

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**MUTACIONES EN LOS GENES *GJB2* Y *GJB6* EN PACIENTES CON  
HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA**

**Por**

**DRA. AIDEÉ ALEJANDRA HERNÁNDEZ JUÁREZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

**Febrero, 2014**

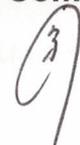
**“MUTACIONES EN LOS GENES GJB2 Y GJB6 EN PACIENTES CON  
HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA”**

**Aprobación de la tesis:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Luis Daniel Campos Acevedo**  
**Director de la Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Med. Laura Elja Martínez Garza**  
**Miembro de la Comisión de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**QFB. José de Jesús Lugo Trampe**  
**Miembro de la Comisión de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. José Luis Treviño González**  
**Miembro de la Comisión de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

*A mi Padre, por ser el ejemplo para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Esta tesis es el resultado de lo que me has enseñado en la vida, ya que siempre has sido una persona honesta y entregada a tu trabajo. Es por ello que hoy te dedico este trabajo de tesis. Gracias por confiar en mí y ayudarme a culminar esta etapa de mi vida.*

*Gracias Mamá por estar al pendiente durante toda esta etapa y por llevarme en tus oraciones.*

*A mis amigos, en especial a Mariana por pasar a mi lado los momentos de la residencia, y estar siempre en las buenas y en las malas.*

*Gracias a las personas que se fueron en el camino, pero que en su momento me ayudaron a que este gran esfuerzo se volviera realidad, Gache y Carmelita.*

*A mis profesores, Dra. Med. Laura Martínez de Villarreal, Dr. Daniel Campos, Dra. Beatriz de la Fuente, Dra. Arely López y Dra. Marisol Ibarra gracias por darme la oportunidad de ser parte del departamento de genética y por el tiempo que me han dedicado durante estos tres años.*

*Y por último, pero no por eso menos importante, a José Lugo, Rocío Martínez, Fabiola Agüero, Dalía Rodríguez y César Garza, ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.*

# TABLA DE CONTENIDO

## Capítulo I

1. RESÚMEN	1
------------	---

## Capítulo II

2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Antecedentes	8
2.2 Justificación	10

## Capítulo III

3. OBJETIVO	11
-------------	----

## Capítulo IV

4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1 Tipo de estudio	12
4.2 Población de estudio	12
4.3 Descripción del diseño	13

## Capítulo V

5. RESULTADOS	19
---------------	----

## Capítulo VI

6. DISCUSIÓN	24
--------------	----

## Capítulo VII

7. CONCLUSIÓN .....	29
---------------------	----

## Capítulo VIII

8. ANEXOS .....	30
8.1 Ejemplos de electroferogramas .....	30
8.2 PCR-RFLP mutación IVS1+1G>A .....	32
8.3 qPCR cuantificación del gen <i>GJB6</i> .....	33
8.4 Genes que causan sordera no sidrónica. ....	35
8.5 Cartas de consentimiento informado .....	36

## Capítulo IX

9. BIBLIOGRAFÍA .....	51
-----------------------	----

## Capítulo X

10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	55
----------------------------------	----

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Reactivos de PCR para secuenciación . . . . .	14
2. Parámetros de PCR para secuenciación . . . . .	15
3. Reactivos de PCR para RFLP . . . . .	16
4. Parámetros de PCR para RFLP . . . . .	17
5. Cebadores en el gen <i>GJB6</i> . . . . .	18
6. Resultados . . . . .	20
7. Variantes Patogénicas . . . . .	21
8. Genotipo y Fenotipo de los pacientes que presentaron mutaciones . . .	22
9. Origen de los padres de los pacientes que presentaron mutaciones . . .	23

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Clasificación de hipoacusia según la etiología . . . . .	5
2. Estructura esquemática de las conexinas, conexones y uniones tipo Gap . .	7

## LISTA DE ABREVIATURAS

**GJB2:** Gap junction beta-2

**GJB6:** Gap junction beta-6

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**DFN:** Deafness (por sus siglas en inglés)

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism (por sus siglas en inglés)

**H<sub>2</sub>OMQ:** Milli-Q water

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de Magnesio

**DNTPs:** Deoxyribonucleotides triphosphate (por sus siglas en inglés)

**Pb:** Pares de bases

**Kb:** Kilobases

**μL:** Microlitro

**mM:** Milimolar

**pmol:** Picomoles

**U:** Unidades

**ng:** Nanogramos

**Fdw:** Forward

**Rvs:** Reverse

# CAPITULO I

## 1. RESUMEN

La incidencia de sordera alrededor del mundo es de aproximadamente 1 en 1,000 recién nacidos vivos. Se considera que el 50% de los casos de hipoacusia se deben a factores genéticos, del cual el 70% son casos aislados que no muestran asociación sindrómica. Las sorderas genéticas no sindrómicas se han agrupado en cuatro categorías según el tipo de herencia, las más comunes son las autosómicas recesivas, en donde se sabe que las mutaciones en el gen *GJB2*, que codifica para una proteína conexina, son la causa más común de sordera prelingual no sindrómica. La frecuencia en las mutaciones varía de acuerdo a la población estudiada, pero en general se considera la mutación 35delG como la más frecuente. En el gen *GJB6*, se han reportado dos grandes deleciones como la 2ª causa de sordera no sindrómica autosómica recesiva en algunas poblaciones, generalmente en individuos heterocigotos compuestos portadores de variantes en el gen *GJB2*.

El objetivo general es identificar las mutaciones más frecuentes de los genes *GJB2* y *GJB6* en pacientes de una población del noreste de México con sordera neurosensorial no sindrómica.

Se reclutaron 79 individuos con hipoacusia congénita sin evidencia de características sindrómicas que fueron referidos al departamento de genética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La población de la muestra era geográficamente del noreste de México. Previa firma de consentimiento informado se tomaron 5 ml de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA. La extracción del ADN se realizó por medio del kit de QIAGEN - QIAamp DNA Mini, posteriormente se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa de la región codificante de *GJB2* para después hacer la reacción de secuenciación. La detección de la mutación IVS1+1G>A del gen *GJB2* se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa con polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción. Para la búsqueda de deleciones en el gen *GJB6* se utilizó reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Se incluyeron un total de 78 pacientes, de los cuales 12 tuvieron alguna mutación. No se encontró la mutación IVS1+1G>A ni deleciones en *GJB6*, por lo que solo se dio el diagnóstico etiológico en el 16.5% (alelos patológicos *GJB2*) de los casos estudiados en esta población con sordera prelingual no sindrómica.

Podemos concluir que los datos sugieren que las mutaciones en el gen *GJB2* así como las deleciones en *GJB6* son una causa rara de sordera no sindrómica en la población del noreste de México. Esto comprueba la gran heterogeneidad genética de esta condición, apoyando la necesidad de una investigación más extensa en nuestra población.

## CAPITULO II

### 2. INTRODUCCIÓN

La hipoacusia es un término que describe la pérdida completa o parcial de la audición, de manera que se disminuye la capacidad de discriminar los sonidos.

De acuerdo con la organización mundial de la salud, existen 278 millones de personas en el mundo afectadas con hipoacusia. En los Estados Unidos de América, la discapacidad auditiva es la condición congénita más común, cada día nacen 33 infantes con algún grado de hipoacusia, su incidencia es de 1-2 por cada 1000 recién nacidos, esta cantidad es similar a la reportada en México, donde se sabe que cerca de 280 mil personas están afectadas de sordera por lo que es la tercera causa de discapacidad<sup>1,2</sup>.

La hipoacusia comprende un amplio espectro clínico y puede clasificarse según diferentes criterios<sup>3</sup>:

#### 1. Localización

- Conductiva
- Neurosensorial
- Mixta

## 2. Inicio

- Prelingual
- Postlingual

## 3. Grado

- Leve
- Moderada
- Severa
- Profunda

## 4. Etiología

- Adquirida
- Genética

Se considera que 50% de las hipoacusias se deben a secuelas de factores ambientales, el 50% restante son causas de origen genético con más de 400 genes involucrados y que se segregan con diferentes mecanismos de herencia. De este 50% de origen genético, el 30% de los casos manifiestan una asociación sindrómica ya que presentan otras características clínicas además de la sordera, mientras que el 70% restante son casos aislados en los cuales se ha observado una gran heterogeneidad genética con más de 150 *loci* asociados y más de 60 genes causales identificados<sup>4</sup>.

Las sorderas genéticas no sindrómicas se han agrupado en cuatro categorías según el tipo de herencia, las más comunes son las

autosómicas recesivas, las cuales conforman hasta el 80% de los casos, las de herencia autosómica dominante representan el 18% de los casos, y las ligadas al cromosoma X y mitocondriales solo el 2% (Figura 1)<sup>5</sup>.

