

PREMIO DE INVESTIGACIÓN EN DEFICIENCIAS AUDITIVAS FIAPAS 2011

Área de Sanidad

Separata

**Estudio genético
molecular de pacientes
españoles con síndrome
de Usher**



Por el Dr. José María Millán, en representación del
Grupo de Investigación de Enfermedades Neurosensoriales
del Instituto de Investigación Sanitaria
del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

ANTECEDENTES, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El síndrome de Usher (USH) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por sordera neurosensorial, retinosis pigmentaria (RP) y, en ocasiones, alteración del equilibrio. Es la principal causa de sordo-ceguera con una prevalencia en España de 4,2/100.000 (Espinós et ál., 1998). Desde el punto de vista clínico se pueden distinguir tres tipos diferentes en función de la gravedad y progresión de la sordera, la presencia de alteraciones vestibulares y la edad de aparición de la RP (Tabla 1). Desde el punto de vista genético, se conocen 12 loci y se han identificado 9 genes distintos implicados en la enfermedad (Jaijo et ál., 2005 y Nájera et ál., 2009) (Tabla 2).

Manifestación clínica	USH1	USH2	USH3
Inicio RP	Prepuberal	Peri-Postpuberal	Postlingual
Pérdida auditiva	Congénita Severa-profunda Estable	Congénita Moderada-severa Estable	Variable Progresiva
Lenguaje	Ininteligible	Inteligible	Inteligible
Función vestibular	Alterada	Normal	Variable

Tabla 1. Aspectos clínicos característicos de los distintos tipos de síndrome de Usher.

Tipo clínico	Locus	Cromosoma	Gen/Proteína
USH1	<i>USH1B/DFNB2/DFNA11</i>	11q13.5	<i>MYO7A</i> /miosina VIIA
	<i>USH1C/DFNB18</i>	11p15.1	<i>USH1C</i> /harmonina
	<i>USH1D/DFNB12</i>	10q22.1	<i>CDH23</i> /cadherina 23
	<i>USH1E</i>	21q21	¿?
	<i>USH1F/DFNB23</i>	10q21.1	<i>PCDH15</i> /protocadherina 15
	<i>USH1G</i>	17q25.1	<i>USH1G</i> /SANS
	<i>USH1H</i>	15q22-23	¿?
USH2	<i>USH2A/RP</i>	1q41	<i>USH2A</i> /usherina
	<i>USH2B</i>	3p23-p24	¿?
	<i>USH2C</i>	5q14.3	<i>VLGR1/VLGR1</i>
	<i>USH2D/DFNB31</i>	9q32-q34	<i>WHRN</i> /whirlina
USH3	<i>USH3A</i>	3q25.1	<i>USH3A</i> /clarina-1
	<i>USH3B</i>	20q	¿?

Tabla 2. Subtipos genéticos del síndrome de Usher.

Los productos de los genes responsables del síndrome de Usher pertenecen a clases y familias proteicas diferentes. Los estudios sobre la función desempeñada por estas proteínas han revelado que éstas intervienen en una misma red de interacción proteica, el interactoma-Usher. Este interactoma interviene en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras implicadas en la mecanotransducción y la fototransducción en las células ciliadas del oído interno y los fotorreceptores de la retina respectivamente (Kremer et ál., 2006). La Figura 1A muestra esquemáticamente las interacciones que se producen entre las proteínas integrantes del interactoma.

Figura 1A

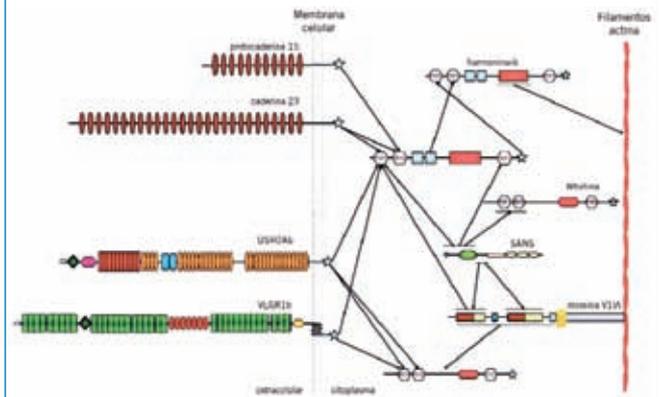
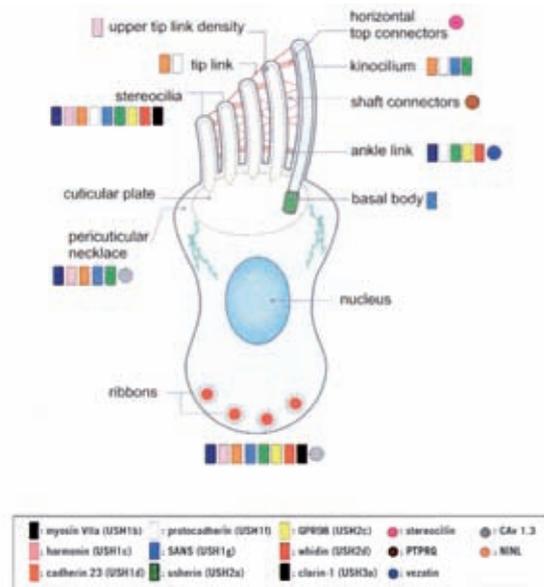
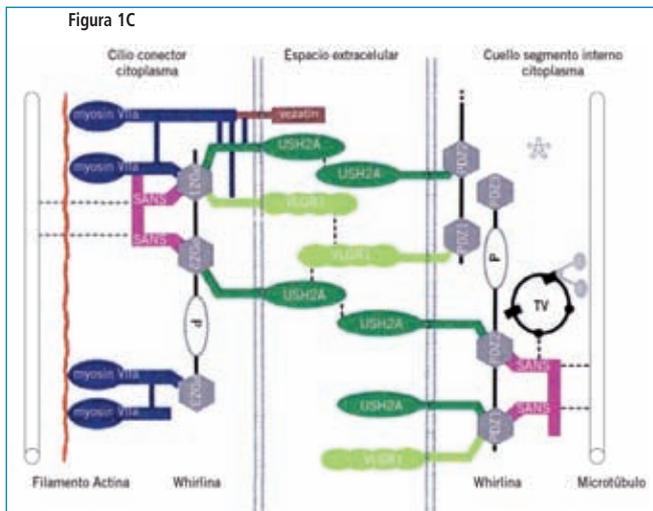


Figura 1B



La **Figura 1B** refleja estas interacciones en las células ciliadas de la cóclea mientras que la **Figura 1C** muestra las mismas interacciones en los fotorreceptores de la retina.

Figura 1C



La asociación de sordera neurosensorial y retinosis pigmentaria convierte al síndrome de Usher en un grave problema socio-sanitario debido al aislamiento social de los afectados. Actualmente, la enfermedad no tiene tratamiento. Los implantes cocleares han supuesto un remedio a la sordera en algunos casos pero la retinosis pigmentaria y los trastornos del equilibrio siguen sin solución.

El síndrome de Usher (USH) es la principal causa de sordoceguera en España

La detección rápida y eficaz de las mutaciones responsables es importante ya que permite confirmar el diagnóstico clínico, confirma la naturaleza hereditaria de los síntomas y permite un asesoramiento genético adecuado. Además, existen numerosos estudios encaminados a obtener una terapia génica para el síndrome de Usher. Los modelos murinos, un prerrequisito para el desarrollo de este tipo de terapias, existen para todos los genes USH1 y USH2 identificados. El síndrome de Usher es una enfermedad gené-

ticamente muy heterogénea con numerosos genes implicados. A esta dificultad se unen la complejidad de estos genes y que la mayoría de éstos se expresan específicamente en oído interno y retina u otros tejidos difícilmente accesibles. Todo esto lleva a la conclusión de que el diagnóstico molecular del síndrome de Usher es, en la actualidad, costoso, largo y no asumible por los sistemas públicos de salud.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de partida es que la determinación del defecto genético subyacente a la enfermedad en cada paciente, el gen implicado, las mutaciones concretas, su frecuencia y la correlación de cada una de estas mutaciones con el fenotipo del paciente, permitirá la creación de una base de datos de la enfermedad en población española que se convierta en la plataforma para alcanzar los siguientes objetivos:

1. Desarrollo y evaluación de herramientas diagnósticas fiables, rápidas y con un cociente coste/eficacia bajo para el diagnóstico genético de la enfermedad.
2. Establecer una correlación genotipo-fenotipo que permita un pronóstico de la enfermedad en función de las mutaciones/gen alterado.
3. Creación de grupos homogéneos de pacientes para futuros ensayos clínicos basados en terapia génica y/o celular.
4. Identificar nuevos genes integrantes del interactoma-Usher y, por lo tanto, candidatos a ser causantes del síndrome.

