo estándar: un ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, la temperatura de anillamiento correspondiente en cada caso por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, seguidos por un ciclo de elongación final a 72 °C por 7 minutos. Una vez obtenidos los productos, se hizo análisis de SSCP para cada uno de los exones, en las cámaras *DeCode* y *MiniProtean II* de *BIO-RAD*, según las condiciones de estandarización en cada caso.

Las condiciones generales para la preparación de la muestra fueron: a una alícuota de 8 µl del producto, se agregaron 8 µl de solución tampón de formamida. La mezcla fue desnaturalizada a 95 °C por 5 minutos, colocada en hielo y sembrada en un gel de poliacrilamida no desnaturalizador, con glicerol al 10 % y con diferentes concentraciones de poliacrilamida, que variaban entre 6 % y 12 %, según las condiciones de cada exón. Las bandas se visualizaron con tinción de nitrato de plata. Los patrones anormales fueron secuenciados según el protocolo mencionado anteriormente.

### **Base de datos**

La secuencia consenso utilizada para el gen *USH2A* se obtuvo de:

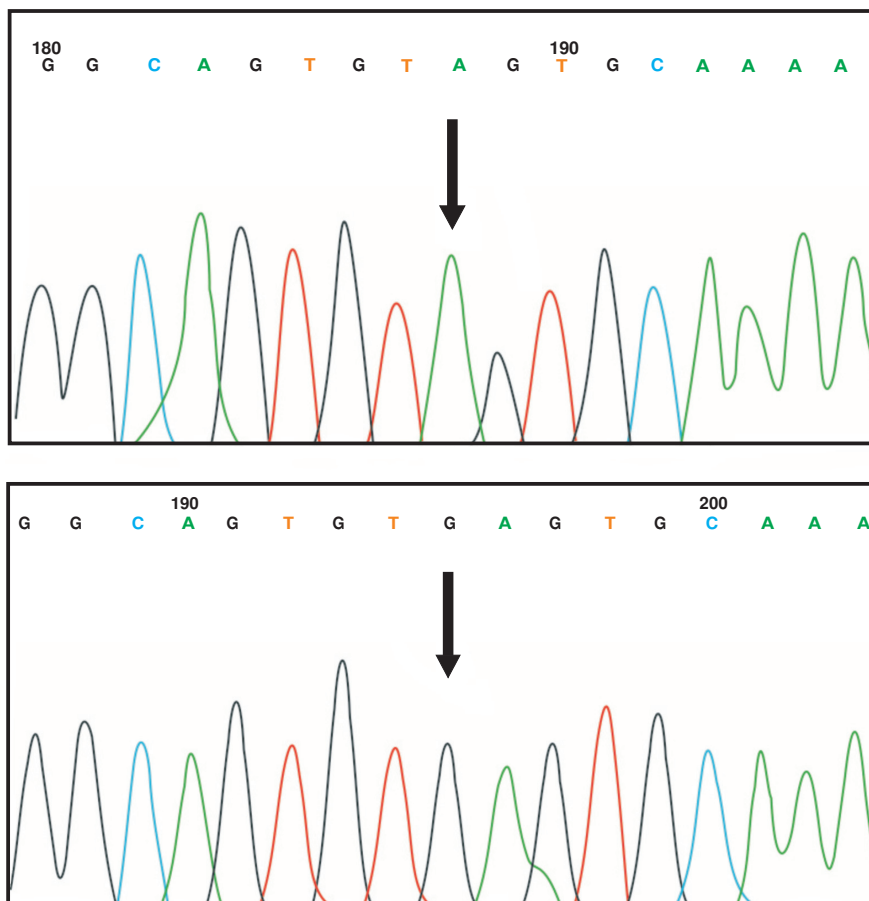
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000042781;r=1:215796236-216596738;t=ENST00000366942](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000042781;r=1:215796236-216596738;t=ENST00000366942).

### **Resultados**

Los resultados del análisis de mutaciones se presentan en el cuadro 2. Se identificó la mutación c.2299 delG (figura 1) en siete de los individuos analizados (27 %). En uno de ellos, en estado homocigoto, y en los seis restantes, en estado heterocigoto.

