

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de variantes patogénicas en el gen *GJB6*  
de pacientes con hipoacusia no sindrómica, por  
secuenciación de Sanger.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Daniella Mariee Roque Garzona para optar el grado académico  
de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de variantes patogénicas en el gen *GJB6*  
de pacientes con hipoacusia no sindrómica, por  
secuenciación de Sanger.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Daniella Mariee Roque Garzona para optar el grado académico  
de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2022

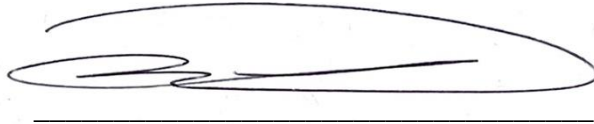
Vo. Bo. :



---

M.Sc Vera María Alvarado Guzmán

Tribunal Examinador:



---

Ph.D. Luis Diego Archila Diaz



---

M.Sc Vera María Alvarado Guzmán



---

M.Sc Luis Augusto Franco López

Fecha de aprobación: Guatemala 7 de diciembre de 2022

## **PREFACIO**

Le doy gracias a Dios en primer lugar por sus bendiciones en este trayecto de mi vida universitaria, Gracias a mis padres por brindarme esta oportunidad de estudiar en una universidad prestigiosa en Guatemala.

Gracias al Instituto de Investigación de Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM), por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar mi trabajo de graduación, apoyándome en mi financiamiento, en el uso del laboratorio, del equipo y por brindarme las muestras necesarias para el estudio. Además de donde me llevo muy buenas experiencias.

A la licenciada Vera María Alvarado por todo su apoyo, por la paciencia y sobre todo por creer en mí al realizar esta investigación y guiarme en todo el proceso ya que ha sido importante en mi formación como profesional. De igual forma a Luis Augusto Franco por su apoyo en el área de bioinformática en el estudio.

Al Doctor Luis Diego Archila director del departamento de Bioquímica y Microbiología por su asesoría en el estudio, por todo el apoyo incondicional y por motivarme a dar lo mejor de mí para la investigación.

# CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| PREFACIO .....  | i  |
| RESUMEN.....  | vi |
| I. INTRODUCCIÓN .....                                     | 1  |
| II. OBJETIVOS .....                                       | 2  |
| A. Objetivo general.....                                  | 2  |
| B. Objetivos específicos.....                             | 2  |
| III. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN .....                   | 3  |
| IV. MARCO TEÓRICO .....                                   | 4  |
| A. La hipoacusia.....                                     | 4  |
| B. Clasificación de hipoacusias .....                     | 4  |
| C. Anatomía del oído.....                                 | 6  |
| D. La cóclea.....   | 7  |
| E. El potencial endococlear .....                         | 8  |
| F. Las conexinas .....                                    | 8  |
| G. La genética en hipoacusia no sindrómica.....           | 9  |
| 1. El ADN.....  | 9  |
| 2. Los loci de las hipoacusias no sindrómicas .....       | 10 |
| 3. Los genes y patrones de herencia .....                 | 10 |
| 4. El gen GJB2.....                                       | 10 |
| 5. El gen GJB6.....                                       | 11 |
| 6. Hipoacusias no sindrómicas y patrones de herencia..... | 12 |
| H. Estrategias para determinación de variantes .....      | 13 |
| 1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....         | 13 |
| 2. Amplificación de la muestra.....                       | 14 |
| 3. Secuenciación de Sanger.....                           | 15 |
| 4. Diseño de primers (oligonucleótidos) .....             | 16 |
| 5. Programas para diseño de primers .....                 | 17 |
| 6. Programas para el análisis bioinformático .....        | 17 |
| V. MARCO METODOLÓGICO .....                               | 18 |
| A. Hipótesis.....   | 18 |
| B. Viabilidad.....  | 18 |