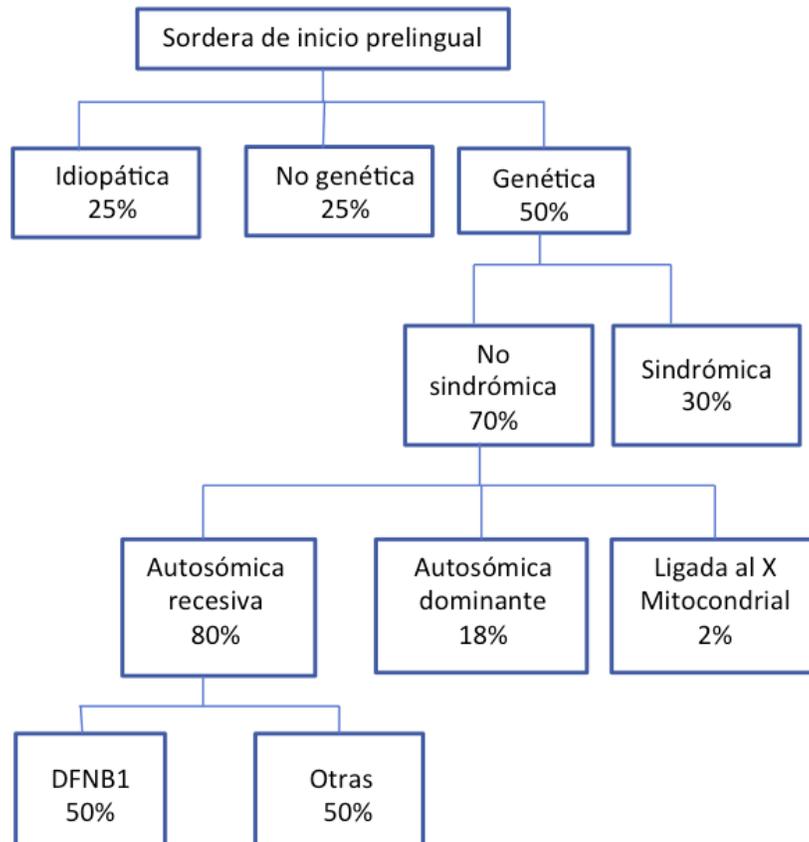


Figura 1. Clasificación de hipoacusia según la etiología

De acuerdo al locus de los genes implicados, se nombran como DFN (del inglés DeaFNess), seguido de una letra de acuerdo al tipo de herencia al que corresponden y finalmente un número relacionado al orden cronológico en el que fueron descubiertos estos genes. Por tanto, los *loci*

autosómico dominante son conocidos como DFNA, los *loci* autosómicos recesivos como DFNB y los ligados al X como DNF<sub>X</sub><sup>5</sup>.

La hipoacusia no sindrómica neurosensorial autosómica recesiva es la forma más común de sordera congénita. Su prevalencia aproximada es de 14:100,000 basado en el cálculo de la incidencia de sordera hereditaria de 1:2000 neonatos, de los cuales el 70% tienen sordera no sindrómica. Este tipo de sordera generalmente está asociada a mutaciones en el gen *GJB2*<sup>6</sup>. En algunos grupos poblacionales explica hasta el 50% de los casos de sordera de origen genético<sup>7</sup>.

El gen *GJB2* se encuentra localizado en 13q12, se extiende a lo largo de 5,5 kb y consta de 2 exones de los cuales solo uno es el que codifica para una proteína de 226 residuos de aminoácidos, denominada conexina-26<sup>8</sup>. Esta conexina es un miembro de la gran familia de proteínas involucradas en la formación de uniones Gap, las cuales se realizan mediante seis monómeros unidos forman un conexón el cual se une a otro conexón en la superficie de una célula adyacente para formar un canal intracelular, permitiendo el paso directo de iones y moléculas entre las células vecinas y que principalmente actúan en el reciclaje de iones de potasio endolinfático durante la transducción del sonido por la cóclea (Figura 2)<sup>9</sup>.

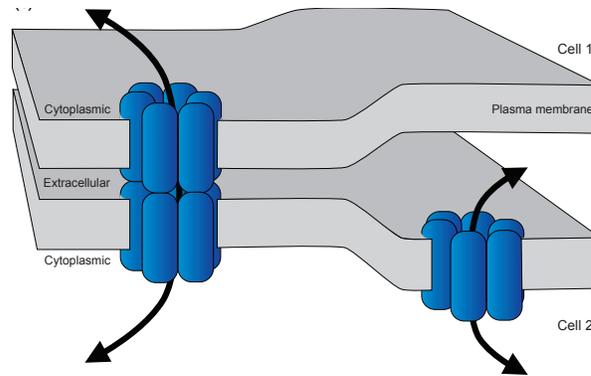


Figura 2. Estructura esquemática de las conexinas, conexones y uniones tipo Gap

El gen *GJB6* se encuentra en el mismo locus, aproximadamente 35-kb río abajo del gen *GJB2*. Este gen consta de 6 exones, los 5 primeros de los cuales corresponden a la región 5' no traducida (5'UTR) y el sexto exón codifica la proteína conexina-30, otro miembro de la misma familia que se ha vinculado como causa de sordera no sindrómica por mutaciones heterocigotas con *GJB2* hasta en el 32% de los pacientes. Siendo éste la segunda causa más frecuente de sordera no sindrómica autosómica recesiva<sup>5,7</sup>.

Ambos genes conforman el *locus* DFNB1, el cual fue el primero identificado para las hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva. Fue descrito por primera vez en 1994 y las primeras mutaciones fueron reportadas en 1997. Estas mutaciones se asocian a sordera congénita, generalmente no progresiva, neurosensorial, moderada a profunda que tiende a afectar todas las frecuencias<sup>4</sup>.

## 2.1 Antecedentes

La gran prevalencia que ha mostrado, y la existencia de una mutación recurrente han hecho muy frecuente el análisis molecular del gen *GJB2* en varios tipos de población. Hasta la fecha, se han descrito más de un centenar de mutaciones patogénicas en el exón 2 del gen *GJB2*. La lista incluye mutaciones que generan codones de paro, sustituciones de aminoácidos, pequeñas deleciones, duplicaciones o inserciones<sup>5</sup>. Además, se ha descrito una mutación en el sitio donador de splicing del intrón 1 (IVS1+1G>A) y otra mutación en la región promotora (g.- 77C>T)<sup>7</sup>.

La mutación de mayor prevalencia a nivel mundial es la 35delG, siendo portadores hasta el 3% de la población caucásica<sup>5</sup>. Sin embargo, es posible apreciar diferencias poblacionales en la frecuencia de la misma, así como en el porcentaje de pacientes con sordera atribuida a mutaciones en el gen *GJB2*, la cual también varía en las diferentes poblaciones dependiendo del tipo de paciente con sordera que se esté estudiando<sup>4</sup>. La homocigocidad de esta mutación usualmente causa sordera neurosensorial prelingual severa a profunda<sup>1</sup>.

En diversos estudios se ha observado que diferentes mutaciones patogénicas en el gen *GJB2* presentan una frecuencia alta en poblaciones específicas, por ejemplo: la mutación c.167delT es muy frecuente en judíos asquenazíes, la p.(Arg143Trp) en africanos de Ghana, las mutaciones c.235delC y p.(Val37Ile) en poblaciones del Asia Oriental, p.(Trp24\*) en India y Pakistán, y en República Checa, Hungría, Turquía y

Mongolia es frecuente la mutación IVS1+1G>A. Asimismo, la mutación c.35delG se identificó en aproximadamente el 70% de los alelos mutados en poblaciones de origen europeo-mediterráneo<sup>4</sup>.

En América se han realizado estudios en pacientes de Estados Unidos, Brasil, Venezuela, Colombia y Cuba, y hasta el año 2012 no existían reportes en la literatura de lo que ocurre en nuestra población<sup>10-14</sup>.

En general, las mutaciones puntuales halladas en el gen *GJB6* están asociadas con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómico dominante, en cambio, dos grandes deleciones: del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*- D13S1854) son las que han sido vinculadas con sordera no sindrómica autosómica recesiva, y en algunas poblaciones hasta el 50% de éstas sorderas se presentan en estado de heterocigoto compuesto con mutaciones en *GJB2*<sup>6</sup>. Así mismo, aproximadamente el 2% de los individuos con este tipo de sordera tiene una mutación en *GJB2* y una deleción larga que abarque ambos genes, incluyendo secuencias río arriba de *GJB2* y una porción de *GJB6*. Al igual que el gen *GJB2*, hasta el año 2012 no existían estudios acerca de la presencia de estas mutaciones en la población mexicana<sup>13</sup>.

En varios de estos análisis se ha tratado de comprobar la correlación genotipo-fenotipo, y se ha reportado que el porcentaje de sordera en pacientes con DFNB1 varía del 1 al 100% dependiendo del tipo de mutación. Por ejemplo, en heterocigotos compuestos con un alelo c.35delG y el otro con alguna otra mutación en *GJB2*, se observó sordera de severa a profunda solo en el 60% de las personas afectadas, y un

porcentaje mayor de afectados con mutaciones que dan como resultado una proteína trunca, aunque sea de manera heterocigota compuesta con mutaciones de sentido erróneo<sup>15</sup>.

## **2.2 Justificación**

El presente estudio se plantea por la necesidad de generar datos propios de nuestra población, así como conocer la etiología de la sordera neurosensorial congénita en afectados que no tienen una causa conocida, lo que finalmente permitiría dar a estos pacientes un asesoramiento adecuado. En un estudio realizado en escolares de la Ciudad de México se identificó que un 20% de los pacientes con sordera muestran datos claros de origen adquirido de sordera, existen antecedentes familiares en un 44% y en el restante 36% no fue posible establecer la etiología, de tal manera que se puede estimar que en nuestra población se beneficiarían con los estudios genéticos el 70% de los niños sordos en cinco áreas principales: prevención, diagnóstico, pronóstico, tratamiento y asesoramiento genético con riesgo de recurrencia<sup>16</sup>.