LUGAR DE REALIZACIÓN

El análisis mutacional de los distintos genes Usher se ha realizado en la Unidad de Genética del Hospital Universitario La Fe de Valencia. La anamnesis y valoración clínica de los pacientes, su reclutamiento así como el de los familiares, la extracción y el envío del ADN y los datos clínicos mencionados se ha realizado fundamentalmente en los centros integrantes de la antigua

RETIC ESRETNET (Unidad de Genética del Hospital Universitario La Fe de Valencia, Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz, Servei de Genètica del Hospital Sant Pau i la Santa Creu de Barcelona, Servicio de Genética del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, Servicio de Análisis Clínicos del Hospital de Terrassa y Departamento de Genética de la Universidad de Vigo) y TAU (Servicio de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid). La incorporación de las nuevas mutaciones encontradas en pacientes Usher españoles a la actual versión del microchip de ADN-Usher se realizó en colaboración con el Departamento de Genética de la Universidad de Nijmegen (Holanda) y la empresa de biotecnología Asper Biotech de Tartu (Estonia).

La distribución de los distintos tipos clínicos en España es muy similar a la encontrada previamente en poblaciones diferentes

MATERIAL Y MÉTODOS

● Sujetos de estudio

Los pacientes objeto de estudio se reclutaron desde la Federación de Asociaciones de Retinosis Pigmentaria de España (FARPE) y también desde los Servicios de Oftalmología y Otorrinolaringología (ORL) de numerosos hospitales del Estado español. Siempre que existió la posibilidad, se reclutó también el mayor número posible de familiares sanos y afectados de estos pacientes. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes en el estudio junto con la realización de la anamnesis familiar.

El diagnóstico clínico de los pacientes se llevó a cabo en base a los exámenes oftalmológicos, otorrinolaringológicos y neurofisiológicos:

- Los exámenes oftalmológicos comprendieron estudios de agudeza visual, campimetría, fundoscopia y oftalmoscopia.

- Los estudios de ORL para los test audiológicos incluyeron audiometría tonal, audiometría del habla y exploración oftalmoscópica. La evaluación vestibular consistió en la electronistagmografía, nistagmus posicional, test calórico y test de silla rotatoria.

- Las pruebas neurofisiológicas consistieron en el electroretinograma (ERG) y los potenciales evocados auditivos y visuales.

En base a todos los datos obtenidos para cada paciente, éstos se clasificaron en pacientes con síndrome de Usher tipo I, tipo II o tipo III según los parámetros reflejados en la **Tabla 1**. Algunos de los pacientes no pudieron ser clasificados en ninguno de estos tres tipos, bien porque tenían unas características clínicas atípicas (pacientes con síndrome de Usher atípico; USHA), bien porque no se disponía de los suficientes datos clínicos para clasificarlos. Estos pacientes se han denominado pacientes Usher no clasificados (USHNC).

Se utilizaron 100 muestras de ADN de individuos sin clínica ni antecedentes familiares de problemas auditivos o visuales con controles sanos para todos los estudios moleculares.

● Extracción de ADN

Se obtuvo ADN genómico de los pacientes, sus familiares y controles a partir de 10-20 ml. de sangre periférica con EDTA como anticoagulante siguiendo el método de extracción y purificación con fenol-cloroformo descrito en la **Figura 2**.

Figura 2. Protocolo de extracción y cuantificación de ADN.

1. Lavar la sangre total con suero fisiológico, desechar el sobrenadante y congelar el paquete celular a -20°C hasta su procesamiento.
2. Añadir al paquete celular la solución de lisis de eritrocitos hasta alcanzar un volumen de 50 ml.
3. Poner en agitación hasta la disolución de la muestra.
4. Dejar a 4°C durante 30 min, agitando de vez en cuando.
5. Centrifugar durante 15 min a 3000 rpm.
6. Desechar el sobrenadante, decantando con cuidado y romper el pellet.
7. Añadir 25 ml de Nonidet P-40 al 0.1%.
8. Mezclar suavemente.

9. Centrifugar durante 15 min a 3500 rpm.
10. Decantar el sobrenadante y romper el pellet.
11. Añadir de 5 a 10 ml de solución A y homogeneizar.
12. Añadir 20 µl/ml de Proteinasa K a una concentración de 10mg/ml.
13. Incubar a 56°C toda la noche.
14. Añadir v/v de fenol/cloroformo/isoamílico y agitar vigorosamente.
15. Centrifugar durante 10 min a 3000 rpm y 8°C.
16. Desechar la fase inferior y repetir la operación.
17. Añadir v/v de la mezcla cloroformo/isoamílico y agitar vigorosamente.
18. Centrifugar durante 10 min a 3000 rpm y 8°C.
19. Desechar la fase inferior y repetir la operación.
20. Centrifugar 5 min a 3000 rpm y 8°C.
21. Pasar la fase superior a otro tubo.
22. Añadir cloruro sódico 5M (NaCl) a razón de 400 µl por cada 5 ml de solución.
23. Añadir etanol absoluto frío (guardado en congelador) a razón de 2v/v.
24. Agitar cuidadosamente hasta ver aparecer la medusa de ADN.
25. Dejar 30 min a -20°C.
26. "Pescar" el ADN, lavarlo por inmersión en etanol al 70% y pasarlo a otro tubo conteniendo Tris 1mM/EDTA 0,1mM.
27. Dejar agitando hasta su completa disolución.

Reactivos

Solución de lisis:

Tris 2M pH 7.5	5 ml
MgCl ₂ 1M	2.5 ml
H ₂ O	csp 500 ml

Solución A:

NaCl 5M	1ml
EDTA 0.25M, pH8	5 ml
SDS al 10%	2.5 ml
H ₂ O	csp 50 ml

Cuantificación del ADN obtenido:

La lectura de la concentración de la muestra de ADN obtenida se llevó a cabo mediante espectrofotometría, midiéndose la densidad óptica (OD) de la muestra a una longitud de onda de 260nm.

La pureza de la muestra (proporción de ADN frente a proteínas no eliminadas con el fenol), corresponde a la relación OD₂₆₀/OD₂₈₀, considerándose una razón en torno a 2 como óptima.

● Análisis mutacional de los genes Usher

El rastreo de genes se realizó de acuerdo al siguiente orden: para USH1 se estudió primero el gen *MYO7A*, en aquellos pacientes en los que no se encontró mutación paso a estudiarse el gen *CDH23*, después *PCDH15*, *USH1G*, *USH3A* y finalmente *USH1C*. En los casos USH2 se procedió de forma similar siendo el primer gen estudiado *USH2A*, posteriormente, *USH3A*, *USH1G* y *DFNB31*. A partir de 2007, el primer paso diagnóstico fue el análisis mediante el microchip de genotipado y, en aquellos casos en los que se encontró una mutación se procedió a estudiar el gen mutado para detectar la segunda mutación y en aquellos casos en los que no se encontró ninguna mutación, se procedió al estudio siguiendo el orden mencionado anteriormente en función del tipo clínico del paciente.

De manera general, las regiones codificantes y las secuencias intrónicas flanqueantes de cada gen fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los reactivos utilizados para la PCR se muestran en la **Tabla 3**.