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| C.    | Metodología .....   | <b>18</b> |
| 1.    | Criterio de selección de muestras .....   | 18        |
| 2.    | Obtención de muestras sanguíneas.....   | 18        |
| 3.    | Extracción de ADN (kit QIAGEN-Gentra Pure) .....  | 19        |
| 4.    | Muestras control .....  | 19        |
| 5.    | Cuantificación de ADN (kit QuantiFluor® dsDNA System Promega).....  | 19        |
| 6.    | Diseño de primers.....  | 19        |
| 7.    | Estandarización de PCR punto final para variantes del gen GJB6 .....  | 20        |
| 8.    | Secuenciación de muestras (por medio de secuenciación de Sanger) .  | 21        |
| 9.    | Análisis bioinformático .....   | 21        |
| 10.   | Beneficios y riesgos .....  | 22        |
| VI.   | RESULTADOS .....  | 23        |
| A.    | Estandarización de la PCR para la región codificante del gen GJB6<br>.....  | <b>23</b> |
| B.    | PCR para la región codificante del gen GJB6 .....   | <b>25</b> |
| C.    | Secuenciación bidireccional .....   | <b>25</b> |
| D.    | Análisis bioinformático .....   | <b>26</b> |
| VII.  | DISCUSIÓN .....   | 27        |
| VIII. | CONCLUSIÓN .....  | 29        |
| IX.   | RECOMENDACIONES .....   | 30        |
| X.    | REFERENCIAS .....   | 31        |
| XI.   | ANEXOS .....  | 36        |
| A.    | Consideraciones éticas .....  | <b>36</b> |
| B.    | Carta de solicitud de aprobación del comité de ética.....   | <b>37</b> |
| C.    | Carta por parte INVGEM haciendo constar que el investigador está<br>totalmente desligado a información personal y contacto de los<br>sujetos de estudio. .... | <b>38</b> |
| D.    | Consentimiento informado del estudio del origen de las muestras   | <b>39</b> |
| E.    | Concentraciones de ADN de muestras.....   | <b>45</b> |
| F.    | Diagramas de familias con hipoacusia no sindrómica .....  | <b>47</b> |
| G.    | Datos demográficos e información de los pacientes analizados ...  | <b>48</b> |
| H.    | Script utilizado para el análisis bioinformático de secuencias .....  | <b>50</b> |

## LISTA DE FIGURAS

| Figuras  | Página  |
|--|---------|
| Figura 1. Formas de clasificación de la hipoacusia.....                      | Pág. 4  |
| Figura 2. Clasificación causal de hipoacusias.....                           | Pág. 6  |
| Figura 3. Esquema del oído.....  | Pág. 7  |
| Figura 4. Corte transversal de la cóclea.....                                | Pág. 8  |
| Figura 5. Estructura del gen <i>GJB2</i> .....                               | Pág. 10 |
| Figura 6. Estructura de gen <i>GJB6</i> .....                                | Pág. 11 |
| Figura 7. Mapa de la región del locus DFNB1.....                             | Pág. 11 |
| Figura 8. Proceso de Reacción en cadena Polimersa (PCR).....                 | Pág. 14 |
| Figura 9. Dideoxinucleotidos Trifosfato.....                                 | Pág. 15 |
| Figura 10. Gel de agarosa de muestra PCR 1 Y 2 .....                         | Pág. 24 |
| Figura 11. Gel de agarosa de muestras PCR 3 y 4.....                         | Pág. 24 |
| Figura 12. Gel de agarosa de amplificación de muestras de S01 – S12..        | Pág. 25 |
| Figura 13. Electroferograma de región coficante de <i>GJB6</i> .....         | Pág. 25 |
| Figura 14. Electroferograma para determinación de variantes en <i>GJB6</i> . | Pág.26  |



## LISTA DE TABLAS

| Tablas   | Página  |
|--|---------|
| Tabla 1. Clasificación de hipoacusia en relación con la adquisición del lenguaje.....  | Pág. 5  |
| Tabla 2. Variantes y deleciones genéticas en pacientes con hipoacusia no sindrómica de los genes <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i> ..... | Pág.12  |
| Tabla 3. Localizaciones de genes asociados a hipoacusia no sindrómica autosómica.....  | Pág.12  |
| Tabla 4. Parámetros específicos en el diseño de primers.....   | Pág.15  |
| Tabla 5. Guía para el rango efectivo de separación en geles de agarosa.....  | Pág.16  |
| Tabla 6. Concentraciones iniciales de reactivos utilizados para PCR.....   | Pág. 20 |
| Tabla 7. Protocolo de amplificación.....   | Pág. 20 |
| Tabla 8. Condiciones para la estandarización de PCRs.....  | Pág. 28 |
| Tabla 9. Concentraciones y diluciones de muestras de ADN.....  | Pág. 45 |
| Tabla 10. Datos de pacientes analizados .....  | Pág. 48 |