Dentro de los beneficios para la familia podemos incluir la posibilidad de detectar portadores que son asintomáticos, y, adicional al beneficio para el paciente y sus familias, debemos tener en mente la importancia de los estudios genéticos para avanzar en el entendimiento de la hipoacusia heredada y en un futuro con un conocimiento más profundo poder desarrollar terapias moleculares específicas<sup>5</sup>.

## **CAPITULO III**

### **3. OBJETIVO**

Identificar las mutaciones más frecuentes de los genes *GJB2* y *GJB6* en pacientes de una población del noreste de México con sordera neurosensorial no sindrómica

## CAPITULO IV

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.1 Tipo de estudio:

- Observacional
- Transversal
- Descriptivo
- Muestreo: no probabilístico por conveniencia

#### 4.2 Población de estudio

##### Criterios de inclusión

- 1) Pacientes con algún tipo de sordera prelingual neurosensorial no sindrómica
- 2) Pacientes de cualquier edad y cualquier género que cumplan con el criterio anterior

##### Criterios de exclusión

- 1) Exposición a agentes infecciosos (rubeóla, toxoplasmosis, herpes) *in utero*
- 2) Infección postnatal (meningitis bacteriana)

- 3) Exposición a medicamentos ototóxicos
- 4) Sordera sindrómica

#### **Criterios de eliminación**

- 1) Falta de datos clínicos
- 2) Muestra insuficiente

### **4.3 Descripción del diseño**

En el periodo de Diciembre 2012 a Septiembre 2013 se reclutaron 79 individuos con hipoacusia congénita sin evidencia de características sindrómicas que fueron referidos del departamento de otorrinolaringología al servicio de genética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La población de la muestra perteneciente geográficamente al noreste de México. Los sujetos participantes fueron evaluados incluyendo historia clínica, examen físico y audiometría realizados referentes a excluir las causas conocidas de la pérdida de audición en las personas afectas de cada familia. Finalmente se incluyeron 78 pacientes que cumplieron con los criterios. Previa firma de consentimiento informado se tomaron 5ml de sangre periférica en un tubo con anticoagulante EDTA. Posteriormente, por medio del kit de QIAGEN - QIAamp DNA Mini se extrajo el ADN, según las instrucciones del fabricante, el cual se cuantifico por medio del Nanodrop-1000. Una vez realizada la cuantificación, se realizaron las

diluciones de todas las muestras extraídas para dejarlas a una concentración de 50 ng/ul, óptimas para la reacción de PCR.

- **Reacción en cadena de la polimerasa y Secuenciación**

La amplificación por PCR de la región codificante del gen *GJB2* se realizó en un volumen de 15.3 µl (TABLA 1) en un termociclador Veriti® 96-well (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo ciertos parámetros (TABLA 2). Los primers utilizados para esta reacción fueron: Fwd *GJB2* 5'-ACATTTTGCTGCCGGTCATCTCCCTGTTCTGTCCTA-3' y Rvs *GJB2* 5'-GTCCTTTGTCGATACTGGAATCTAACAACTGGGCAATG-3'

TABLA 1

Reactivos de PCR para secuenciación

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para una reacción (1X)
<b>H2O MQ</b>	-----	-----	7.6 µL
<b>Buffer Colorless gotaq flexi</b>	5 X	1 X	3 µL
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1.5 mM	0.9 µL
<b>DNTP's</b>	10 mM	0.2 mM	0.3 µL
<b>Forward-GJB2</b>	10 pmol	0.66 pmol	1 µL
<b>Reverse-GJB2</b>	10 pmol	0.66 pmol	1 µL
<b>DNA</b>	----	25 ng	1 µL
<b>Gotaq hot star polimerasa</b>	5 u/ µl	1 u/ µl	0.2 µL
<b>HiDi™ formamida</b>	100%	2%	0.3 µL
<b>Volumen final</b>			<b>15.3 µL</b>

TABLA 2

Parámetros de PCR para secuenciación

	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 minutos
2	95°C	30 segundos
3	60°C	40 segundos
4	72°C	50 segundos
5	Repetir del paso 2 al 4 por 30 ciclos	
6	72°C	2 minutos

La secuenciación directa de los productos de PCR se realizó utilizando el kit de secuenciación versión 3.1 de BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los Productos de secuencia se corrieron en un analizador de ADN ABI 3130 y se analizaron usando el software Geneious versión 4.1. Las Variantes detectadas fueron verificadas en dos bases de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y Ensemble (<http://www.ensembl.org>).

- **Análisis por PCR-RFLP de la mutación IVS1+1G>A**

La detección de la mutación IVS1+1G>A del gen *GJB2* se realizó mediante PCR-RFLP. De manera general. A todos los pacientes afectados se les realizó una reacción de PCR en un volumen de 15 µl (TABLA 3) en un termociclador Veriti® 96-well bajo ciertas condiciones (TABLA 4). Después de la amplificación, se digirieron 100 ng de los productos de PCR

con 1 U de endonucleasa de restricción HphI (New England BioLabs, Ipswich, MA) y tampón al 1X de CutSmart™ en un volumen total de 20 µl.

Los primers utilizados fueron: Fwd IVS1+1G>A 5'-GGGCTCAAAGGAACTAGGAGAT-3' y Rvs IVS1+1G>A 5'-ACATCGGCGACACCACAA-3'

TABLA 3

Reactivos de PCR para RFLP

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para una reacción (1X)
H2O MQ	----	----	7.96 µL
Buffer Colorless gotaq flexi	5 X	1 X	3 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0.9 mM	0.54 µL
DNTP's	10 mM	0.2 mM	0.3 µL
Forward-IVS1+1G>A	10 pmol	0.66 pmol	1 µL
Reverse-IVS1+1G>A	10 pmol	0.66 pmol	1 µL
ADN	----	25 ng	1 µL
Gotaq hot star polimerasa	5 u/ µl	1 u/ µl	0.2 µL
HiDi™ formamida	100%	2%	0.3 µL
<b>Volumen final</b>			<b>15.3 µL</b>

TABLA 4

Parámetros de PCR para RFLP

	<b>Temperatura</b>	<b>tiempo</b>
<b>1</b>	95°C	4 minutos
<b>2</b>	95°C	315 segundos
<b>3</b>	62°C	50 segundos
<b>4</b>	72°C	40 segundos
<b>5</b>	Repetir del paso 2 al 4 por 35 ciclos	
<b>6</b>	72°C	2 minutos

Las condiciones de digestión eran 8 hr a 37°C con 20 min para la inactivación de la enzima a 65°C. Los productos de restricción se analizaron mediante separación electroforética en geles de agarosa al 2% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y tampón al 1x de Tris/Acetato/EDTA, seguido por visualización directa sobre un sistemas de documentación Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) después de la tinción con GelRed (Biotium, Hayward, CA). El producto de PCR de 684 pb se corta en dos fragmentos de 385 y 299 pb en el alelo G y no corta en el alelo A.

- **Tamizaje mediante qPCR para deleciones en *GJB6***

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en un termociclador StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando Maxima SYBR Green/Rox master mix (2×) (Fermentas, Canadá). Todos los ensayos de qPCR se realizaron por triplicado para cada muestra. Cada 15 µl de reacción

comprendía de 25 ng de ADN genómico, 1x de buffer de reacción, 0.66 pmol de cada cebador (TABLA 5). Las condiciones de la PCR consistieron en una incubación inicial de 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, alineamiento a 60°C por 10 segundos y extensión a 72°C por 50 segundos. Después de la amplificación por PCR se generó una curva de fusión para comprobar la especificidad de la reacción, en un rango de 50°C a 95°C, el incremento de temperatura fue de 1°C por cada 5 segundos. La línea base y el ciclo de cuantificación fueron determinados automáticamente con el software StepOne v2.0. Para la comparación directa de los valores Ct obtenidos entre los genes diana y referencia se utilizó el método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ).

TABLA 5

Cebadores en el gen *GJB6*

IL4-CTL-Fdw	CACGGACACAAGTGCGATA
IL4-CTL-Rvs	AGAGATGGTGCCAGATAGGT
GJB6-Ex6-Fdw	TGAATGTAGACGGAACAGTGT
GJB6-Ex6-Rvs	TGAGGCAATCACATCCACAT
GJB6-Ex3-Fdw	TCTGGCTAAACAATTTCTGTATGG
GJB6-Ex3-Rvs	GCTCACAGCACCTGGAATA
GJB6-ups-Fdw	CAATAGCGTGGACGACAGTA
GJB6-ups-Rvs	GTCTTCTTCACCGACAGGAA

## CAPITULO V

### 5. RESULTADOS

De los 79 pacientes reclutados con sordera severa a profunda prelingual no sindrómica de causa desconocida solo se incluyeron 78 pacientes que cumplieron con los criterios. Esto porque una de las muestras tuvo una cantidad insuficiente de DNA.

En 39 de los 78 probandos se encontraron ocho variantes en *GJB2*, las cuales ya habían sido descritas previamente. Una de estas variantes se presento en 26 pacientes de forma monoalélica, esta corresponde a un polimorfismo ya descrito como no patogénico (TABLA 6).

Sólo dos individuos presentaron mutaciones en estado homocigoto, uno de los cuales tuvo la mutación c.35delG en ambos alelos. Sólo un probando tuvo mutaciones en ambos alelos en estado heterocigoto compuesto. Los 9 pacientes restantes mostraron mutaciones en sólo un alelo, dentro de este grupo de mutaciones monoalélicas 5 pacientes tuvieron la mutación c.35delG (TABLAS 7 y 8).