**Cuadro 2.** Frecuencias de los cambios identificados en el gen *USH2A*.

Exón	Cambio	Frecuencia alélica en propósitos (%)	Reporte en otras poblaciones
<b>Mutaciones identificadas</b>			
1	g.129G>T	3,8 (2/52)	No reportado
6	c.1000C>T, p.R334W	11,5 (6/52)	0-3 (18)
13	c.2299delG, p.E767FS	15,4 (8/52)	22-24 (8)
<b>Polimorfismos o cambios no patogénicos</b>			
3	c.504A>G, p.T168T	32,7 (17/52)	rs4253963 (19)
11	c.1931A>T, p.D644V	7,7 (4/52)	rs1805048 (19)
20	c.4252-24_-13delCTTT	1,9 (1/52)	No reportado
21	c.4457G>A, p.R1486K	75 (39/52)	rs1805049 (19)



**Figura 1.** Electroferograma de la secuencia del exón 13 del gen *USH2A*. Arriba: la mutación c.2299delG en estado homocigoto. Abajo: secuencia sin la mutación.

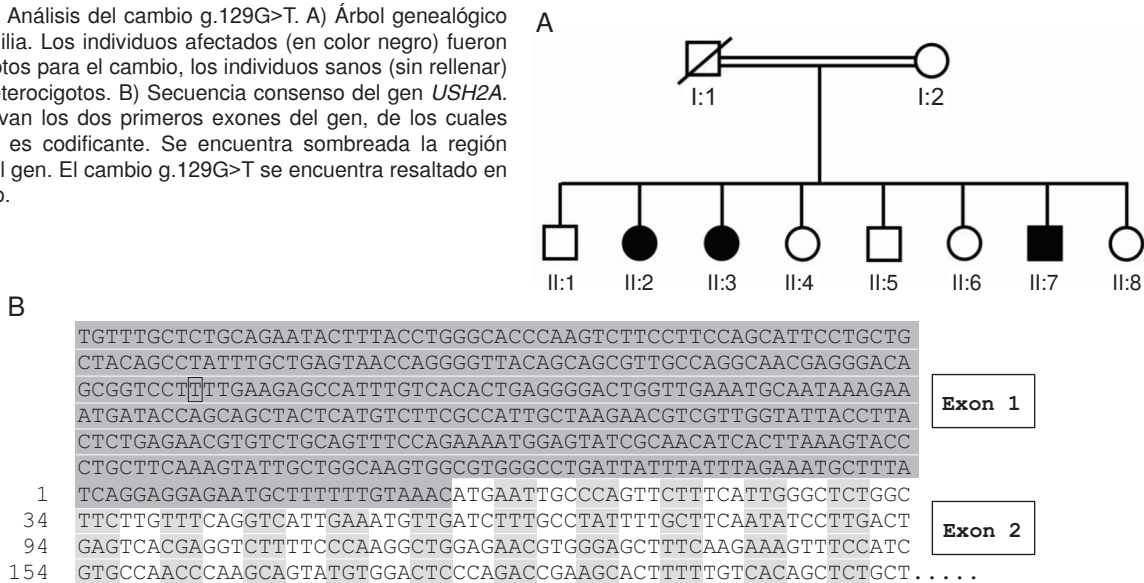
El análisis de SSCP reveló patrones anormales en los exones 1, 3, 6, 11, 20 y 21 del gen *USH2A*. Por medio del análisis de secuenciación de los patrones anormales, se identificaron varios cambios.

En el exón 6 se identificó una mutación previamente reportada (17). Se trata de una transición C→T en el nucleótido 1.000, que conduce al cambio de arginina por triptófano en el aminoácido

334, p.R334W. La mutación —que se identificó en 15 % de la población— se encontró en dos individuos en estado homocigoto y en otros dos, en estado heterocigoto compuesto con la mutación c.2299delG.

En el exón 1 se identificó un cambio aún no reportado (figura 2) en una familia con fenotipo 2A. Se trata de una transversión G>T en la posición 129 en la

**Figura 2.** Análisis del cambio g.129G>T. A) Árbol genealógico de la familia. Los individuos afectados (en color negro) fueron homocigotos para el cambio, los individuos sanos (sin rellenar) fueron heterocigotos. B) Secuencia consenso del gen *USH2A*. Se observan los dos primeros exones del gen, de los cuales sólo el 2 es codificante. Se encuentra sombreada la región 5'UTR del gen. El cambio g.129G>T se encuentra resaltado en un cuadro.



región 5'UTR del gen, a 259 pb corriente arriba del codón de inicio ATG. El cambio se encontró en estado homocigoto en los tres individuos afectados y, en estado heterocigoto, en todos los demás miembros de la familia. El cambio no fue identificado en 100 controles sanos colombianos.