## RESUMEN

Se estima que alrededor de 70% de casos de hipoacusia se deben a factores genéticos. La determinación de posibles variantes asociadas a la hipoacusia ayuda a aumentar la información sobre el funcionamiento y la fisiología del órgano coclear en el oído interno, particularmente en el órgano de Cortí que posee un mecanismo de reciclaje de potasio ya que posibles alteraciones en este proceso llegan a producir hipoacusia en las personas. Se destacan mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6*, en los cuales se han descrito variantes que causan alrededor del 50% de hipoacusias no sindrómicas. Debido a que Guatemala es un país con una alta variabilidad racial y que alrededor de 240 mil personas tienen hipoacusia, es importante conocer y determinar variantes genéticas de esta índole. Por lo tanto, en el estudio se analizaron 54 muestras de pacientes con hipoacusia profunda no sindrómica tomadas por el Instituto de Investigación de Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM), con resultados wild type en el exón 2 del gen *GJB2*, de las cuales se determinó que ningún individuo de la población seleccionada tenía variantes en el gen *GJB6*. Esto puede indicar que posiblemente existe una baja frecuencia de alteraciones en este gen en la población de Guatemala y que sea posible que se encuentren variantes en otros genes que estén implicados en la hipoacusia no sindrómica. Por lo tanto, se recomienda seguir haciendo estudios en este tipo de deficiencia debido a la falta de información en Guatemala y así aumentar el rango de detección.

# I. INTRODUCCIÓN

La hipoacusia es un problema que afecta a 360 millones de personas alrededor del mundo, comprometiendo el desarrollo cognitivo y del lenguaje de las personas afectadas. Esta deficiencia limita la calidad de vida de la persona y puede ser atribuida tanto a factores genéticos como a factores ambientales. Aproximadamente 70% de los casos de hipoacusia es causada por factores genéticos siendo del tipo no sindrómico el más común mientras que 30% de los casos son clasificados como sindrómicos (Willems, 2000).

La cóclea es el órgano del oído interno encargado de transformar las vibraciones sonoras a impulsos eléctricos que llegan al cerebro. Dentro de la cóclea se encuentra el órgano de Cortí que contiene las células ciliadas, las cuales funcionan como receptores auditivos y convierten las ondas sonoras del canal coclear en impulsos eléctricos (Korver, et al, 2017).

Las alteraciones en estos órganos son una causa frecuente de hipoacusias genéticas. Se destaca la existencia de variantes en el gen *GJB2* de la conexina 26, el cual es uno de los genes más afectados por variantes patogénicas. Dichas variantes son responsables de la mitad de casos de sordera no sindrómica. Además de este, se encuentra el gen *GJB6* de la conexina 30, en el cual también se han descrito variantes causantes de sordera no sindrómica. Debido a la variedad racial en Guatemala es de importancia determinar variantes genéticas implicadas en hipoacusias en la población. En Guatemala se han descrito variantes causantes de sordera en el gen *GJB2* (Carranza, et al, 2015), pero aún no se ha estudiado la existencia de variantes en el gen *GJB6*.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es determinar variantes patogénicas en el gen *GJB6* de pacientes con sordera no sindrómica, con resultados wild type en el exón 2 del gen *GJB2* por detección molecular (PCR punto final y secuenciación de Sanger). La implementación de la prueba en INVEGEM ayudaría estudiar pacientes con sordera cuyo resultado fue negativo para el gen *GJB2* y a ampliar el rango de detección de variantes en la población guatemalteca.

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Determinar variantes patogénicas en el gen *GJB6* de pacientes con sordera no sindrómica, con resultados *wild type* en el exón 2 del gen *GJB2*.

### B. Objetivos específicos

- Diseñar primers para una PCR de la región codificante del gen *GJB6*.
- Estandarizar la PCR para amplificar la región codificante del gen *GJB6*.
- Secuenciar la región codificante del gen *GJB6*.
- Realizar el análisis bioinformático de las secuencias realizadas.