TABLA 6  
Resultados

<b>Cambio nucleotídico</b>	<b>Cambio de aminoácido</b>	<b>Número de variantes</b>	<b>Tipo de mutación</b>
c.79G>A	p.(Val27Ile)	26	missense
c.35delG	<i>p.(Iy12Valfs)</i>	6	frameshift
c.645delTAGA	<i>p.(Ile214Ilefs)</i>	2	frameshift
c.35G>A	p.(Gly12Asp)	1	missense
c.35G>T	p.(Gly12Val)	1	missense
c.427C>T	p.(Arg143Trp)	1	missense
c.101T>C	p.(Met34Thr)	1	missense
c.34G>T	p.(Gly12Cys)	1	missense

TABLA 7  
Variantes Patogénicas

No. de Caso	cDNA		Proteína	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
1. (13)	c.35delG		p.(Gly12Valfs)	
2. (16)	c.427C>T		p.(Arg143Trp)	
3. (17)	c.34G>T		p.(Gly12Cys)	
4. (21)	c.35delG		p.(Gly12Valfs)	
5. (26)	c.35delG	c.645delTAGA	p.(Gly12Valfs)	p.(Ile214Ilefs)
6. (37)	c.35delG		p.(Gly12Valfs)	
7. (40)	c.645delTAGA		p.(Ile214Ilefs)	
8. (51)	c.35G>T	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.(Gly12Val)
9. (62)	c.101T>C		p.(Met34Thr)	
10. (72)	c.35delG	c.35delG	p.(Gly12Valfs)	p.(Gly12Valfs)
11. (77)	c.35G>A		p.(Gly12Asp)	
12. (78)	c.35delG		p.(Gly12Valfs)	

TABLA 8

Genotipo y Fenotipo de los pacientes que presentaron mutaciones

No. De Caso	Genotipo		Fenotipo
	Alelo 1	Alelo 2	
1. (13)	c.35delG		Hipoacusia bilateral profunda
2. (16)	c.427C>T		Hipoacusia bilateral profunda
3. (17)	c.34G>T		Hipoacusia bilateral profunda
4. (21)	c.35delG		Hipoacusia bilateral profunda
5. (26)	c.35delG	c.645delTAGA	Hipoacusia bilateral profunda
6. (37)	c.35delG		Hipoacusia bilateral profunda
7. (40)	c.645delTAGA		Hipoacusia bilateral profunda
8. (51)	c.35G>T	c.35G>T	Hipoacusia bilateral profunda
9. (62)	c.101T>C		Hipoacusia bilateral profunda
10. (72)	c.35delG	c.35delG	Hipoacusia bilateral profunda
11. (77 )	c.35G>A		Hipoacusia bilateral profunda
12. (78)	c.35delG		Hipoacusia bilateral profunda

En ningún paciente se encontraron deleciones en *GJB6*, ni se encontró la mutación IVS1+1G>A en *GJB2*.

Todos los padres, excepto uno, de los pacientes que tuvieron mutaciones son originarios del noreste de México (TABLA 9).

TABLA 9

Origen de los padres de los pacientes que presentaron mutaciones

No. De Caso	Genotipo		Origen de los padres	
	Alelo 1	Alelo 2	Padre	Madre
1. (13)	c.35delG		Monterrey	Monterrey
3. (17)	c.34G>T		México DF	Monterrey
4. (21)	c.35delG		San Luis Potosí	Monterrey
5. (26)	c.35delG	c.645delTAGA	Coahuila	Tamaulipas
6. (37)	c.35delG		Monterrey	Monterrey
7. (40)	c.645delTAGA		San Luis Potosí	San Luis Potosí
8. (51)	c.35G>T	c.35G>T	Coahuila	Coahuila
9. (62)	c.101T>C		Monterrey	Monterrey
10. (72)	c.35delG	c.35delG	Monterrey	Monterrey
11. (77)	c.35G>A		Monterrey	Monterrey
12. (78)	c.35delG		Monterrey	Monterrey

## CAPITULO VI

### 6. DISCUSIÓN

Las variantes en el *locus* DFNB1, el cual contiene a los genes *GJB2* y *GJB6*, se han encontrado hasta en el 50% de los casos en varias poblaciones, lo cual lo hace la causa más común de sordera prelingual no sindrómica<sup>17</sup>. En este estudio, se buscaron mutaciones en toda la región codificante de *GJB2*, y también se busco la mutación IVS1+1G>A (la cual se encuentra en un sitio de splicing) en una población del norte de México con sordera prelingual no sindrómica.

De las 8 variantes encontradas en 38 casos, el 66% correspondió al polimorfismo c.79G>A, y el 33% a mutaciones previamente descritas como patogénicas.

El polimorfismo c.79G>A, encontrado en el 66% de la población que presento alguna variante, también se detecto recientemente en una población del centro de México y previamente reportada en poblaciones de Asia y América del Sur. Se cree que esta variante puede tener un origen asiático<sup>13</sup>.

Las variantes patogénicas se identificaron en *GJB2* en doce pacientes no relacionados de manera familiar.

Aunque en nuestra población la mutación más frecuente fue la c.35delG, sólo un paciente presentó la mutación en estado homocigoto, otro la presentó en estado heterocigoto compuesto y en cuatro más se observó en estado heterocigoto. Estos resultados no concuerdan con lo reportado a lo largo de los años en la literatura, en donde la frecuencia de homocigotos debería ser mayor para poder considerar esta mutación como la etiología de la sordera, sin embargo, en los casos donde se presentó esta mutación en estado heterocigoto no se puede descartar una herencia autosómica dominante con mutación *de novo* en el probando<sup>5</sup>. Además, la frecuencia que se obtuvo en este estudio de la mutación c.35delG es menor (7.5%) que lo observado en estudios previos en población caucásica y de América Latina, pero similar a lo observado en el estudio realizado con población del centro de México<sup>13</sup>.

La segunda mutación más común en el presente estudio fue la c.645delTAGA, la cual es una variante rara, previamente descrita como patológica en población Hispana y China en estado heterocigoto compuesto<sup>10</sup>. En nuestro análisis fue identificada en dos pacientes, en un paciente se observó en estado heterocigoto compuesto junto con la mutación c.35delG, y en el otro paciente sólo se presentó en un alelo, es decir, de manera heterocigota.

La mutación de sentido erróneo c.35G>T fue una de las dos que se encontraron en estado homocigoto. Esta fue observada sólo en un paciente, y ha sido descrita como patogénica porque no permite la maduración completa de la proteína<sup>18</sup>.

El resto de las mutaciones se presentaron sólo de manera heterocigota, todas fueron de sentido erróneo, y ya habían sido reportadas previamente como patogénicas. En este estudio cada una fue identificada solamente en un paciente.

Acerca de la mutación c.35G>A no se encontraron reportes escritos, sin embargo existe evidencia de que es patogénica en una base de datos de mutaciones de sordera (<http://deafnessvariationdatabase.org/letter/g>)<sup>19</sup>. El hecho de haberla encontrado en un paciente apoya que es patogénica, aunque en este caso fue encontrada en estado heterocigoto.

En sordera autosómica recesiva, las mutaciones c.427C>T y c.101T>C, se han reportado generalmente en estado heterocigoto compuesto<sup>20</sup>. Siendo la mutación c.427C>T responsable de una proporción de sordera no sindrómica en poblaciones de Europa, América, África y Asia junto con las siguientes mutaciones: c.35delG, c.167delT, c.235delC y c.427C>T en el gen *GJB2*<sup>21</sup>.

La variante c.101T>C ha sido relacionada con hipoacusia autosómica dominante y autosómica recesiva. Sin embargo, la alta prevalencia de esta variante en la población caucásica (tasa de portador 1/37–1/43), y la poca

presentación en pacientes con sordera profunda, sugieren un rol de alelo hipomórfico recesivo (que no inactiva completamente la proteína) más que una mutación responsable de sordera severa-profunda<sup>4</sup>. Entonces, si se presenta en estado homocigoto o con otra mutación patogénica en un paciente con sordera leve, puede que sea la variante causal, pero si la sordera es profunda, como en el caso de nuestro paciente, se deben considerar otras variantes como la causa.

La mutación c.34G>T fue descrita como patogénica desde 2004<sup>10</sup>. Recientemente se encontró en población del centro de México de manera heterocigota<sup>13</sup>.

En la mayor parte de los pacientes con sordera de causa genética el patrón de herencia es autosómico recesivo (80%)<sup>5</sup>, en estos casos lo que se espera es que los afectados tengan una hipoacusia congénita, de moderada a profunda y no progresiva, lo cual fue observado en todos los individuos que presentaron mutaciones en este estudio.

En los 9 pacientes que tuvieron mutaciones de manera heterocigota, por el momento no se puede explicar una herencia autosómica recesiva como la etiología, pero pudiera ser explicada por heterogeneidad de *locus* o mutaciones en regiones no analizadas lo que nos daría un genotipo de heterocigoto compuesto. Difícilmente se podría explicar por un tipo de herencia autosómico dominante, esto porque generalmente esa forma de hipoacusia tiene un fenotipo que no es prelingual y es progresiva, además

los padres estudiados de los pacientes con mutaciones en estado heterocigoto no presentaban el mismo fenotipo, aunque no se descarta el fenómeno de penetrancia incompleta<sup>22</sup>.