Reactivo	Concentración	Volumen
Taq polimerasa	5 U/µl	0.25µl
Mezcla de nucleótidos	5mM	1.25 µl
Cebadores	100 pmol/µl	0.1 µl (de cada uno)
Tampón	10x	2.5 µl
MgCl ₂	50mM	0.75 µl
ADN genómico	50-300ng/µl	0.5 µl
H ₂ O		19.55 µl

Condiciones

Temperatura	Tiempo
95°C	5 min
95°C	30 seg
T _m	30 seg
72°C	30 seg
} 35 ciclos	
72°C	5-7 min
4°C	∞

T_m: Temperatura de *annealing* de los cebadores

Tabla 3. Reactivos y condiciones utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los cebadores específicos para la amplificación de cada uno de los exones de cada gen y las condiciones de PCR se describen en Jaijo et al. (2006 y 2007) para *MYO7A*, Aller et ál. (2004) para *USH3A*, Aller et ál. (2007) para *USH1G*, Oshima et ál. (2008) para *CDH23*, Ahmed et ál., (2001) para *PCDH15*, Aller et ál., (2006) para *USH2A*, Aller et ál. (2010a) para *DFNB31* y Aparisi et ál. (2010) para *USH1C*. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1% junto a un marcador de pesos moleculares para determinar su tamaño.

El rastreo de mutaciones se llevó a cabo mediante la secuenciación directa de los productos de PCR. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit *ExoSAP-IT* (*USBcorporation*). El protocolo de purificación se muestra en la **Figura 3**.

Figura 3. Protocolo de purificación con ExoSAP.

1. Añadir 2 µl del enzima ExoSAP a 8 µl del producto de PCR.
2. Incubar durante 15 min a 37°C (temperatura óptima de actuación del enzima) y posteriormente otros 15 min a 80°C (para detener la reacción y desnaturalizar el enzima).

La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit de secuenciación (*DNA Sequencing Kit, Applied Biosystems*) en un termociclador con los ciclos que se detallan en la **Figura 4**.

Figura 4. Condiciones para la reacción de secuenciación.

Reactivo	Volumen	Temperatura	Tiempo	
Producto PCR purificado	3 µl	94°C	3 min	} 25x
Premix	2 µl	96°C	10 seg	
Cebador (3.2 pmol/µl)	1 µl	50°C	6 seg	
Tampón 5x	2 µl	60°C	4 min	
H:O estéril	2 µl	4°C	∞	

Una vez se ha precipitado el producto de la secuenciación se somete a una electroforesis capilar en condiciones estándar. Para ello se utilizó el *ABI PRISM 3130* de *Applied Biosystems* (*Applied Biosystems; Foster City, CA*).

Las secuencias obtenidas comparadas con las secuencias consenso de cada uno de los genes estudiados obtenidas a partir del National Center

for Biotechnology Information (NCBI, USA) utilizándose el programa "*Sequencher™*", versión 4.0.5. (*Gene Codes Corporation*).

Para intentar dilucidar la implicación patológica de las mutaciones detectadas se utilizaron diversas herramientas informáticas en función de la naturaleza del cambio:

- **Inserciones y deleciones:** programa "*TRANSEQ*" (translate nucleic acid sequences) (<http://bio-web.pasteur.fr/seqanal/interfaces/transeq.html>)
- **Mutaciones de "splicing" (procesado de los exones):** "*NNSPLICE 0.9*" (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) y "*Splice view*" (<http://bioinfo.itb.cnr.it/oriel/spliceview.html>)
- **Mutaciones de cambio de aminoácido:** Sort Intolerant From Tolerant (SIFT) (<http://sift.jcvi.org>); PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) y Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>).

● **Detección de grandes reordenamientos en el gen *PCDH15***

En 33 pacientes USH1 no relacionados, en los que se habían descartado previamente mutaciones en los otros genes USH1 o que tras el rastreo mutacional del gen *PCDH15* solamente se encontró una mutación, se procedió al análisis de grandes reordenamientos en *PCDH15* mediante el uso de un kit comercial de MLPA (P292-A1 SALSA MLPA kit; MRC Holland, Ámsterdam, Holanda) de acuerdo al protocolo recomendado (<http://www.mlpa.com>) combinado con un array-CGH (Comparative Genomic Hybridization) diseñado específicamente para cubrir la secuencia no repetitiva de *PCDH15* mediante 20.000 sondas solapantes de 60 nucleótidos cada una. El diseño, la hibridación, la identificación de los puntos donde se produjo, el reordenamiento y el análisis de los datos se llevó a cabo según Aller et ál. (2010b).

El USH está causado por mutaciones de muy diversa naturaleza

● **Microarray de ADN para el diagnóstico del síndrome de Usher**

Se analizaron 183 pacientes con diferentes tipos clínicos de USH para comprobar la eficacia del microchip de genotipado en nuestra población. Este microarray se basa en la tecnología APEX (Arrayed primer Extension) (Kurg et ál., 2000) y contiene 429 mutaciones distintas localizadas en 8 de los 9 genes USH.

RESULTADOS

● **Clasificación clínica**

Del total de 444 pacientes de los que disponíamos de datos clínicos, 165 estaban clasificados como USH1 (37,16%); 238 pacientes fueron clasificados como USH2 (53,60%); 15 se clasificaron como USH3 (3,38%) y de 26 de ellos no se obtuvieron datos clínicos suficientes para clasificarlos en ningún grupo y quedaron como No clasificados USHNC (5,85%) (Figura 5A).

Figura 5A. Porcentajes de los distintos tipos clínicos de S. Usher en pacientes españoles.

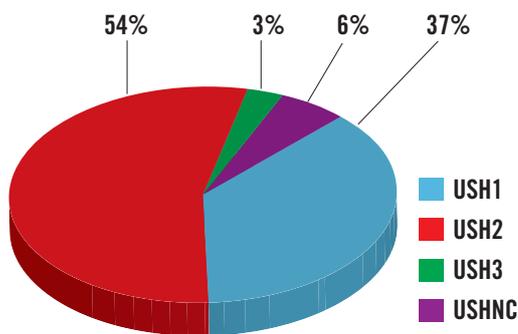
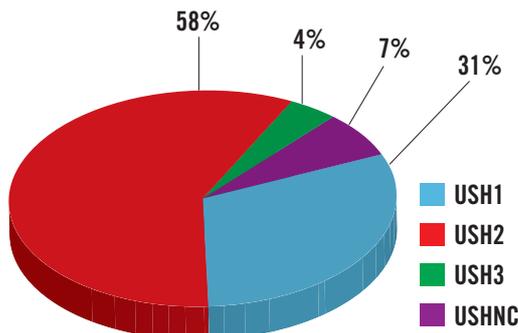


Figura 5B. Porcentaje de los distintos tipos clínicos de S. Usher en familias españolas.



Estos 444 pacientes pertenecían a 343 familias distintas de las cuales 107 fueron clasificadas como USH1 (31,20%); 199 como USH2 (58%); 14 como USH3 (4,08%) y 23 como USHNC (6,71%) (Figura 5B).

● **Análisis mutacional de los genes Usher**

1. Rastreo mutacional del gen MYO7A

El rastreo mutacional del gen MYO7A dio lugar a la identificación de 39 mutaciones distintas, 31 de las cuales no se habían descrito previamente. Se encontraron mutaciones en un total de 32 familias con al menos un afectado por síndrome de USH1 no relacionados entre sí y una familia con síndrome de USH2. En 27 de estas 33 familias se identificaron las dos mutaciones responsables de la enfermedad (82%). En las restantes 6 familias (18%) tan sólo se identificó un cambio patológico.

2. Rastreo mutacional del gen CDH23

El rastreo de mutaciones en el gen CDH23 permitió encontrar 19 mutaciones distintas en nuestra serie. De ellas, 10 no estaban descritas (Tabla 4). El genotipo de cada paciente se muestra en

EXÓN	CAMBIO NUCLEÓTIDO	CAMBIO AMINOÁCIDO
Mutaciones de cambio de aminoácido		
58	c.8311G>A	p.G2771S
10	c.1096G>A	p.A366T
27	c.3268G>A	p.V1090I
30	c.3625A>G	p.T1209A
30	c.3617C>G	p.P1206R
35	c.4488G>C	p.Q1496H
40	c.5363C>T	p.P1788L
43	c.5788G>A	p.D1930N
43	c.5734C>T	p.R1912W
45	c.6049G>A	p.G2017S
54	c.7823G>A	p.R2608H
58	c.8311G>A	p.G2771S
60	c.8903T>C	p.V2968A
Delecciones/Inserciones		
47	c.6346_6347delTT	p.F2116Pfs13
47	6511delC	p.R2171Afs11
47	c.6393delC	p.I2132Sfx11
Mutaciones que afectan el splicing		
INTRÓN 59	c.8722+1delG	?
INTRÓN 45	c.6050-9G>A	?
INTRÓN 20	c.2289+1G>A	?