### III. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La hipoacusia se define como una pérdida de más de 20 decibeles de audición. Esta se divide en: leve (umbral entre 21-40 decibeles), moderada (umbral entre 41-70 decibeles) severa (entre 71-95 decibeles) o profunda (mayor de 95 decibeles). También puede ser clasificada como: sindrómica (características clínicas distintivas) o no sindrómica (sordera como única manifestación) y según el modo de herencia se clasifica como autosómica recesiva, dominante, ligada al cromosoma X o mitocondrial (Clinic Barcelona, 2021; OMS, 2021).

La hipoacusia es un padecimiento común en la población y su prevalencia aumenta con la edad. La pérdida auditiva no sindrómica no está asociada a otras manifestaciones clínicas (Willems, 2000). Estos casos están relacionados con la pérdida auditiva permanente causada por daños en la estructura del oído interno la cual puede ser adquirida o causada por factores ambientales o bien puede tener bases genéticas y resultar de una variante en un gen cuyo resultado es alterar la secuencia del aminoácido de la proteína codificada por dicho gen (Korver, et al, 2017).

En el genoma se han identificado alteraciones en genes que codifican estructuras de adherencia célula-célula denominados Gap Junction (GJB). Estos se encuentran en el cromosoma 13q12 y se encargan de codificar proteínas expresadas en la cóclea llamadas conexinas, de las cuales la conexina 26 conocida como Cx26 y codificada por el gen *GJB2*, es la más estudiada debido a que 50% de la sordera pre lingual recesiva (Rabionet, et al, 2001) proviene de las variantes patogénicas encontradas en este gen. Además, se encuentra la conexina 30 o Cx30, codificada por el gen *GJB6*, en el cual también se han identificado diversas variantes que causan pérdidas auditivas. En el caso de *GJB6*, se han reportado deleciones en 309 y 232kb, (*GJB6-D13S1830*) y del (*GJB6-D13S1854*), en la región 5' del gen (Buonfiglio, et al, 2020).

En Guatemala se ha estudiado el gen *GJB2* y se encontró que el 12.7% de pacientes estudiados presentaron variantes patogénicas (Carranza, et al, 2015). El resto de pacientes tenía un genotipo wild type en dicho gen. Por lo tanto, este estudio pretende realizar secuenciación del segmento codificante del gen *GJB6* con el fin de identificar variantes patogénicas asociadas a sordera en este gen. Actualmente, no existe información ni estudios al respecto en Guatemala sobre el gen *GJB6*.

La identificación genética en pérdida auditiva puede proporcionar asesoramiento adecuado y una estimulación temprana correcta como apoyo a mejorar la calidad de vida de pacientes afectados. Además de proporcionar el diagnóstico molecular del paciente con sordera, también la prueba puede proporcionar información y estimación de las probabilidades de sordera dentro de una familia. La implementación de la prueba en INVEGEM ayudaría estudiar pacientes con sordera cuyo resultado fue negativo para el gen *GJB2* y ampliar el rango de detección de variantes patogénicas en la población guatemalteca.