Llama la atención la gran similitud de los resultados obtenidos entre el estudio realizado con población del centro de México y nuestro estudio con población del noreste de México. Esto puede explicarse si la ascendencia proviniera de alguna parte del centro del país, no obstante, en nuestro estudio sólo fue el caso de un paciente .

Aunque actualmente se considera necesario, como parte del abordaje diagnóstico en sordera prelingual no sindrómica , analizar las regiones del sitio de splicing en el intrón 1 del gen *GJB2*, en ninguno de nuestros pacientes se encontró la mutación IVS1+1G>A<sup>4</sup>. Así mismo, tampoco se encontraron deleciones en *GJB6*, las cuales son comunes en algunas poblaciones pero muy raras en otras, como lo ya reportado previamente en el estudio de Arenas-Sordo (2012) y en algunas poblaciones de Asia y África en donde tampoco se encontraron deleciones en este gen<sup>4,13</sup>.

## CAPITULO VII

### 7. CONCLUSIÓN

Se realizo el diagnóstico etiológico en el 16.5% (alelos patológicos *GJB2*) de los casos estudiados en esta población con sordera prelingual no sindrómica. Sin embargo, ya que la hipoacusia tiene una gran heterogeneidad genética, estos resultados no excluyen otras causas genéticas de sordera en estos pacientes.

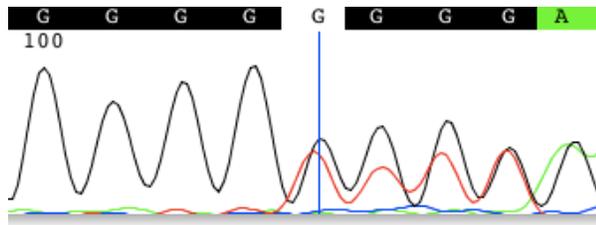
Aunque el tamaño de la muestra fue pequeño en este estudio, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en el análisis que se realizo previamente en población del centro de México.

Los datos sugieren que las mutaciones en el gen *GJB2* son una causa rara de sordera no sindrómica en la población del noreste de México. Esto comprueba la gran heterogeneidad genética de esta condición, apoyando la necesidad de una investigación más extensa en nuestra población.

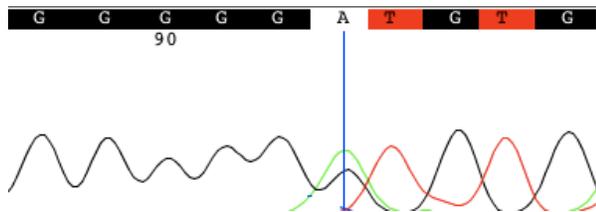
## CAPITULO VIII

### 8. ANEXOS

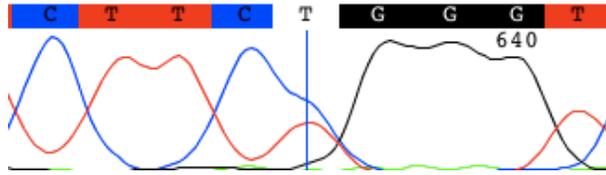
#### 8.1 Ejemplos de electroferogramas para cada una de las mutaciones



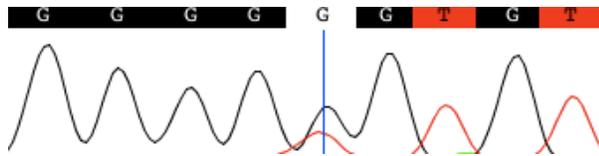
Mutación c.35delG  
Pertenece al caso #37



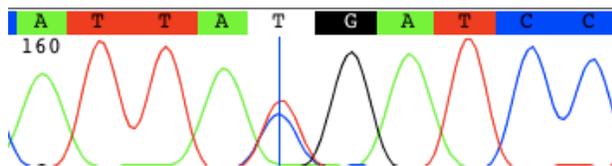
Mutación c.35G>A  
Pertenece al caso #77



Mutación c.427C>T  
Pertenece al caso #16

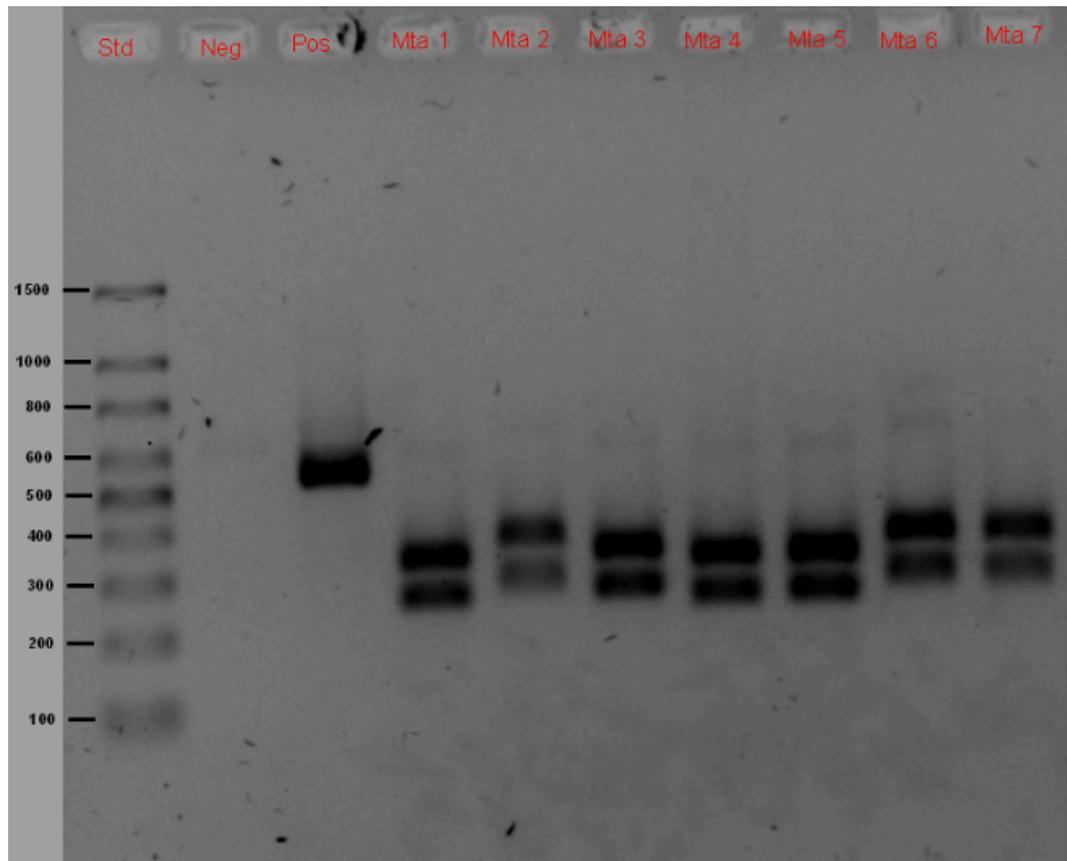


Mutación c.34G>T  
Pertenece al caso #17

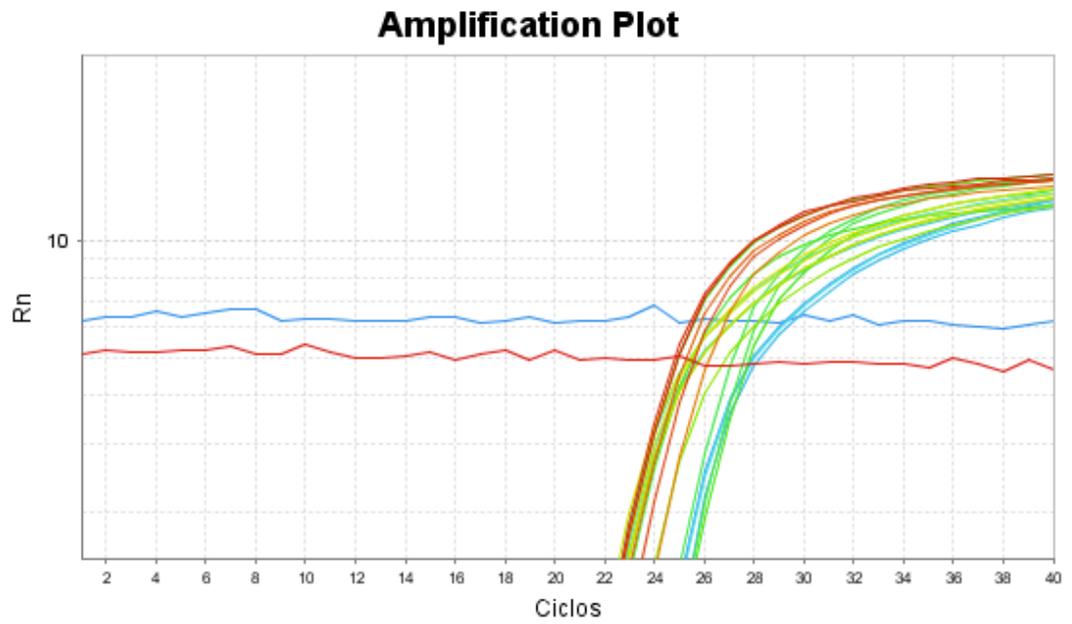
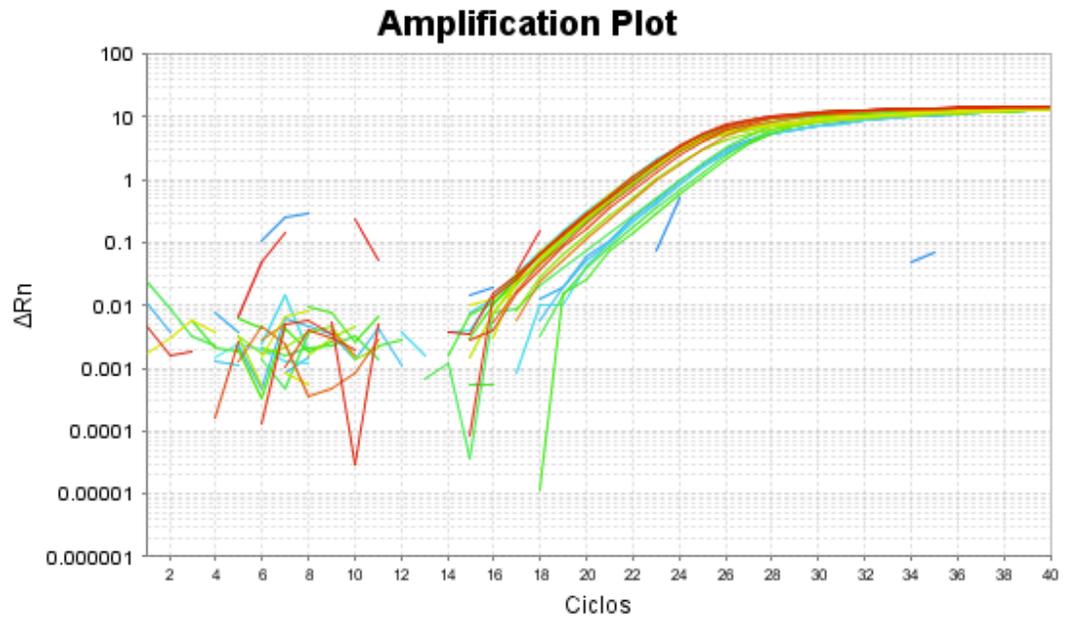