Se identificaron cuatro cambios polimórficos. El primero de ellos, c.504A>G, p.Thr168Thr en el exón 3, se observó en 13 individuos en estado heterocigoto y en dos en estado homocigoto. Un segundo polimorfismo en el exón 11, c.1931A>T, p.D644V, estuvo presente en cuatro individuos en estado heterocigoto. En el exón 21 se identificó el cambio c.4457G>A, p.R1486K, en estado heterocigoto, en 9 individuos del estudio, y en estado homocigoto, en 15 individuos. El análisis de SSCP del exón 20 del gen *USH2A* reveló un cambio adicional en un individuo con fenotipo 2. Se trata de una delección de tres repeticiones en tándem CTTT en la región intrónica flanqueante del extremo 5' (figura 3), que se encuentra en estado heterocigoto en el individuo afectado. Este cambio no se identificó en 100 controles sanos colombianos. Las frecuencias alélicas de estos cambios se pueden observar en el cuadro 2.

En la figura 4 se observa la ubicación de los cambios encontrados en el presente estudio en el gen *USH2A*.

### Discusión

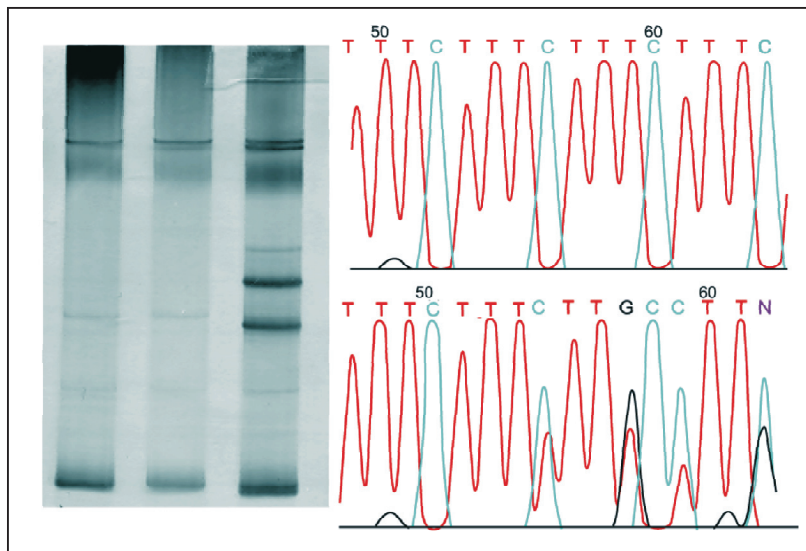
A partir de una tamización nacional realizada en once ciudades principales del país, para la

detección de individuos con síndrome de Usher, se logró identificar a 73 individuos no relacionados, de los cuales, 61,6 % (45/73) pertenecían al tipo I, 37 % (27/73), al tipo II, y 1,4 % (1/73), al tipo III de la enfermedad. Los estudios en Europa han encontrado una proporción de 25 % a 44 % de pacientes con síndrome de Usher de fenotipo 1, 56 % a 75 % de pacientes con fenotipo 2 y cerca de 2 % de pacientes con fenotipo 3 (10,12,20).

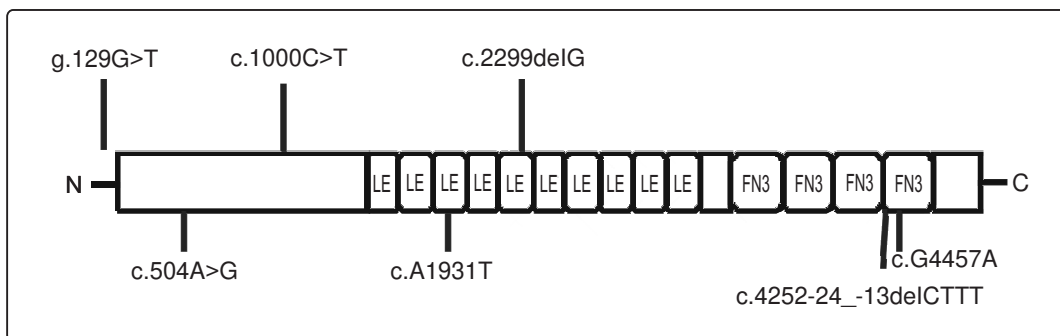
En el caso del presente estudio, la proporción de individuos con síndrome de Usher de fenotipo 2 fue inferior, lo que podría explicarse porque la tamización se llevó a cabo principalmente en escuelas para sordos y los individuos con el síndrome de tipo 2 usualmente asisten a escuelas regulares; en contraste, en los países europeos la selección de pacientes se hace en clínicas oftalmológicas (10,12,20), lo que facilita la detección de individuos con retinitis pigmentaria que presenten, además, una hipoacusia leve o moderada de la que no se hayan percatado.