Tabla 4. Mutaciones identificadas en el gen CDH23 en nuestra serie de pacientes. En negrita las mutaciones no descritas previamente. ?: Efecto desconocido en la proteína.

ID PACIENTE	ID FAMILIA	TIPO CLÍNICO	MUTACIÓN 1 (GEN)	MUTACIÓN 2 (GEN)	MUTACIÓN 1 (PROTEÍNA)	MUTACIÓN 2 (PROTEÍNA)
RP-1034	FRP-162	USH1	c.8311G>A	ND	p.G2771S	ND
RP-1103	FRP-188	USH2*	c.1096G>A	c.3625A>G	p.A366T	p.T1209A
RP-1227	FRP-231	USH1	c.3617C>G	ND	p.P1206R	ND
RP-1314	FRP-266	USH2*	c.6393delC	c.7823G>A	p.I2132Sfx11	p.R2608H
RP-1322	FRP-269	USH1	c.4488G>C	ND	p.Q1496H	ND
RP-1355	FRP-280	USH1	c.3268G>A	ND	p.V1090I	ND
RP-1361	FRP-9	USH1	c.2289+1G>A	c.6050-9G>A	?	?
RP-1374	FRP-306	USH1	c.1096G>A	ND	p.A366T	ND
RP-1534	FRP-368	USH1	c.2289+1G>A	c.6049G>A	?	p.G2017S
RP-157	FRP-5	USH1	c.2289+1G>A	c.5788G>A	?	p.D1930N
RP-1803	FRP-295	USH1	c.6393delC	ND	p.I2132Sfx11	ND
RP-185	FRP-8	USH1	c.5734C>T/ c.6049G>A	c.5734C>T/ c.6049G>A	p.R1912W/ p.G2017S	p.R1912W/ p.G2017S
RP-512	FRP-45	USHNC	c.2289+1G>A	c.2289+1G>A	?	?
RP-608M	FRP-39	USH1	c.8903T>C	ND	p.V2968A	ND
RP-681	FRP-49	USHNC	c.8903T>C	ND	p.V2968A	ND
RP-808	FRP-64	USH1	c.6050-9G>A	ND	?	ND
RP-822	FRP-295	USH1	c.6393delC	c.6393delC	p.I2132Sfx11	p.I2132Sfx11
RP-914	FRP-68	USH1	c.6346_6347delTT	c.6393delC	p.F2116Pfs13	p.I2132Sfx11
RP-928	FRP-75	USH1	6511delC	c.8722+1delG	p.R2171Afs11	?
RP-982	FRP-144	USH1	c.5363C>T	ND	p.P1788L	ND

Tabla 5. Genotipo de los pacientes en los que se ha encontrado al menos una mutación patogénica en el gen *CDH23*. Las columnas 4 y 5 indican el efecto de la mutación en el gen. Las columnas 6 y 7 indican el efecto de la mutación sobre la proteína. ND: No detectado; ?: efecto desconocido. Los casos cuyo fenotipo no se corresponde con el gen en el que se encontraron las mutaciones están marcados con un asterisco.

EXÓN	CAMBIO NUCLEÓTIDO	CAMBIO AMINOÁCIDO
Mutaciones de cambio de aminoácido		
5	c.401G>A	p.R134Q
6	c.521A>G	p.N174S
29	c.3817C>A	p.R127
33	c.4850A>G	p.N1617S
Deleciones/Inserciones		
3	c.92-13779_157+41368del	p.D31_G53del
4-6	c.158-52781_475-3295dup	p.T199Vfs7
11	c.1304_1305insC	p.T436Yfx13
Mutaciones sin sentido		
2	c.7C>T	p.R3X
8	c.733C>T	p.R245X
14	c.1737C>G	p.Y579X
Mutaciones que afectan el <i>splicing</i>		
intrón 21	c.2868+5G>A	?

Tabla 6. Mutaciones identificadas en el gen *PCDH15* en nuestra serie. ?: efecto desconocido sobre la proteína. Las mutaciones no descritas previamente están marcadas en negrita.

la **Tabla 5**. En conjunto, se encontró al menos una mutación en 20 casos índice pertenecientes a 20 familias no relacionadas entre sí, 16 familias clasificadas como USH1, 2 como USH2 y 2 familias de las que no disponíamos de suficientes datos clínicos. Las dos mutaciones responsables de la enfermedad se encontraron en el 50% de los pacientes.

3. Rastreo mutacional del gen *PCDH15*

El análisis del gen *PCDH15* nos llevó a la identificación de 11 mutaciones distintas en nuestra serie 10, de las cuales no estaban descritas con anterioridad (**Tabla 6**). Se hallaron mutaciones en 11 casos índice pertenecientes a 11 familias no relacionadas entre sí. De ellas, 10 estaban clasificadas como USH1 y una como USH3. Las dos mutaciones responsables de la enfermedad se encontraron en 6 de las 11 familias, es decir, un 54,5% de los pacientes (**Tabla 7**).

ID PACIENTE	ID FAMILIA	TIPO CLÍNICO	MUTACIÓN 1 (GEN)	MUTACIÓN 2 (GEN)	MUTACIÓN 1 (PROTEÍNA)	MUTACIÓN 2 (PROTEÍNA)
RP-1034	FRP-162	USH1	c.733C>T	c.92-13779_157+41368del	p.R245X	p.D31_G53del
RP-1286	FRP-258	USH1	c.1304_1305insC	ND	p.T436Yfx12	ND
RP-1321	FRP-269	USH1	c.521A>G	ND	p.N174S	ND
RP-1323	FRP-270	USH1	c.1737C>G	c.2868+5G>A	p.Y579X	?
RP-1374	FRP-306	USH1	c.7C>T	ND	p.R3X	ND
RP-1387	FRP-320	USH1	c.3817C>A	ND	p.R1273S	ND
RP-1429	FRP-329	USH1	c.7C>T	c.7C>T	p.R3X	p.R3X
RP-185	FRP-8	USH1	c.4850A>G	ND	p.N1617S	ND
RP-367	FRP-16	USH1	c.401G>A	c.158-52781_475-3295dup	p.R134Q	p.T199Vfs7
RP-938	FRP-289	USH3*	c.7C>T	c.7C>T	p.R3X	p.R3X
RP-982	FRP-144	USH1	c.158-52781_475-3295dup	c.158-52781_475-3295dup	p.T199Vfs7	p.T199Vfs7

Tabla 7. Genotipo de los pacientes en los que se ha encontrado al menos una mutación patogénica en el gen *PCDH15*. Las columnas 4 y 5 indican el efecto de la mutación en el gen. Las columnas 6 y 7 indican el efecto de la mutación sobre la proteína. ND: No detectada; ?: Efecto desconocido en la proteína. Los casos cuyo fenotipo no se corresponde con el gen donde se detectaron las mutaciones está marcado con un asterisco.

ID PACIENTE	ID FAMILIA	TIPO CLÍNICO	MUTACIÓN 1 (GEN)	MUTACIÓN 2 (GEN)	MUTACIÓN 1 (PROTEÍNA)	MUTACIÓN 2 (PROTEÍNA)
RP-1232	FRP-233	USH1	c.369delA	c.369delA	p.Asp124ThrX7	p.Asp124ThrX7
RP-1262	FRP-249	USH1	c.672C>A	c.672C>A	p.C224X	p.C224X

Tabla 8. Genotipo de los pacientes en los que se han encontrado dos mutaciones patológicas en el gen *USH1C*. Las columnas 4 y 5 indican el efecto de la mutación en el gen. Las columnas 6 y 7 indican el efecto de la mutación sobre la proteína.