Mutación c.101T>C  
Pertenece al caso #62

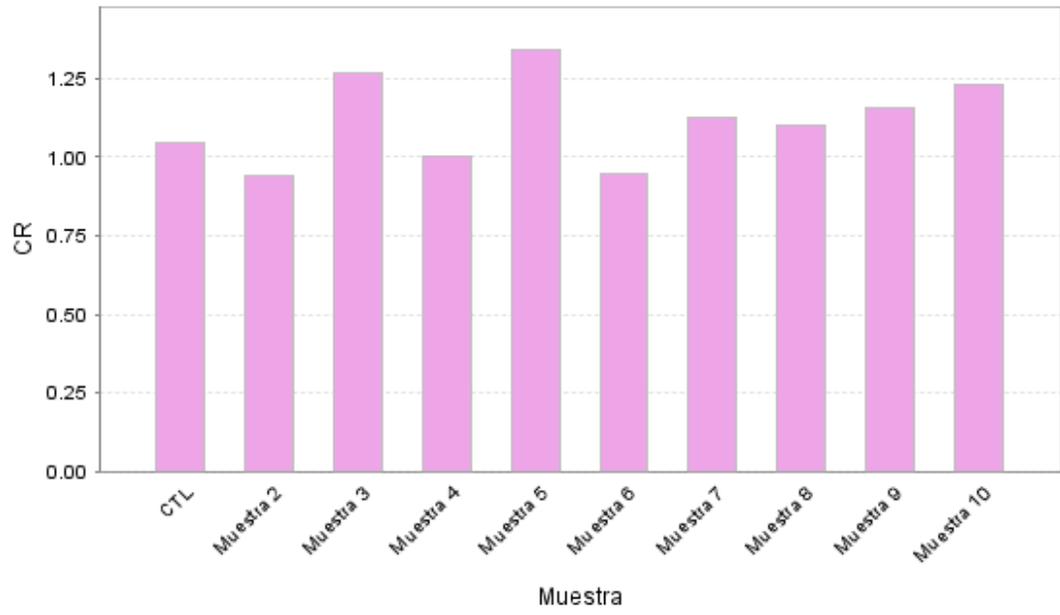
## 8.2 PCR-RFLP para detección de la mutación IVS1+1G>A



### 8.3 qPCR cuantificación del gen *GJB6*



**CR vs Muestra**



## 8.4 Genes que causan sordera no sindrómica autosómico recesiva

Locus	Gen	Tipo
DFNB1	<i>GJB2</i>	Estable
	<i>GJB6</i>	
DFNB2	<i>MYO7A</i>	No especificada
DFNB3	<i>MYO15</i>	Severa a profunda, estable
DFNB4	<i>SLC26A4</i>	Estable, progresiva
DFNB6	<i>TMIE</i>	Severa a profunda, estable
DFNB7/11	<i>TMC1</i>	
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>	Progresiva, estable
DFNB9	<i>OTOF</i>	Severa a profunda, estable
DFNB12	<i>CDH23</i>	Severa a profunda, estable
DFNB16	<i>STRC</i>	Severa a profunda, estable
DFNB18	<i>USH1C</i>	Severa a profunda, estable
DFNB21	<i>TECTA</i>	Severa a profunda, estable
DFNB22	<i>OTOA</i>	Severa a profunda, estable
DFNB23	<i>PCDH15</i>	Severa a profunda, estable
DFNB24	<i>RDX</i>	Severa a profunda, estable
DFNB25	<i>GRXCR1</i>	Moderada a profunda, progresiva
DFNB28	<i>TRIOBP</i>	Severa a profunda, estable
DFNB29	<i>CLDN14</i>	Severa a profunda, estable
DFNB30	<i>MYO3A</i>	Severa a profunda, estable
DFNB31	<i>DFNB31</i>	
DFNB32/82	<i>GPSM2</i>	Severa a profunda, estable
DFNB35	<i>ESRRB</i>	Severa a profunda
DFNB36	<i>ESPN</i>	
DFNB37	<i>MYO6</i>	
DFNB39	<i>HGF</i>	Severa a profunda
DFNB49	<i>MARVELD2</i>	Moderada a profunda, estable
DFNB53	<i>COL11A2</i>	Severa a profunda, estable
DFNB59	<i>PJVK</i>	Severa a profunda, estable
DFNB61	<i>SLC26A5</i>	Severa a profunda, estable
DFNB63	<i>LRTOMT</i>	Severa a profunda, estable
DFNB67	<i>LHFPL5</i>	Severa a profunda, estable
DFNB73	<i>BSND</i>	Severa a profunda, estable
DFNB76	<i>SYNE4</i>	Altas frecuencias, progresiva
DFNB77	<i>LOXHD1</i>	Moderada a profunda, progresiva
DFNB79	<i>TPRN</i>	Severa a profunda, estable
DFNB84	<i>PTPRQ</i>	Moderada a profunda, progresiva

Van Camp & Smith (2010)

## 8.5. Cartas de consentimiento informado

### CONSENTIMIENTO PARA SER UNA SUJETO EN LA INVESTIGACIÓN

*Este documento se presenta de conformidad con el artículo 100 Sección IV de la Ley General de Salud en vigor con la última modificación del mismo, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de junio del 2005. El consentimiento informado por escrito debe ser obtenido de la sujeto en quien se llevará a cabo la investigación, o de su representante legal en el caso de incapacidad legal de la sujeto, una vez que hayan sido informados de los objetivos de la investigación y de las posibles consecuencias positivas o negativas que podría tener para su salud.*

*Esta forma de consentimiento describe el estudio de investigación y su papel como participante. Por favor lea este formulario cuidadosamente. No dude en hacer cualquier pregunta con respecto a la información proporcionada. Esto debería estimular sus preguntas. Su médico, enfermera, o una persona del equipo le describirá el estudio y responderá a sus preguntas.*

---

#### 1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

**“Mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica”**

*Se le pide participar en un estudio de investigación. Antes de dar su consentimiento para ser voluntario, es importante que lea la siguiente información y hacer tantas preguntas como sea necesario para asegurarse de que entiende lo que se le pide que haga.*

#### 2.- LOS INVESTIGADORES

Los responsables de este estudio son: Dra. Aideé Alejandra Hernández Juárez médico residente de 2º año de la especialidad en Genética Médica e investigador principal, como director de tesis: Dra. Dolores Hernández Almaguer Profesor del Departamento de Genética, los co-Directores: M.C. Michelle Zamudio Osuna Profesor del departamento de Genética, QFB José Lugo Trampe Profesor del departamento de genética, Dr. Ricardo Cerda Flores Profesor-Investigador de la Facultad de Enfermería y Dra. Med Laura Martínez de Villareal Jefe del Departamento de Genética. El departamento de Genética se localiza en el 4to piso del Centro Universitario contra el Cáncer y se puede comunicar a los teléfonos (81) 83 48 3 7 04, (81) 81 23 16 98 de lunes a viernes en horarios de 8:00 a 19:00 hrs.