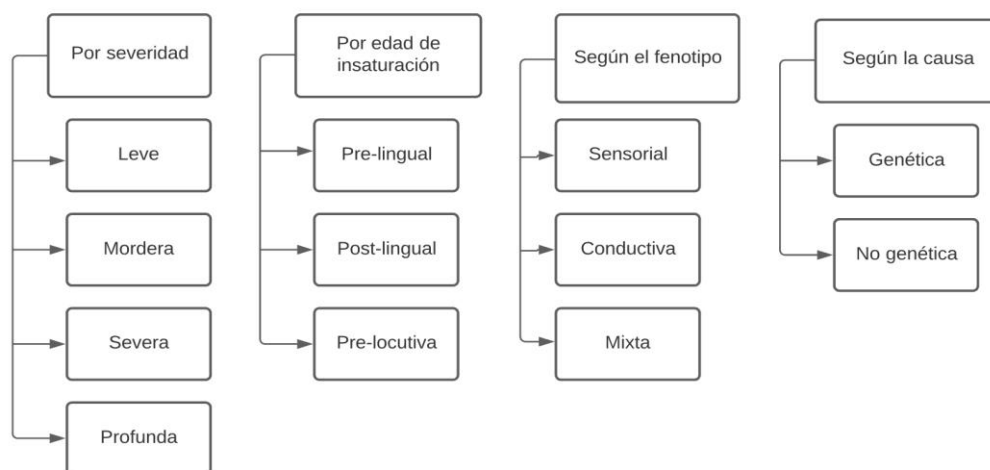
## IV. MARCO TEÓRICO

### A. La hipoacusia

Es un trastorno sensorial que incapacita a las personas a escuchar y dificulta el desarrollo del habla. Además, es uno de los problemas más comunes, afectando alrededor de 360 millones de personas según lo indica la Organización Mundial de la Salud. Sus manifestaciones pueden ser desde una pérdida auditiva mínima hasta una pérdida total de la audición (OMS,2021).

### B. Clasificación de hipoacusias

La hipoacusia se puede clasificar según su severidad, la edad de instauración, fenotipo y su causa (ver Figura 1).



**Figura 1.** Formas de clasificación de la hipoacusia

(Díaz, et al, 2016).

Hay cuatro grados de hipoacusia: la leve que es la pérdida auditiva de 21 a 40 decibels, la moderada en cuyos casos se produce la pérdida auditiva de 41 a 70 decibels, la severa con pérdida de 71 a 95 decibels y la profunda, en la cual la persona no puede escuchar más allá de 95 decibels (Clinic Barcelona, 2021). Las últimas están asociadas a la pérdida permanente de la audición debido a daños en la estructura del oído interno.

En la hipoacusia leve, un individuo tiene problemas en su audición solo en ambientes ruidosos y con voces bajas, por lo tanto, no hay repercusiones en el desarrollo del lenguaje, pero algunos elementos fonéticos como P por B pueden causar confusión. La hipoacusia moderada presenta dificultades de audición y existen problemas en la adquisición del lenguaje y la producción de sonidos. En la hipoacusia severa la persona solo escucha cuando se eleva la voz o por medio de amplificadores, y no puede desarrollar el lenguaje sin apoyo. Por último, en la hipoacusia profunda la audición es prácticamente nula y no se produce el desarrollo del lenguaje (Carcedo, 2003). Además, la

hipoacusia se puede clasificar según la edad de instauración y su relación con el desarrollo del lenguaje (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de hipoacusia en relación con la adquisición del lenguaje.

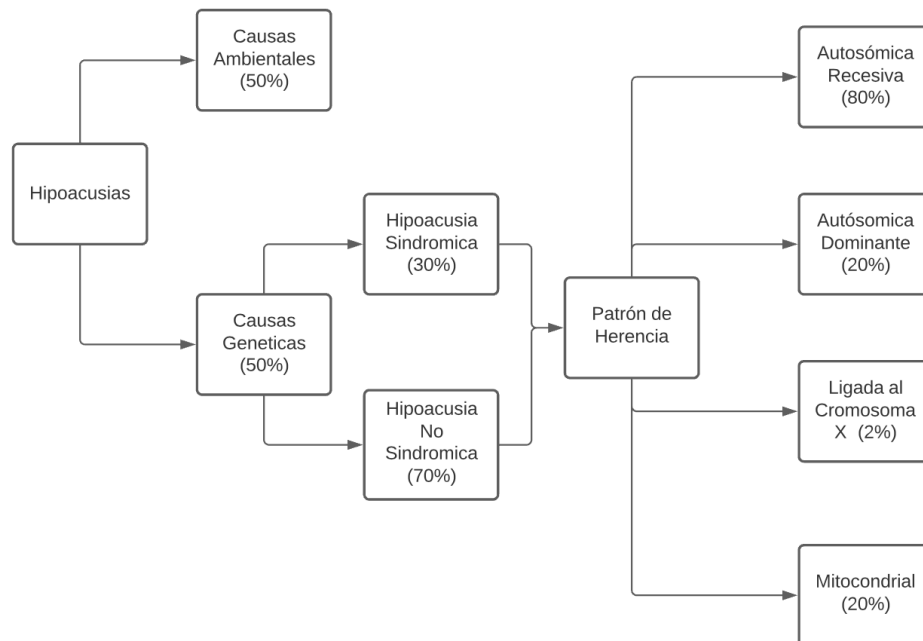
| <b>Clase de hipoacusia</b> | <b>Descripción</b>   |
|----------------------------|--|
| Hipoacusia pre-lingual     | Tiene lugar antes del desarrollo del lenguaje y dificulta el aprendizaje del habla.            |
| Hipoacusia post-lingual    | Aparece cuando el lenguaje ya está desarrollado, su incidencia en el habla será escasa o nula. |
| Hipoacusia pre-locutiva    | Aparece durante la adquisición del lenguaje.   |