EXÓN	CAMBIO NUCLEÓTIDO	CAMBIO AMINOÁCIDO
Mutaciones de cambio de sentido		
7	c.569C>T	p.S190L
14	c.1136G>A	p.G379D
14	c.1188A>G	p.P396P
19	c.1770C>T	p.A590A
24	c.2340C>T	p.V780V
25	c.2457G>C	p.E819D
Deleciones/Inserciones		
4	c.369delA	p.Asp124ThrX7
Mutaciones sin sentido		
8	c.672C>A	p.C224X

Tabla 9. Variantes identificadas en el gen *USH1C* en nuestra serie.

TIPO DE CAMBIO	EXÓN	CAMBIO NUCLEOTÍDICO	CAMBIO EN PROTEÍNA
Cambio en 5'UTR	1	c.1-8C>T	?
Cambio de aminoácido	1	c.83C>T	p.P28L
	2	c.387A>G	p.E130K
	2	c.423G>A	p.K142E
	2	c.1012G>A	p.G338R
	2	c.1036C>T	p.R345W
Cambio isocodificante	2	c.327C>T	p.G109G
	2	c.1185C>T	p.T394T

Tabla 10. Naturaleza, localización y distribución de los cambios encontrados en la secuencia del gen *USH1G*. ?: Efecto desconocido en la proteína.

4. Rastreo mutacional de *USH1C*

Se encontraron dos mutaciones claramente patológicas en sendas familias. En ambos casos, la mutación se encontraba en homocigosis en los miembros afectados por la enfermedad (Tabla 8). Además de las mutaciones claramente patogénicas, se encontraron otras 8 variantes exónicas que tras el análisis de su presencia en controles sanos, análisis informático y segregación con la enfermedad, se consideraron como no patológicas (Tabla 9).

5. Rastreo mutacional de *USH1G*

El rastreo mutacional del gen *USH1G* dio como resultado la identificación de 8 cambios en la secuencia de ADN en pacientes de 9 de estas familias. Todos estos cambios se hallaron en heterocigosis. Ninguno de ellos había sido descrito con anterioridad y ninguno de ellos se consideró claramente patogénico (Tabla 10).

6. Rastreo mutacional del gen *USH2A*

Se identificaron 101 mutaciones distintas claramente patológicas de las cuales 62 han sido descritas por primera vez en población española. Las dos mutaciones responsables se encontraron en 68 pacientes (60,2%) mientras que en 45 (39,8%) falta por identificar la segunda mutación.

7. Rastreo mutacional del gen *DFNB31*

Se llevó a cabo un estudio mutacional del gen *DFNB31* en 198 pacientes tanto *USH1* como *USH2* fundamentalmente de origen español pero también de otros orígenes centroeuropeos, africanos y asiáticos. Se encontraron 23 variantes que por su presencia en controles sanos, ausencia de segregación con la enfermedad y, tras un análisis informático, se consideraron como no patológicas (Tabla 11).

EXÓN	CAMBIO NUCLEÓTIDO	CAMBIO AMINOÁCIDO	ORIGEN
1	c.117G>A	Ninguno	N, S, G, H, C, R, T, A, E
6	c.1353T>C ^a	Ninguno	N,S, G, H, C, R, T, E
7	c.1455G>A	Ninguno	N, G
7	c.1486C>T	Ninguno	Unknown
7	c.1515G>A	Ninguno	S, G, H
9	c.1886G>A	Ninguno	S, N
10	c.2283C>T	Ninguno	S, G, H, S, C, T
10	c.2307C>T	Ninguno	S, G
1	c.229A>T	p.T77S	N
4	c.1048C>T	p.R350W	E
4	c.1148C>A	p.T383N	N
4	c.1148C>G	p.T383S	S
6	c.1309G>A	p.A437T	S
6	c.1318G>A	p.A440T	N, S, G, C, R, T, E
6	c.1339G>A	p.D447H	H
8	c.1684C>G	p.P562A	N, S, G, H, C, R, T, E
9	c.1838T>C ^a	p.M613T	N, S, G, H, C, R, T, E
9	c.1884C>A	p.S628R	E
9	c.1943C>A	p.S648Y	S
9	c.2169G>A	p.M723I	H
10	c.2348T>C ^a	p.V783A	N, S, G, H, C, R, T, E
10	c.2388C>A	p.N796K	N, S, G, H, C, R, T, E
12	c.2644C>A	p.R882S	S

Tabla 11. Variantes encontradas en *DFNB31*. en nuestra serie de pacientes y otras series procedentes de otros países. N: Holanda, S: España; G: Alemania, H: Hungría, R: Rusia, T: Turquía, A: Arabia Saudí, E: Egipto.

8. Rastreo mutacional del gen *USH3A*

El análisis del gen *USH3A* dio como resultado la identificación de 2 mutaciones patológicas (Tabla 12) y responsables de la enfermedad en 3 familias, dos de ellas afectadas por USH1 y una por USH3 (Tabla 13).

del intrón 3 en heterocigosis en un paciente al que ya se le había encontrado una mutación en el rastreo mutacional y una duplicación de 88Kb que afectaba a los exones 4, 5 y 6 en heterocigosis con otra mutación en un paciente y en homocigosis en un tercer paciente (Figura 6). Los puntos exactos de inicio y final de la duplicación y la

EXÓN	CAMBIO NUCLEÓTIDO	CAMBIO AMINOÁCIDO
Mutaciones de cambio de aminoácido		
0	c.118G>T	p.C40G
Mutaciones sin sentido		
0	c.189C>A	p.Y63X

Tabla 12. Mutaciones identificadas en el gen *USH3A*. Las mutaciones no descritas previamente están marcadas en negrita.

ID PACIENTE	ID FAMILIA	TIPO CLÍNICO	MUTACIÓN 1 (GEN)	MUTACIÓN 2 (GEN)	MUTACIÓN 1 (PROTEÍNA)	MUTACIÓN 2 (PROTEÍNA)
RP-519	FRP-26	USH1*	c.189C>A	c.189C>A	p.Y63X	p.Y63X
RP-614	FRP-44	USH1*	c.189C>A	c.189C>A	p.Y63X	p.Y63X
RP-686	FRP-71	USH3	c.118G>T	c.118G>T	p.C40G	p.C40G

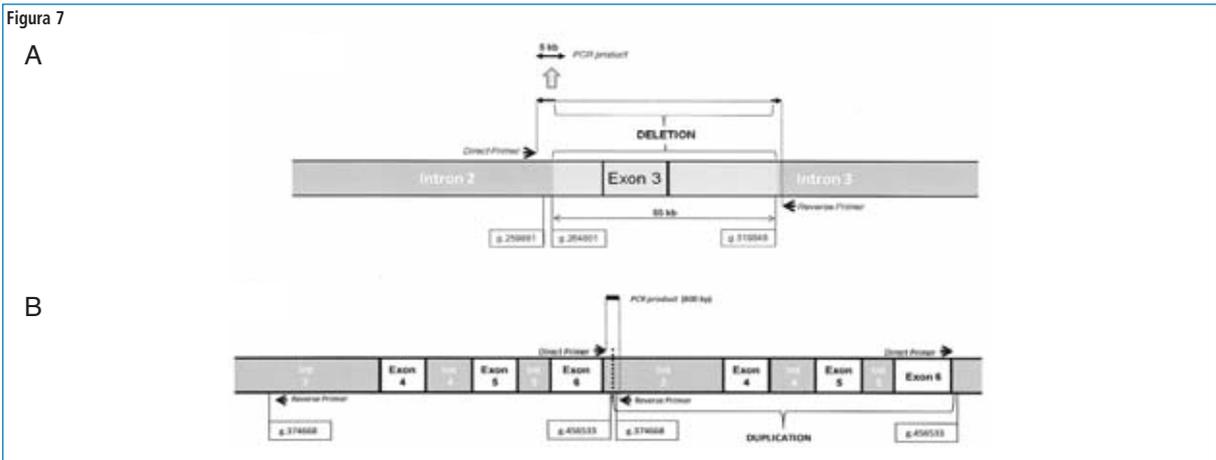
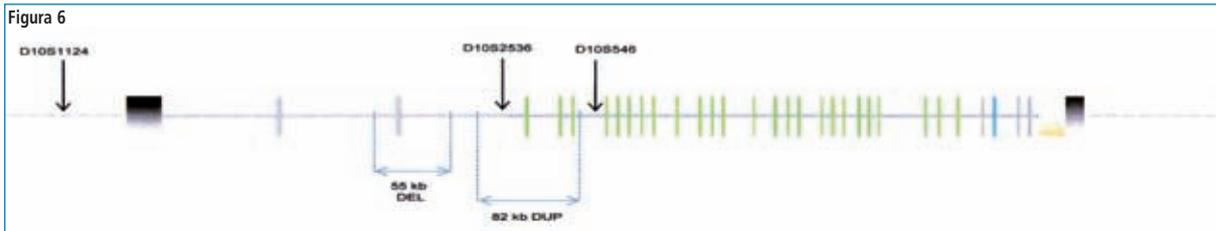
Tabla 13. Genotipo de los pacientes en los que se ha encontrado al menos una mutación patológica en el gen *USH3A*. Las columnas 4 y 5 indican el efecto de la mutación en el gen. Las columnas 6 y 7 indican el efecto de la mutación sobre la proteína. Los casos cuyo fenotipo no se corresponde con el gen en el que se encontraron las mutaciones están marcados con un asterisco.