### **3.- INTRODUCCIÓN**

La hipoacusia es un término que describe la pérdida completa o parcial de la audición, de manera que se disminuye la capacidad de discriminar los sonidos por lo que el nivel de severidad va de leve, moderado, severo a profundo. Se considera que 50% de las hipoacusias se deben a secuelas de factores ambientales, el 50% restante son causas de origen genético, con más de 400 genes involucrados y varios mecanismos de herencia. El 30% de los casos manifiestan algún síndrome ya descrito, mientras que el 70% restante son casos con sordera como única manifestación. La hipoacusia no-sindrómica neurosensorial autosómica recesiva es la forma más común de sordera congénita, y generalmente se da como consecuencia de mutaciones en el gen GJB2 (Gap junction protein, Beta-2), y en algunos grupos poblacionales alcanza hasta del 50% de los casos de sordera de origen genético. La sordera congénita neurosensorial puede deberse a distintos modos de herencia, esto implica diferente tipo de asesoramiento genético. El presente estudio se plantea para conocer la etiología de la sordera neurosensorial congénita en pacientes sin una causa ambiental y no sindrómica conocida con la finalidad de dar el asesoramiento adecuado.

### **4.- OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN**

Este estudio tiene como objetivo Determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* asociados a sordera por medio de la técnica de secuenciación.

### **5.- PROCEDIMIENTOS**

Si usted se ofrece como voluntario para participar en este estudio, se le pedirá que asista al departamento de Genética del Hospital Universitario para completar el árbol genealógico, somatometría y exploración física correspondiente a una historia clínica completa.

El mismo día de la entrevista se le realizará una toma de sangre periférica venosa.

Su participación tendrá una duración aproximada de 1 hora con 30 minutos; que es el tiempo estimado de la consulta y evaluación; la obtención de la muestra toma aproximadamente 15 minutos.

### **6.- ENTRE LOS POSIBLES RIESGOS O MOLESTIAS**

Durante la toma de sangre periférica, puede existir cierta molestia al momento de la punción; sin embargo dicha molestia es momentánea y pasajera, también pudiera presentarse un hematoma en el sitio de

punción; la realización de la toma será efectuada por una técnica en enfermería debidamente capacitada y no pone en peligro su salud.

## **7.- LOS BENEFICIOS POTENCIALES DE LA INVESTIGACIÓN/JUSTIFICACION**

En México se desconoce la incidencia de mutaciones en los genes más importantes (GJB2 y GJB6) de causa de sordera neurosensorial no sindrómica.

Conocer la etiología de la sordera neurosensorial congénita en pacientes sin una causa ambiental y no sindrómica conocida con la finalidad de brindar el asesoramiento adecuado.

## **8.- CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO DE DATOS**

Los resultados de estas pruebas únicamente se compartirán con la Dra. Aideé Hernández Juárez quien es la investigadora principal, la directora de tesis: Dra. Dolores Hernández Almaguer y los co-Directores: M.C. Michelle Zamudio Osuna, QFB José Lugo Trampe, Dr. Ricardo Cerda Flores y Dra. Med Laura Martínez de Villareal.

A cada muestra se le asignará un número de folio el cual permitirá su identificación para el resto del personal de laboratorio, impidiendo su acceso a la identidad de dicha muestra la cuál únicamente conocerán los autores de este estudio, la información se almacenará en una base de datos de uso exclusivo del grupo de trabajo y los resultados obtenidos tienen como finalidad publicarse en una tesis y en un artículo de publicación médica y en ningún momento la identidad de los participantes será revelada.

La toma de fotografías clínicas con el fin de documentar las características fenotípicas de las participantes serán totalmente voluntarias y no es un requisito para la participación de este estudio por lo cual se solicita que agregue sus iniciales en las siguiente línea\_\_\_\_\_ en caso de autorizar la toma de las fotografías, las cuales pueden ser usadas en publicaciones médicas donde la identidad del paciente no será revelada por los autores.

\_\_\_\_\_ aceptó que el ADN obtenido será almacenado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José E. González” de la U.A.N.L. y podrá ser empleado con motivos de investigación o educación. La solicitud de estudios adicionales deben ser realizadas por los responsables de este estudio. Entiendo que tengo el derecho de revocar

este consentimiento en cualquier momento. En caso de no aceptar que se utilice el ADN extraído con motivos de investigación en otro estudio de forma anónima, este será eliminado al concluirse este estudio.

## **9.- PARTICIPACIÓN EN EL RETIRO**

Su participación en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para retirarse del estudio por favor contacte a la Dra. Aideé Hernández Juárez en el departamento de Genética y se puede comunicar a los tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 en cualquier horario.

## **10.- LAS PREGUNTAS SOBRE LA INVESTIGACIÓN**

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor hable con la Dra. Aideé Hernández Juárez en el departamento de Genética y se puede comunicar a los tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 en cualquier horario.

## **11.- EN EL CASO DE LESIÓN**

Es poco probable que la participación en este proyecto dará como resultado un daño a los participantes.

## **12.- COSTOS:**

No habrá ningún cargo para el participante por ninguna de las pruebas requeridas y procedimientos realizados en este estudio.

## **13.- INCENTIVOS PARA PARTICIPAR**

No recibirá ninguna compensación monetaria ni en especie por participar en este estudio.

## **14. -LAS RAZONES PARA LA EXCLUSIÓN DE ESTE ESTUDIO**

Se excluirá de este estudio a personas que falten de proporcionar datos clínicos.

*Este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital*

Universitario “Dr. José Eleuterio Gonzalez” de la Universidad de Autónoma de Nuevo León. Si usted cree que hay alguna violación a sus derechos como sujeto de investigación, puede comunicarse con el Presidente del Comité,

Dr. José Gerardo Garza Leal  
Presidente del Comité de Ética  
Teléfono de Contacto: 8329-4050 ext 2870-74

Se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a su satisfacción. Si firma abajo indica que está de acuerdo para participar como voluntario en este estudio de investigación.

## **PARTE 2: FIRMAS QUE DOCUMENTAN EL ACUERDO**

### 16.- ACUERDO

Su consentimiento para participar en la investigación será voluntario e informado. Si usted está de acuerdo en participar y si sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción, usted deberá firmar esta forma. Una vez firmada la forma, usted está de acuerdo en participar en este estudio. En caso de que usted se rehúse a participar, usted podrá retirarse sin pérdida de alguno de sus beneficios médicos.

Una vez que usted haya consentido, usted aún tendrá el derecho de retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica. Para retirarse, lo único que usted deberá hacer es informar a su médico de su decisión.

Se le ha proporcionado una copia de esta forma para quedársela y para que haga referencia a ella cuando sea necesario.

\_\_\_\_\_  
Fecha  
molde

\_\_\_\_\_  
Firma de la Sujeto

\_\_\_\_\_  
Nombre en letra de

\_\_\_\_\_  
Fecha  
en letra de molde

\_\_\_\_\_  
Firma del Primer Testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio

\_\_\_\_\_  
Dirección



## ASENTIMIENTO PARA NIÑOS EN EDAD PRE-ESCOLAR

### “Mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica”

Escrito para el asentimiento verbal

Hoy durante la reunión, voy a revisarte y tomarte una muestra de sangre. Esto me ayudará a entender tu padecimiento. Después de completar el procedimiento voy a darle las gracias. ¿Es esto aceptable?

Encierre

Si

No

#### ***Declaración de los Padres o tutores.***

\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Padre o Tutor*                      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Madre o Tutor*                      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Primer Testigo*                      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
*Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio*                      *Dirección*

\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Segundo Testigo*                      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
*Relación del Segundo Testigo con la Sujeto del Estudio*                      *Dirección*

Declaración de la persona que lleva a cabo la discusión del Asentimiento.

1. He explicado todos los aspectos de la investigación al menor en la medida de su capacidad de entender.
2. He respondido a todas las preguntas del sujeto en relación con esta investigación.

3. El menor acepta participar en la investigación.
4. Creo que la participación del menor es voluntaria.
5. El Médico y el personal del estudio aceptan respetar el disentimiento físico o emocional del sujeto en cualquier momento de la investigación cuando dicho disentimiento sea relativo a algo que se hace únicamente con los fines de esta investigación.

---

*Fecha*

---

*Firma de la persona que lleva  
Acabo el asentimiento.*

---

*Firma*

## ESCRITO PARA EL ASENTIMIENTO PARA MENORES DE 12 AÑOS

### **“Mutaciones en los genes GJB2 y GJB6 en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrónica”**

*Hola, mi nombre es Aideé Alejandra Hernández Juárez y yo soy un investigador de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL, que está tratando de aprender acerca de las causas de sordera.*

*El propósito de este estudio es determinar la frecuencia de mutaciones en los genes GJB2 y GJB6 asociados a sordera.*

*Se te pide a participar en este estudio porque al realizar este estudio podemos conocer el porque de tu padecimiento.*

*Yo seré el responsable de este estudio y se llevará a cabo en el departamento de genética del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.*

*¿En qué vas a participar? Te voy a revisar y posteriormente tomar una muestra de sangre, esto tendrá una duración aproximada de una hora. Durante la toma de sangre puede existir cierta molestia al momento de la punción; sin embargo dicha molestia es momentánea y no pone en peligro tu salud.*

*A fin de mantener todo en privado, tus nombres no serán utilizados en los formularios que obtengamos de ti. Estos serán reemplazados por los números de identificación compuesto A cada muestra se le asignará un número de folio el cual permitirá su identificación para el resto del personal de laboratorio, impidiendo su acceso a la identidad de dicha muestra la cuál únicamente conocerán los autores de este estudio y los resultados obtenidos tienen como finalidad publicarse en una tesis y en ningún momento la identidad de los participantes será revelada.*