(Carcedo, 2003)

La gravedad de la pérdida auditiva puede ser variable y cambiar con el paso del tiempo, También puede ser unilateral (afectan un solo oído) o bilateral (afecta ambos oídos), progresiva o estable a lo largo del tiempo y puede ser congénita (desde el nacimiento) u ocurrir en cualquier edad (Carcedo, 2003).

Además, se puede clasificar como conductiva, neurosensorial o mixta, según la sección del oído afectada. La conductiva se debe a la interrupción mecánica ya sea en la parte media o externa del oído en la transmisión de sonidos, la neurosensorial se produce cuando en el oído interno las células ciliadas no emiten impulsos neurales al nervio vestibulococlear y es causada por daños en el oído interno presentándose desde el nacimiento o etapas del desarrollo. En la mixta se involucra la conductiva y la neurosensorial (Castillo et al, 2011). Se ha determinado que el 50% son de origen neurosensorial causados por factores genéticos (Kawaguchi, 2005).

La pérdida auditiva puede ser consecuencia de diversos mecanismos físicos, químicos, infecciosos o genéticos (ver Figura 2). Las hipoacusias adquiridas se producen por medio de causas ambientales o causas de trauma acústico, por infecciones bacterianas, medicamentos o edad avanzada, factores que pueden bloquear el canal auditivo. Por otro lado, las sorderas genéticas (sindrómicas y no sindrómicas) están asociadas a alteraciones en los genes del individuo.



**Figura 2.** Clasificación causal de hipoacusias  
(Adaptado de Mendelsberg et al, 2013)

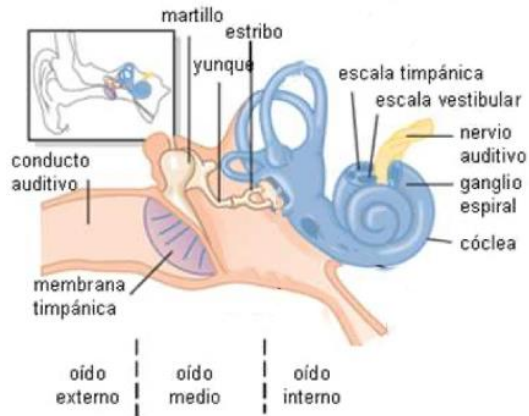
En el caso de la sordera síndromica, existen malformaciones en el oído y otros órganos y son ocasionados por síndromes genéticos como Waardenburg, Usher, Alport y Pendred entre otros y aproximadamente el 30% de las hipoacusias son síndromicas (Mendelsberg et al, 2013). Si al estudiar al paciente no se determina la existencia de alguna alteración física, la condición se clasifica como hipoacusia no síndromica. Es decir, que no se encuentra asociada a ningún otro síntoma o síndrome, estas pueden ser hereditarias o adquiridas y estudios han demostrado que el 70% de las hipoacusias genéticas son de tipo no síndromico (Buonfiglio et al, 2020).

### C. Anatomía del oído

El oído es un órgano encargado de la percepción de los sonidos y diferenciación de volumen, además de identificar la fuente sonora con exactitud (Tortora, 2018). La audición es el proceso mediante el cual ondas sonoras son convertidas en señales eléctricas en donde el nervio auditivo se encarga de enviar señales al cerebro. Esta capacidad está asociada al buen funcionamiento de la estructura del oído y al nervio auditivo para que el cerebro reciba e interprete los sonidos (Mohs, 2010).

El oído se divide en tres partes: oído externo, medio e interno (ver Figura 3). El oído externo es también conocido como pabellón auditivo (conducto auditivo), en donde las ondas de sonido transmitidas se recogen y son guiadas hacia el tímpano el cual vibra cuando las ondas golpean con el mismo (Guyton et al, 2011).





**Figura 3.** Esquema del oído

(Adaptado de Guyton et al.,2011).