● Detección de grandes reordenamientos en el gen *PCDH15*

Se identificaron reordenamientos en *PCDH15* en 3 pacientes aparentemente no relacionados. Se detectó una delección intragénica de 55Kb que afectaba a parte del intrón 2, el exón 3 y parte

delección se observan en las Figuras 7A y 7B respectivamente.

● Prevalencia molecular del síndrome Basándonos en una cohorte de 65 pacientes no relacionados, clínicamente catalogados como USH1, que han sido rastreados para todos los ge-



nes USH1 y 146 pacientes no relacionados, diagnosticados de USH2 que han sido rastreados para los genes USH2 excepto *GPR98*, el porcentaje de implicación de cada uno de los genes entre los pacientes USH españoles es: para los pacientes catalogados como USH1: 35,5% para *MYO7A*; 27,74% para *CDH23*; 12,22% para *PCDH15*; 2% para *USH3A* y 1,5% para *USH1C*, no encontrándose ninguna mutación patológica en *USH1G* (Figura 8A). Para los pacientes USH2 se ha visto una implicación del gen *USH2A* en el 77,4% de los casos, no observándose ninguna mutación patológica en el gen *DFNB31* (Figura 8B).

Se ha generado un base de datos del síndrome de Usher en España

● **Evaluación de la eficacia del microchip-Usher**
El análisis mediante el microchip de genotipado-Usher permitió identificar al menos una de

las dos mutaciones responsables en 62 de 183 pacientes (33,9%). En función del tipo clínico, se hallaron mutaciones patológicas en el 31,4% de los pacientes con USH1; 39,4% con USH2; 22,2% con USH3 y 15,4% con USHNC. Se encontraron 97 alelos patológicos, lo que supuso un 26,5% de los alelos esperados (Tabla 14). Por otra parte, no se pudieron confirmar mediante secuenciación dos de los 96 cambios encontrados. Esto indica que la tasa de detección errónea del microchip es de un 2%.

● **Elaboración de un algoritmo para el diagnóstico molecular del síndrome de Usher**
Tras 15 años de trabajo, la aparición del microchip y el conocimiento de la epidemiología molecular en nuestra población, nos ha permitido establecer un algoritmo diagnóstico molecular óptimo para el síndrome de Usher. Este algoritmo se muestra en la Figura 9.

Figura 8. Porcentaje de implicación de cada gen en el síndrome de Usher. 8A: Casos con síndrome de Usher tipo I.

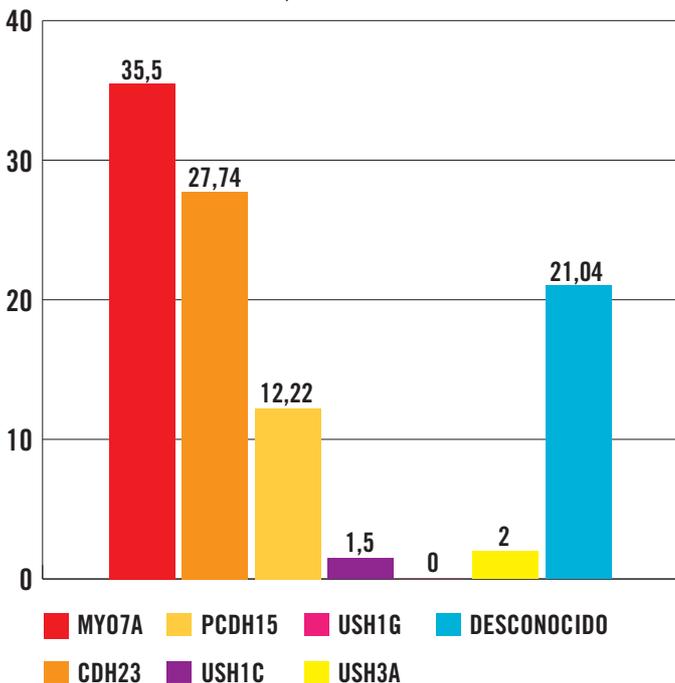
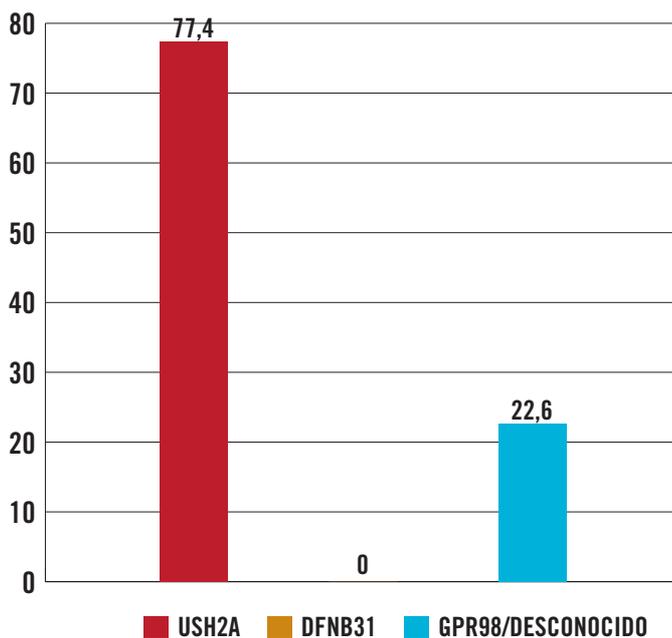