*Tus padre (s) han dicho que está bien para ti participar en este estudio de investigación. Tu no tiene que estar en este estudio si no quieres. Puedes cambiar de opinión en cualquier momento antes de decirle a tu mamá, papá o a el Ayudante de Investigador o Investigador.*

*No, no quiero estar en este estudio.*

*Si, quiero estar en este estudio.*



## ESCRITO PARA EL ASENTIMIENTO PARA MENORES DE 12-14 AÑOS

### **“Mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica”**

*Los investigadores de Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León están realizando un estudio de investigación donde estamos tratando de determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* asociados a sordera.*

*El propósito de este estudio es conocer las causas de sordera en pacientes sin una causa ambiental y no sindrómica conocida, por lo que se solicita tu participación para conocer el porque de tu padecimiento.*

*Los responsables de este estudio son: Dra. Aideé Hernández Juárez quien es la investigadora principal, la directora de tesis: Dra. Dolores Hernández Almaguer y los co-Directores: M.C. Michelle Zamudio Osuna, QFB José Lugo Trampe y Dra. Med Laura Martínez de Villareal; los cuales se encuentran en el departamento de Genética y se puede comunicar con ellos a los tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 en cualquier horario.*

El estudio se llevará a cabo en el departamento de Genética del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

En caso de que aceptes participar únicamente te voy a revisar y posteriormente tomar una muestra de sangre periférica Durante la toma de sangre periférica, puede existir cierta molestia al momento de la punción; sin embargo dicha molestia es momentánea y no pone en peligro tu salud.

No se realizaran cuestionarios.

*Su información se mantendrá en privado.*

Sólo el investigador y tu sabrán las respuestas a las preguntas. Las únicas personas autorizadas a saber las respuestas son las personas que trabajan en el proyecto de investigación.

*Tus padre (s) han dicho que está bien para ti participar en este estudio de investigación. Tu no tiene que estar en este estudio si no quieres. Puedes cambiar de opinión en cualquier momento antes de decirle a tu mamá, papá o a el Ayudante de Investigador o Investigador.*



## **ESCRITO PARA EL ASENTIMIENTO PARA MENORES ENTRE 14-18 AÑOS**

### **“Mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica”**

*Se te pide participar en un estudio de investigación. Antes de tu permiso para ser voluntario, es importante que leas la siguiente información y hacer tantas preguntas como sea necesario para asegurarse de que entiendes lo que se le pide que haga.*

*Los investigadores de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL están haciendo un estudio de investigación donde estamos tratando de aprender acerca de la etiología de la sordera en pacientes sin una causa ambiental y no sindrómica conocida*

**PROCEDIMIENTOS.** Se te pedirá contestar algunas preguntas, revisarte y tomarte una muestra de sangre.

**CUESTIONARIOS.** No Aplica.

**GRABACIÓN EN VIDEO.** No Aplica.

**ENTREVISTAS.** Se realizará la historia clínica en un tiempo aproximado de 1 hora.

**POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS.** Durante la toma de sangre periférica, puede existir cierta molestia al momento de la punción; sin embargo dicha molestia es momentánea y pasajera y no pone en peligro tu salud.

### **LOS BENEFICIOS POTENCIALES DE LA INVESTIGACIÓN**

Los beneficios de su participación en la investigación conocer la etiología de la sordera en pacientes sin una causa ambiental y no sindrómica conocida, mediante el análisis de los genes más frecuentemente asociados, para dar un diagnóstico y asesoramiento correctos

### **CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO DE DATOS**

A cada muestra se le asignará un número de folio el cual permitirá su identificación para el resto del personal de laboratorio, impidiendo su acceso a la identidad de dicha muestra la cuál únicamente conocerán los autores de este estudio, la información se almacenará en una base de datos de uso exclusivo del grupo de trabajo y los resultados obtenidos



---

*Relación del Segundo Testigo con la Sujeto del Estudio      Dirección*

Declaración de la persona que lleva a cabo la discusión del Asentimiento.

1. He explicado todos los aspectos de la investigación al menor en la medida de su capacidad de entender.
2. He respondido a todas las preguntas del sujeto en relación con esta investigación.
3. El menor acepta participar en la investigación.
4. Creo que la participación del menor es voluntaria.
5. El Médico y el personal del estudio aceptan respetar el disentimiento físico o emocional del sujeto en cualquier momento de la investigación cuando dicho disentimiento sea relativo a algo que se hace únicamente con los fines de esta investigación.

---

*Fecha      Nombre de la persona que lleva acabo el asentamiento      Firma*

## CAPITULO IX

### 9. BIBLIOGRAFIA

1. Petersen M, Grigoriadou M, Koutroumpe M, Kokotas H. The novel c.247\_249delTTC (p.F83del) *GJB2* mutation in a family with prelingual sensorineural deafness. *Int J Pediatr Otorhi* 2012;76:969–971
2. Poblano A, Arteaga C, García-Sánchez G. Prevalence of early neurodevelopmental disabilities in Mexico: a systematic review. *Arq Neurol Psiquiatr* 2009;67:736-740
3. Bindu-Lingala H, Reddy-Penagaluru P. Role of connexin 26 (*GJB2*) & mitochondrial small ribosomal RNA (mt *12S rRNA*) genes in sporadic & aminoglycoside-induced non syndromic hearing impairment. *Indian J Med Res* 2009;130:369-378
4. Hoefsloot L, Roux A, Bitner-Glindzicz M. EMQN Best Practice guidelines for diagnostic testing of mutations causing non-syndromic hearing impairment at the *DFNB1* locus. *Eur J Hum Genet* 2013;21:1325–1329
5. Cabanillas-Farpón R, Cadiñanos-Bañales J. Hipoacusias hereditarias: asesoramiento genético. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2012;63:218-29

6. Rodriguez-Paris J, Tamayo ML, Gelvez N, Schrijver I. Allele-Specific Impairment of *GJB2* Expression by *GJB6* Deletion del(*GJB6*-D13S1854). *PLoS ONE* 6(6): e21665
7. Padma G, Ramchander PV, Nandur UV, Padma T. *GJB2* and *GJB6* gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment. *J Genet* 88, 267–272
8. Kenneson I, Van Naarden-Braun K, Boyle C. *GJB2* (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a huge review. *Genet Med* 2002;4(4):258-274
9. Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak B. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest* 2011;41(1): 103–116
10. Azaiez H, Chamberlin GP, Fischer SM, Welp CL, Prasad SD, Taggart RT, et al. *GJB2*: The spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype. *Hum Mutat* 2004;24:305-311
11. Prevalence of 35delG/*GJB2* and del (*GJB6*-D13S1830). Cordeiro-Silva M, Barbosa A, Santiago M, Proveti M, Rabbi-Bortolini E. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010;76(4):428-32
12. Perea Y, Mato J, Amores I, Ferreira R. Study of six mutations in the *GJB2* gene in Cuban patients with non-syndromic sensorineural deafness. *Biotechnol Appl* 2007;24:241-245
13. Arenas-Sordo ML, Menendez I, Hernández-Zamora E, Sirmaci A, Gutierrez-Tinajero D, McGetrick M. Unique spectrum of *GJB2* mutations in Mexico. *Int J Pediatr Otorhi* 2012;76:1678–1680
14. Olarte M, Gelvez N, Flórez S, Medina D, Tamayo ML. Frecuencia

- de la Mutación 35delG en el Gen *GJB2* en una población con sordera no-sindrómica en Bogotá, Colombia. *Revista Colombiana de Pediatría* 2004;39(1)
15. Del Castillo FJ, Del Castillo I. The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Front Biosci* 2011;16:3252-3274
  16. Detección de hipoacusia en el recién nacido; México: Secretaría de Salud; 2008. Disponible en <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>
  17. Davarnia B, Babanejad M, Fattahi Z. Spectrum of *GJB2* (Cx26) gene mutations in Iranian Azeri patients with nonsyndromic autosomal recessive hearing loss. *Int J Pediatr Otorhi* 2012;76:268–271
  18. D’Andrea P, Veronesia V, Bicego M. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochem Biophys Res* 2002;296: 685–691
  19. The Molecular Otolaryngology and Renal Research Laboratory at The University of Iowa. Deafness variation database. 2011–2014. Disponible en: <http://deafnessvariationdatabase.org/letter/g>
  20. Smith RJH, Van Camp G. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNB1. 1998 Sep 28 [Updated 2014 Jan 2]. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1272/>

21. Wei Q, Wang S, Yao J, Lu YZhibin Chen, Guangqian Xing. Genetic mutations of *GJB2* and mitochondrial *12S rRNA* in nonsyndromic hearing loss in Jiangsu Province of China. *J Transl Med* 2013;11:163
22. Smith RJH, Sheffield AM, Van Camp G. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNA3. 1998 Sep 28 [Updated 2012 Apr 19]. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1536/>

## **RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

**Aideé Alejandra Hernández Juárez**

**Candidato para el Grado de Especialista en Genética Médica**

Tesis: MUTACIONES EN LOS GENES *GJB2* Y *GJB6* EN PACIENTES  
CON HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA

Campo de Estudio: Medicina

Datos Personales: Nacido en San Luis Potosí, San Luis Potosí el 17 de  
Octubre de 1984, hija de José Félix Hernández Báez y Gladis Alejandra  
Juárez Álvarez

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí,  
grado obtenido Médico Cirujano y Partero en 2010