La alta y creciente proporción de individuos con diagnóstico de síndrome de Usher, tipo II, tanto en Colombia como en el resto del mundo, hace evidente la necesidad de un diagnóstico molecular en estos casos, lo que ha incrementado el interés hacia la práctica de pruebas confiables para detectar las mutaciones propias de la población colombiana y ofrecer un diagnóstico acertado.

Se ha identificado un gran número de mutaciones en el gen *USH2A*, pero la más prevalente es la c.2299delG, identificada en el exón 13 (14,21-



**Figura 3.** Cambio encontrado en el exón 20. A la izquierda el análisis de SSCP con el patrón anormal en el tercer carril. A la derecha, el electroferograma de la secuencia de tipo silvestre, en la parte superior, y de la delección en estado heterocigoto, en la parte inferior.



**Figura 4.** Representación esquemática del gen *USH2A*. Se observa la localización de los cambios encontrados en este estudio. En la parte superior se encuentran las mutaciones y en la parte inferior los polimorfismos.

23). Esta mutación se ha detectado en 25 % de la población española con síndrome de Usher, tipo 2 (24). En el presente estudio, se detectó en 27 % (7 /26) de la población analizada, un porcentaje muy similar al reportado en población española.

De los siete individuos en quienes se identificó esta delección, sólo uno la presentaba en estado homocigoto, dos la presentaban en estado heterocigoto compuesto con la mutación p.R334W y en cuatro casos se identificó en estado heterocigoto, quedando pendiente por definir la mutación en el otro alelo. El fenotipo fue muy similar y homogéneo de síndrome de Usher típico en todos los individuos con la mutación c.2299delG, a excepción de uno de ellos, quien presentaba un hallazgo poco usual en casos con el de tipo 2: una hipoacusia profunda bilateral. Aunque esta profundidad es clásica del

síndrome de Usher, tipo 1, este individuo se clasificó como de tipo II debido a que no presentaba alteración vestibular y la retinitis pigmentaria había aparecido a finales de la segunda década de la vida.

En este caso, es posible que la otra mutación que aún no ha sido identificada en el otro alelo, haya producido un fenotipo auditivo más grave que en los demás afectados. También, cabría hipotetizar que pudo haber existido otro hecho externo, no genético, que hubiera profundizado su sordera (por ejemplo, otitis a repetición), pero, es difícil de comprobar dada la poca información disponible en la historia clínica.

La mutación p.R334W, identificada en el exón 6, ya había sido reportada previamente (17). En la publicación de la referencia se identificó en estado

homocigoto en seis miembros afectados de una familia de Marruecos, en quienes se observó variabilidad fenotípica (hipoacusia progresiva y edad variable de aparición de la retinitis pigmentaria). En la población colombiana, la mutación p.R334W se identificó en estado homocigoto en dos individuos quienes presentaron, uno, hipoacusia moderada y, el otro, de moderada a severa (sic.), pero en ninguno de los dos progresiva. En ambos, la retinitis pigmentaria se inició en la segunda década de la vida y, en general, con hallazgos muy similares y clásicos de retinitis pigmentaria del síndrome de Usher, tipo II. Esto podría sugerir que la misma mutación esté causando fenotipos diferentes, aunque también puede estar siendo influenciada por el componente genético de cada individuo.

Si se observa la frecuencia de los alelos en la población estudiada, la mutación p.R334W (6/52 alelos) es casi tan frecuente (~11 %) como la c.2299delG (8/52 alelos) (~15 %), aunque en otras poblaciones su frecuencia no es tan significativa: dos alelos en una cohorte de Estados Unidos y Gran Bretaña (11), ningún alelo en una cohorte de 36 individuos en el Reino Unido (23) y un alelo en una cohorte de 31 individuos noruegos y daneses (22). En vista de la similitud que existe en las frecuencias de estas dos mutaciones en la población colombiana, la mutación p.R334W es la segunda mutación más frecuente para el fenotipo 2 en esta población.