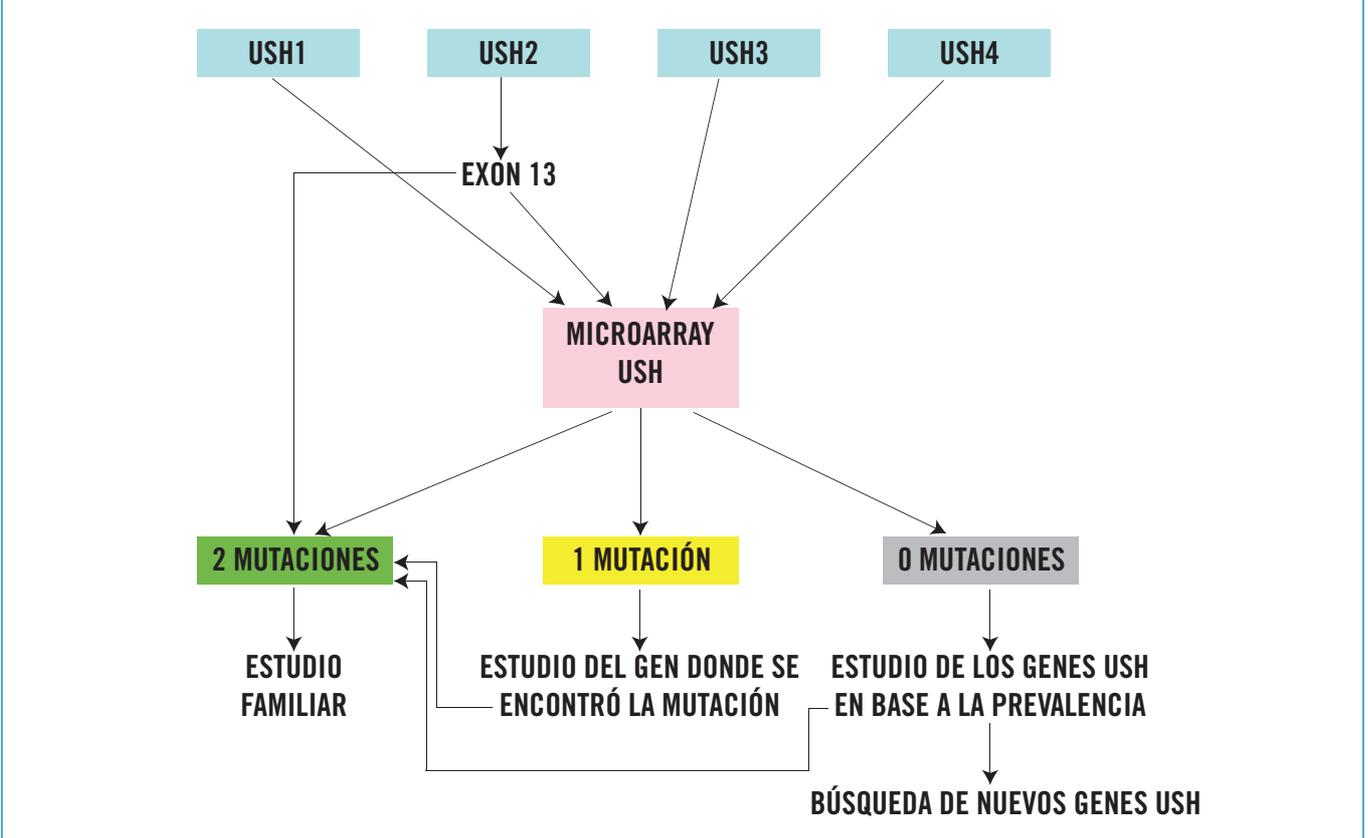
Figura 8. Porcentaje de implicación de cada gen en el síndrome de Usher. 8B: Casos con síndrome de Usher tipo II. El 22,6% de los pacientes pueden presentar mutaciones en el gen *GPR98* (no estudiado) o en otro/s gen/es todavía no identificados.



	PACIENTES USH1				PACIENTES USH2				PACIENTES USH3				PACIENTES USHNC			
	Nº alelos				Nº alelos				Nº alelos				Nº alelos			
	Total	0	1	2	Total	0	1	2	Total	0	1	2	Total	0	1	2
	51	35	8	8	104	64	25	16	9	7	0	2	19	18	2	1
Pacientes con mutaciones	16 / 51 = 31,4%				41 / 104 = 39,4%				2 / 9 = 22,2%				3 / 19 = 15,8%			
Alelos mutados	24 / 102 = 23,5%				57 / 208 = 27,4%				4 / 18 = 22,2%				4 / 38 = 10,5%			

Tabla 14. Resumen del porcentaje de pacientes en lo que se han encontrado mutaciones y porcentaje de alelos mutados.

Figura 9. Algoritmo para el diagnóstico molecular de síndrome de Usher en población española.



DISCUSIÓN

● Epidemiología clínica del síndrome de Usher

La distribución de los distintos tipos clínicos en España es muy similar a la encontrada previamente por otros autores en poblaciones diferentes. Alrededor de un tercio de los casos son tipo 1, y dos tercios tipo 2, siendo muy infrecuente el tipo 3. Asimismo, hemos encontrado

un cierto porcentaje de casos tipo 2 en los que se apreciaba una cierta progresión de la hipoacusia, aunque ésta progresión no es equiparable a las formas típicas de USH3. Parece ser que las desviaciones de esta distribución clínica del USH solamente se dan en poblaciones endogámicas como la población finlandesa, judía askenazi o población de Quebec de origen francés

o acadiano, donde a través de una serie de cuellos de botella se han seleccionado algunos genes y/o mutaciones infrecuentes en otras poblaciones (Joensuu et ál., 2001; Ness et ál., 2003; Ebermann et ál., 2007).

Se ha establecido un algoritmo diagnóstico molecular óptimo para el USH

● Epidemiología molecular del síndrome de Usher

Los rastreos mutacionales en 8 de los 9 genes conocidos para el USH han permitido identificar las mutaciones responsables de la enfermedad en alrededor del 75% de los pacientes, tanto afectados por USH1 como por USH2. Para el USH1, el gen más frecuentemente implicado es *MYO7A* con cerca de un 36% de los casos, seguido de *CDH23* y *PCDH15* (28 y 12% respectivamente), el resto de genes USH1 (*USH1C* y *USH1G*) tienen muy baja o ninguna implicación en el USH. Por otra parte, se ha comprobado que la mutación p.Y63X, específica de población española, es responsable del tipo USH1 a pesar de estar localizada en el gen *USH3A*, responsable de USH3. También hemos comprobado que las grandes deleciones y duplicaciones son responsables de un número relativamente elevado de casos debidos a mutaciones en el gen *PCDH15* (27% de los casos debidos a mutaciones en *PCDH15*). Este resultado coincide con el obtenido previamente para deleciones en *PCDH15* en población francesa según LeGuedard et ál. (2008). A la vista de este resultado, parece necesaria la realización de técnicas como el MLPA, PCR cuantitativa o aCGH para el correcto análisis de mutaciones en este gen. De igual forma, la aplicación de estas técnicas en el resto de genes USH podría permitir la identificación del defecto genético en algunos de aquellos pacientes en los que la causa genética es desconocida, o solo se ha encontrado una de las dos mutaciones responsables. Respecto a los genes USH2, se ha comprobado que el gen *USH2A* es responsable del 77,4% de los ca-

sos. Esto está de acuerdo con nuestros resultados previos basados en el estudio indirecto por análisis de ligamiento genético y estudio de haplotipos (Espinós et ál., 1998) y los resultados obtenidos por otros autores (Baux et ál., 2007; Dreyer et ál. 2008; McGee et ál., 2010). El abanico de fenotipos originados por mutaciones en *USH2A*, aunque en la mayor parte de los casos era *USH2* típico, ha sido amplio, encontrándose mutaciones que daban lugar a hipoacusias leves, otras severas y otras progresivas.

El rastreo mutacional en el gen *DFNB31* realizado en nuestro laboratorio en una serie de 198 familias *USH1* y *USH2* de origen, español, holandés, alemán, húngaro y otros, nos indican que esta forma de USH es muy poco frecuente. De hecho, actualmente solo está descrita la familia en la que se identificó la forma *USH2D*, trabajo realizado por nuestro grupo en colaboración con otro grupo alemán (Ebermann et ál., 2007). No se ha rastreado el gen *GPR98*. Esta es una tarea pendiente para un futuro próximo que no ha sido abordada todavía por el enorme tamaño del gen y la baja implicación en el síndrome, alrededor del 5%, descrita por el único grupo que ha realizado un rastreo de *GPR98* hasta la fecha (Weston et ál., 2004).

Como era de esperar, se han encontrado muy pocas mutaciones en el gen *USH3A*. De éstas, la mutación p.Y63X se detectó en homocigosis en dos familias *USH1*, y la mutación p.C40G en una familia *USH3*.

En conjunto, el USH está causado por mutaciones de muy diversa naturaleza, mutaciones de codón de parada, de cambio de aminoácido, mutaciones que afectan al *splicing*, deleciones y duplicaciones, tanto grandes como pequeñas, etc.

No existen mutaciones prevalentes ni regiones *hot spot* en los genes USH. La inmensa mayoría de las familias tienen una mutación exclusiva o compartida como mucho con una o dos familias más que, habitualmente, proceden del mismo lugar geográfico. Esto dificulta enormemente el diag-

nóstico molecular del síndrome. La única excepción a esta regla es la mutación c.2299delG localizada en el exón 13 del gen *USH2A* y que está presente en alrededor del 25% de los casos USH2. Respecto a esta mutación, hemos demostrado que es una mutación ancestral de origen europeo cuyo origen podría situarse en torno a los 5.500 años de antigüedad (Aller et ál., 2010c).