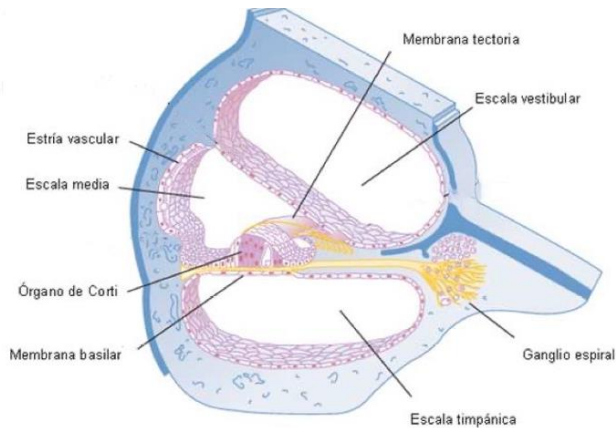
El oído medio es un espacio separado del oído externo y tímpano, compuesto por tres huesecillos (martillo, yunque y estribo) los cuales se encargan de formar un puente desde el tímpano hacia el oído interno y conducir el sonido (Guyton et al.,2011). El oído interno contiene estructuras, principalmente la cóclea, que se encargan de transformar los sonidos que entran en el canal auditivo a señales eléctricas.

#### **D. La cóclea**

Es un órgano que se encarga del proceso de transducción de las vibraciones (señales). En este proceso, las células sensoriales del órgano de Cortí, que se encuentra dentro de la cóclea (ver Figura 4), producen señales eléctricas que se transportan al cerebro por medio del nervio auditivo (Guyton et al, 2011).

Las células ciliadas del órgano de Cortí son los receptores auditivos que convierten las ondas sonoras del canal coclear en impulsos eléctricos, esto se debe a que tienen en su extremo apical microvellosidades denominadas estereocilios formados por actinas y miosinas. Las puntas de los estereocilios de las células ciliadas que son externas están conectadas a una lámina viscosa llamada membrana tectoria. Además, se encargan de las actividades motoras, lo cual hace que contribuyan a la amplificación de señales y la resolución de frecuencias sonoras (Guyton et al.,2011). Las células ciliadas internas tienen en sus superficies basales las terminales de las neuronas del órgano de Cortí.

Con forma similar a un caracol, cada vuelta de la cóclea se divide en tres cámaras o escalas. La escala timpánica, la media y vestibular (ver Figura 4).



**Figura 4.** Corte transversal de la cóclea

(Adaptado de Guyton et al, 2011).

La escala timpánica y la vestibular contienen un líquido llamado perilinfa, cuyo componente principal es el sodio, aunque en la escala vestibular tiene un alto contenido de potasio y bajo en sodio. La escala media contiene un fluido llamado endolinfa cuyo componente principal es el potasio y posee una baja concentración de calcio y un voltaje más positivo respecto a la perilinfa, que da como resultado la existencia de un potencial endococlear (Guyton et al, 2011).

## E. El potencial endococlear

La diferencia en la concentración mantiene la diferencia electroquímica de electrolitos entre perilinfa y endolinfa y es importante para el correcto funcionamiento de la cóclea debido a que pequeños cambios resultan en disminución de la sensibilidad auditiva (Carcedo, 2003). Permite que el órgano de Cortí funcione sin el consumo de energía directa.

Las células intermedias, los fibrocitos y las células basales del ligamento espiral son unidas por medio de las uniones celulares tipo Gap, estas son requeridas para facilitar el movimiento del potasio hacia la endolinfa, en donde intervienen las proteínas llamadas conexinas, que se ensamblan para formar estructuras de membrana denominadas conexones (Tortora, 2018).

## F. Las conexinas

El conexón es un hemicanal que se une a otro para la formación de un canal intercelular que conecta a los citoplasmas. Existen diversos tipos de unión según el tipo de conexina, se diferencian si están constituidos por un solo tipo de conexina o por tener diferentes conexinas. Las uniones tienen una alta permeabilidad según la conexina que tengan, las cuales se encargan de permitir la difusión de moléculas como iones y metabolitos e impulsos eléctricos (Kochhar, 2007).