Con respecto al cambio g.129G>T, identificado en la región promotora del gen, aún no se ha descrito en la literatura. Es bien conocido que el promotor de cualquier gen juega un papel muy importante en la regulación de su expresión. Se ha demostrado que las mutaciones en la región reguladora interrumpen el proceso normal de activación génica e iniciación de la transcripción, y pueden actuar ya sea incrementando o disminuyendo el nivel de ARNm. Las mutaciones descritas en regiones reguladoras se encuentran en las secuencias flanqueantes 5' que contienen elementos promotores constitutivos, *enhancers*, represores, determinantes de expresión génica específica para tejido y otros elementos reguladores (25). La detección de mutaciones en elementos reguladores potenciales desconocidos, puede predecir la existencia de tales elementos; de ahí la importancia del cambio detectado en este estudio.

Según la base de datos Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)), el sitio específico donde se encuentra el cambio no parece ser relevante, por lo que éste no afectaría la expresión de la proteína. Sin embargo,

este cambio se encuentra en la región flanqueante 5' del gen, se está segregando con la enfermedad en esta familia y no fue detectado en 100 controles sanos colombianos.

Todas estas razones apoyan la hipótesis de que se trata de una mutación y no de un polimorfismo. Hasta el momento, no se han reportado mutaciones de este tipo en el gen *USH2A*, por lo que el cambio identificado en este estudio podría ser la primera mutación reportada y representa una frecuencia de 4 % en la población analizada. Algunos estudios que hacen identificación de las mutaciones del gen, excluyen la región promotora y sólo analizan la región codificante (10,17,26), por lo que es posible que los cambios en esta región no estén siendo detectados en otras poblaciones.

Se necesitan posteriores estudios de expresión para establecer la naturaleza del cambio. Aunque todas estas razones apoyan la idea de que el cambio g.129G>T pueda ser una mutación, también se puede atribuir la segregación coexistente entre este cambio y la enfermedad a un posible desequilibrio de ligamiento con otra mutación no detectada y que podría existir en la porción no estudiada del gen *USH2A*, lo cual tendría que descartarse analizando la isoforma larga.

Se identificaron cuatro cambios polimórficos, tres de ellos previamente reportados. El primero, c.504A>G, p.Thr168Thr en el exón 3, que corresponde al polimorfismo de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) rs4253963 (12); el segundo, el polimorfismo identificado en el exón 11, c.1931A>T, p.D644V, que corresponde al SNP rs1805048 (12); y un tercer polimorfismo adicional en el exón 21, c.4457G>A, p.R1486K, que corresponde al SNP rs1805049 (12).

El cambio identificado en el exón 20 no ha sido reportado previamente. Aunque este cambio no se identificó en 100 controles sanos, tampoco afecta un sitio de *splicing* o ramificación en el intrón, lo que lo definiría como un cambio que no es patógeno. La secuencia involucrada contiene seis repeticiones CTTT en tándem, de las cuales, se pierden tres con la delección. Por sus características parece que se trataría de un STR, pero no ha sido reportado ni se encuentra en población normal. Este cambio no parece causar efecto alguno en la proteína, aunque se necesitan posteriores estudios para esclarecer su naturaleza.

En total, se logró establecer que 38 % de la población presenta alguna mutación en la isoforma

corta del gen de la usherina. En un estudio de población francesa, que se llevó a cabo con una metodología muy similar, se reportó la presencia de mutaciones en 39 % de la población con síndrome de Usher, tipo 2 (25), una frecuencia muy cercana a la reportada en este estudio, pero con una mayor heterogeneidad de mutaciones identificadas. Estudios similares, pero realizados mediante secuenciación, han revelado la presencia de alguna mutación patológica en 87 % de la población en países del norte de Europa (22) y en 57 % de la de Estados Unidos (27), frecuencias más altas que la reportada en este estudio (38 %) debido tal vez a la técnica utilizada, ya que el análisis de secuenciación resulta ser más acertado aunque más costoso que el análisis de SSCP (28). Además, uno de los estudios reporta una frecuencia alélica de 39 % de la mutación 2299delG (22), una frecuencia mayor que la reportada en éste y en otros estudios en población europea. Se ha reportado que la distribución de esta mutación varía geográficamente en Europa, disminuyendo de norte a sur (29), de ahí que se identifique en mayor frecuencia en países del norte, como Escandinavia, que en países del sur, como Francia y España. En población japonesa su frecuencia es baja (30).