● Microchip de genotipado

Contribuimos a la creación y validación de un microchip de ADN para diagnóstico molecular del USH. La contribución de nuestro grupo al conjunto de las 429 mutaciones incluidas en el chip ha sido de 53 (12,3%) (Cremers et ál., 2006). Este microchip es una buena herramienta para el genotipado ya que es rápida, fiable y económica y es independiente del tipo clínico de los pacientes, lo cual permite facilitar el diagnóstico genético en el caso de identificar una sola mutación o detectar mutaciones en genes generalmente implicados en otros tipos clínicos. Sin embargo, solo detecta mutaciones previamente localizadas, por lo que necesita ser actualizado regularmente, no detecta grandes reordenamientos, deleciones o duplicaciones y requiere la confirmación de los resultados el microchip mediante secuenciación.

CONCLUSIONES

- Un 75% de los pacientes USH1 españoles presentan mutaciones en alguno de los 5 genes responsables identificados hasta la fecha. El gen *MYO7A* es el que presenta mayor implicación entre los casos USH1 con un porcentaje del 35,5%, seguido de los genes *CDH23*, *PCDH15*, *USH3A* y *USH1C*.
- Un 77,4% de los pacientes catalogados como USH2 presentan mutaciones en el gen *USH2A*. Este resultado está de acuerdo con los estudios de epidemiología molecular del USH realizados en otras poblaciones.
- Los genes *USH1G* y *DFNB31* no son responsables de ningún caso USH en nuestra serie.

- Los grandes reordenamientos en los genes USH pueden ser responsables de la enfermedad en un elevado porcentaje de casos, como ha puesto de manifiesto el análisis del gen *PCDH15*.

- Alrededor de un 25% de los pacientes no muestran mutaciones en los genes conocidos o estas mutaciones no son detectables mediante los métodos tradicionales empleados. Estos pacientes pueden presentar mutaciones en regiones no analizadas de los genes conocidos (regiones promotoras o intrónicas), grandes reordenamientos no detectables por PCR y secuenciación, presencia de mutaciones en genes que no corresponden al tipo clínico del paciente u otros genes todavía no identificados.

La inmensa mayoría de las familias tienen una mutación exclusiva o compartida con una o dos familias más

- El microarray de genotipado para USH detecta de forma fácil y rápida 429 mutaciones implicadas en el USH. Este microarray permite identificar al menos una mutación responsable en alrededor de un tercio de los pacientes y alrededor del 25% de los alelos mutados con independencia de cuál sea el tipo clínico del paciente.
- Se ha establecido un algoritmo de diagnóstico molecular del síndrome basado en las herramientas disponibles actualmente y en el conocimiento de la prevalencia y epidemiología genética del USH en nuestra población. Este algoritmo facilitará el rastreo del defecto subyacente al síndrome a la espera de la puesta a punto de métodos diagnósticos basados en nuevas tecnologías como la secuenciación de nueva generación.
- Se ha generado una base de datos clínicos y genéticos del síndrome de Usher en España que permitirá la creación de grupos homogéneos de pacientes para futuros ensayos clínicos basados en terapias avanzadas.

BIBLIOGRAFÍA :

- Ahmed Z.M., Riazuddin S, Bernstein SL, et ál. *Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F*. Am J Hum Genet. 69: 25-34 (2001).
- Aller E, Jaijo T, Beneyto M, et ál. *Identification of 14 Novel Mutations in the Long Isoform of USH2A in Spanish Patients with Usher Syndrome Type II*. J.Med. Genet. 43: e55 (2006).
- Aller E, Jaijo T, Beneyto M, et ál. *Screening of the USH1G Gene among Spanish Patients with Usher Syndrome. Lack of Mutations and Evidence of a Minor Role in the Pathogenesis of the Syndrome*. Ophthalmic Genet. 28: 151-155 (2007).
- Aller E, Jaijo T, García-García G, et ál. *Identification of large rearrangements of the PCDH15 gene by combined MLPA and oligonucleotide CGH-array: Large duplications can be responsible for Usher syndrome*. Invest Ophthalmol. Vis Sci. 51: 5480-5485 (2010).
- Aller E, Jaijo T, Oltra S, et ál. *Mutation screening of USH3 gene (clarin-1) in Spanish patients with Usher syndrome. Low prevalence and phenotypic variability*. Clin. Genet. 66: 525-529 (2004).
- Aller E, Jaijo T, van Wijk E, et ál. *Sequence variants of the DFNB31 gene among Usher syndrome patients of diverse origin*. Mol Vis. 16: 495-500 (2010).
- Aller E, Larrieu L, Jaijo T, et ál. *The USH2A c.2299delG mutation: dating its common origin in a Southern European population*. Eur J Hum Genet. 18: 788-793 (2010).
- Aparisi MJ, García-García G, Jaijo T, et ál. *Novel mutations in the USH1C gene in Usher syndrome patients*. (En prensa 2010)
- Baux D, Larrieu L, Blanchet C, et ál. *Molecular and in silico analyses of the full length isoform of usherin identify new pathogenic alleles in Usher type II patients*. Hum Mutat 28: 781-789. (2007).
- Cremers FP, Kimberling WJ, Kulm M, et ál. *Development of a genotyping microarray for Usher syndrome*. J. Med. Genet. 44: 153-160 (2007).
- Dreyer B, Brox V, Tranebjaerg L, et ál. *Spectrum of USH2A mutations in Scandinavian patients with Usher syndrome type II*. Hum Mutat 29: 451 (2008).
- Ebermann I, Lopez I, Bitner-Glindzic M, et ál. *Deafblindness in French Canadians from Quebec: a predominant founder mutation in the USH1C gene provides the first genetic link with the Acadian population*. Genome Biol. 8: R47 (2007).
- Ebermann I, Scholl HP, Charbel Issa P, et ál. *A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss*. Hum Genet. 121: 203-211 (2007).
- Espinós C, Millán JM, Beneyto M and Nájera C. *Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain*. Community Genet. 1: 223-228 (1998).
- Jaijo T, Aller E, Beneyto M, et ál. *MYO7A Mutation Screening in Usher Syndrome Type I Patients from Diverse Origins*. J.Med.Genet. 44: e71 (2007).
- Jaijo T, Aller E, Beneyto M, Nájera C y Millán JM. *Estudio genético molecular del síndrome de Usher en España*. Acta Otorrinolaringológica Española. 56: 285-289 (2005).
- Jaijo T, Aller E, García-García G, et ál. *Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci 51: 1311-1317 (2010).
- Jaijo T, Aller E, Oltra S, et ál. *Mutation Profile Of MYO7A Gene In Spanish Patients With Usher Syndrome Type I*. Hum Mutat 27: 290-291 (2006).
- Joensuu T, Hämäläinen R, Yuan B, et ál. *Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3*. Am J Hum Genet. 69: 673-684 (2001).
- Kremer H, van Wijk E, Märker T, et ál. *Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways*. Hum Mol Genet. 15 Spec No 2: R262-70. (2006).
- Kurg A, Tõnisson N, Georgiou I, et ál. *Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology*. Genet Test. 2000; 4: 1-7 (2000).
- Le Guédard, S. Faugère, V. Malcolm, S. et ál. (2007) *Large genomic rearrangements within the PCDH15 gene are a significant cause of USH1F syndrome*. Mol Vis 13, 102-107.
- McGee, TL. Seyedahmadi, BJ. Sweeney, MO. et ál. *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 (Epub ahead of print, 2010).
- Nájera C, Aller E, Jaijo T, Millán JM. *Usher syndrome. Chapter 3. In Retinal Degeneration: Causes, Diagnosis and Treatment*. Ed: Robert B. Carlin, Nova Science Publishers, Inc. (2009).
- Ness SL, Ben-Yosef T, Bar-Lev A, et ál. *Genetic homogeneity and phenotypic variability among Ashkenazi Jews with Usher syndrome type III*. J Med Genet. 40: 767-772 (2003).
- Weston, MD. Luijendijk, MW. Humphrey, KD. et ál. *Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signalling in the pathogenesis of Usher syndrome type II*. Am J Hum Genet. 74: 357-366 (2004).