Un análisis posterior de la isoforma larga del gen permitirá conocer nuevas mutaciones en estos individuos y genotipificar a una mayor proporción de la población, ya que se ha reportado que esta isoforma puede albergar incluso más mutaciones que la isoforma corta (26,27,30,31). Se ha propuesto la técnica de *microarrays* como un método de genotipificación rápido y efectivo (32), pero, para poder llevarlo a cabo, es necesario tener una mejor idea de las mutaciones propias de población colombiana.

En conclusión, este estudio demuestra que 27 % de la población analizada con síndrome de Usher, tipo 2, (26 individuos) porta la mutación c.2299delG, y esta frecuencia es muy similar a la reportada en España, que es de 25 % (24).

La mutación p.R334W es la segunda mutación más frecuente en la población analizada (15 %), a diferencia de las frecuencias reportadas en otras poblaciones. El cambio g.129G>T, identificado en la región promotora del gen, no ha sido previamente reportado y fue clasificado como mutación por sus características, pero representa una baja frecuencia en la población analizada (4 %). Se identificaron tres polimorfismos previamente reportados y uno

adicional que no ha sido reportado, pero fue clasificado como tal por sus características.

Los resultados de este estudio revelan interesantes hallazgos y evidencian algunas diferencias con respecto a frecuencias de mutaciones reportadas en otras poblaciones. Estos resultados demuestran la importancia de establecer un panel de mutaciones propio de la población colombiana, para hacer un diagnóstico más acertado. Además, se resalta la importancia de adelantar estudios de expresión para definir la naturaleza del cambio g.129G>T.

### Agradecimientos

Agradecemos al Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá y a Vicente Rodríguez Montoya, por las valoraciones audiológicas. A la Fundación Oftalmológica Nacional, a David Medina y a Silvia Flórez, por las evaluaciones oftalmológicas, y a Martha Moncayo por los electroretinogramas. A William Kimberling y Richard Smith, de la Universidad de Iowa, Estados Unidos. Especial agradecimiento a los pacientes y a sus familias por participar en nuestro programa nacional de investigación del síndrome de Usher.

### Conflicto de intereses

No se tiene ningún conflicto de intereses con autoridades públicas o privadas para su publicación.

### Financiación

Este trabajo hace parte del proyecto “Estudios clínicos y moleculares en familias colombianas con síndrome de Usher, fase IV”, financiado por Colciencias (código 1203-04-11732) y el Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá (código 1045).

### Referencias

1. **Boughman JA, Vernon M, Shaver KA.** Usher syndrome: Definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis.* 1983;36:595-603.
2. **Keats BJ, Corey DP.** The usher syndromes. *Am J Med Genet.* 1999;89:158-66.
3. **Hallgren B.** Retinitis pigmentosa combined with congenital deafness; with vestibulo-cerebellar ataxia and mental abnormality in a proportion of cases: A clinical and genetical study. *Acta Psychiatr Scand* 1959;34(Suppl.):1-101.
4. **Tamayo M, Bernal JE, Tamayo GE, Frias JL.** Study of the etiology of deafness in an institutionalized population in Colombia. *Am J Med Genet.* 1992;44:405-8.
5. **Tamayo ML, Bernal JE, Tamayo GE, Frias JL, Alvira G, Vergara O, et al.** Usher syndrome: Results of a screening program in Colombia. *Clin Genet.* 1991;40:304-11.



6. **Tamayo ML, Maldonado C, Plaza SL, Alvira GM, Tamayo GE, Zambrano M, et al.** Neuroradiology and clinical aspects of Usher syndrome. *Clin Genet.* 1996;50:126-32.
7. **Pakarinen L, Tuppurainen K, Laippala P, Mantyjarvi M, Puhakka H.** The ophthalmological course of Usher syndrome type III. *Int Ophthalmol.* 1995;19:307-11.
8. **Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, MaEdmonds M, et al.** Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science.* 1998;280:1753-7.
9. **Liu X, Bulgakov OV, Darrow KN, Pawlyk B, Adamian M, Liberman MC, et al.** Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:4413-8.
10. **Hope CI, Bunday S, Proops D, Fielder AR.** Usher syndrome in the city of Birmingham--prevalence and clinical classification. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:46-53.
11. **Ouyang XM, Hejtmancik JF, Jacobson SG, Li AR, Du LL, Angeli S, et al.** Mutational spectrum in Usher syndrome type II. *Clin Genet.* 2004;65:288-93.
12. **Rosenberg T, Haim M, Hauch AM, Parving A.** The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clin Genet.* 1997; 51: 314-21.
13. **Pieke-Dahl S, Ohlemiller KK, McGee J, Walsh EJ, Kimberling WJ.** Hearing loss in the RBF/DnJ mouse, a proposed animal model of Usher syndrome type IIa. *Hear Res.* 1997;112:1-12.
14. **Weston MD, Eudy JD, Fujita S, Yao S, Usami S, Cremers C, et al.** Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1199-210.
15. **Aller E, Jaijo T, Beneyto M, Najera C, Oltra S, Ayuso C, et al.** Identification of 14 novel mutations in the long isoform of USH2A in Spanish patients with Usher syndrome type II. *J Med Genet.* 2006;43:e55.
16. **Baux D, Larrieu L, Blanchet C, Hamel C, Ben Salah S, Vielle A, et al.** Molecular and *in silico* analyses of the full-length isoform of usherin identify new pathogenic alleles in Usher type II patients. *Hum Mutat.* 2007;28:781-9.
17. **van Wijk E, Pennings RJ, te Brinke H, Claassen A, Yntema HG, Hoefsloot LH, et al.** Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet.* 2004;74:738-44.
18. **Adato A, Weston MD, Berry A, Kimberling WJ, Bonne-Tamir A.** Three novel mutations and twelve polymorphisms identified in the USH2A gene in Israeli USH2 families. *Hum Mutat.* 2000;15:388.
19. **Nelson MR, Marnellos G, Kammerer S, Hoyal CR, Shi MM, Cantor CR, et al.** Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions. *Genome Res.* 2004;14:1664-8.
20. **Spandau UH, Rohrschneider K.** Prevalence and geographical distribution of Usher syndrome in Germany. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002;240:495-8.
21. **Bernal S, Ayuso C, Antinolo G, Gimenez A, Borrego S, Trujillo MJ, et al.** Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *J Med Genet.* 2003;40:e8.
22. **Dreyer B, Tranebjaerg L, Rosenberg T, Weston MD, Kimberling WJ, Nilssen O.** Identification of novel USH2A mutations: Implications for the structure of USH2A protein. *Eur J Hum Genet.* 2000;8:500-6.
23. **Leroy BP, Aragón-Martín JA, Weston MD, Bessant DA, Willis C, Webster AR, et al.** Spectrum of mutations in USH2A in British patients with Usher syndrome type II. *Exp Eye Res.* 2001;72:503-9.
24. **Beneyto MM, Cuevas JM, Millan JM, Espinos C, Mateu E, González-Cabo P, et al.** Prevalence of 2314delG mutation in Spanish patients with Usher syndrome type II (USH2). *Ophthalmic Genet.* 2000;21:123-8.
25. **Maubaret C, Griffoin JM, Arnaud B, Hamel C.** Novel mutations in MYO7A and USH2A in Usher syndrome. *Ophthalmic Genet.* 2005;26:25-9.
26. **Dai H, Zhang X, Zhao X, Deng T, Dong B, Wang J, et al.** Identification of five novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in Chinese families with Usher syndrome type II. *Mol Vis.* 2008;14:2067-75.
27. **McGee TL, Seyedahmadi BJ, Sweeney MO, Dryja TP, Berson EL.** Novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa. *J Med Genet.* 2010;47:499-506.
28. **Rohlin A, Wernersson J, Engwall Y, Wiklund L, Bjork J, Nordling M.** Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: Comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum Mutat.* 2009;30:1012-20.
29. **Aller E, Larrieu L, Jaijo T, Baux D, Espinos C, González-Candelas F, et al.** The USH2A c.2299delG mutation: Dating its common origin in a Southern European population. *Eur J Hum Genet.* 2010;18:788-93.
30. **Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, et al.** Identification of 11 novel mutations in USH2A among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin Genet.* 2009;76:383-91.
31. **Dreyer B, Brox V, Tranebjaerg L, Rosenberg T, Sadeghi AM, Moller C, et al.** Spectrum of USH2A mutations in Scandinavian patients with Usher syndrome type II. *Hum Mutat.* 2008;29:451.
32. **Jaijo T, Aller E, García-García G, Aparisi MJ, Bernal S, Ávila-Fernández A, et al.** Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:1311-7.