Diversos mecanismos se encargan de la regulación y del cierre de hemicanales como cambios en el pH intracelular, el potencial de la membrana, o en la concentración de calcio. Las variantes en las conexinas pueden afectar varios sistemas y órganos causando diversas enfermedades dermatológicas,

neurológicas, cardíacas, oculares y en ocasiones pueden producir una pérdida auditiva (Kochhar, 2007).

Las conexinas son proteínas encargadas de las uniones celulares, en donde interactúan a través de la transmisión de moléculas usando canales de la superficie de la membrana celular, su función principal es la comunicación y el intercambio de metabolitos, electrolitos y mensajeros entre las células.

Se han reportado alrededor de 21 genes para las conexinas con base en su similitud y tres subtipos: la unión gap alfa, la beta y gamma (GJA, GJB y GJC), presentes en varios tejidos. Los genes de GJA y GJB tienen estructura similar caracterizándose por poseer uno o varios exones no codificantes en la región 5' UTR (Schrijver, 2004).

Además, se han determinado diversos tipos de conexinas implicadas con la hipoacusia no sindrómica como la conexina 26, conexina 30, conexina 31 y conexina 43. Esto se debe a que juegan un rol importante en el reciclaje de iones de potasio en las células de soporte, además estas conexinas pueden estar implicadas en la transmisión de las señales.

Son de particular importancia la conexina 26 y 30 (proteína gap junction beta 2 y 6 respectivamente) que también se encuentra formando parte del tejido de la cóclea y en diversos tejidos del cuerpo incluyendo el cerebro, el oído interno, la piel entre otros (Schrijver, 2004).

Se coexpresa en diversos tejidos y proporciona iones de potasio a la endolinfa, para así mantener el nivel correcto de iones para la conversión de ondas sonoras. Esta conexina es producida por el gen *GJB6*, que se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 13, cercano a la ubicación del gen *GJB2* (conexina 26) y ambos genes se encuentran en el locus DFNB1. Este fue uno de los primeros locus en ser identificado para catalogar las hipoacusias no sindrómicas recesivas (Buonfiglio, et al, 2020).

## **G. La genética en hipoacusia no sindrómica**

### **1. El ADN**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene toda la información genética. Es una molécula que consta de dos cadenas complementarias formadas por nucleótidos que consisten en ácido fosfórico, desoxirribosa y bases nitrogenadas de purinas (Adenina y Guanina) y pirimidinas (Timina y Citocina). La mayor parte del ADN se encuentra en el núcleo y es conocido como ADN cromosómico, pero también puede encontrarse ADN extracromosómico dentro de las mitocondrias (mtADN) (Morton, 2022).

El genoma humano está formado aproximadamente 3,300 millones de bases distribuidos en 23 pares de cromosomas, de los cuales existen dos (cromosoma X y Y) que son considerados los cromosomas sexuales. Se han caracterizado alrededor de 21,000 genes humanos y a la posición de un gen dentro del cromosoma se le denomina locus (Morton, 2002).

## 2. Los loci de las hipoacusias no sindrómicas

Son nombrados con el prefijo DFN (Deafness, sordera en inglés) y su forma dominante es designada como DFNA (49 loci) y su forma recesiva como DFNB (57 loci), por último, la que es ligada al cromosoma X y mitocondrial es designada como DFNX (5 loci). Estos genes son los encargados de codificar productos que desempeñan diversos tipos de funciones en el oído interno, como por ejemplo proteínas implicadas en el citoesqueleto (miosinas y las que se unen a la actina), de adhesión (cadherinas, protocadherinas), proteínas encontradas en la transmisión de los impulsos nerviosos (ortofelina), reguladores transcripcionales y conexinas (Morton, 2002).

## 3. Los genes y patrones de herencia

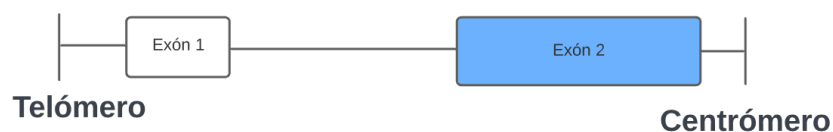
Son las porciones de ADN de diversas longitudes los cuales se encargan de codificar para la síntesis de proteínas, estos son localizados dentro de los cromosomas. Cada individuo contiene dos copias de un gen, una albergada en el cromosoma paterno y otra copia en el cromosoma materno. Por lo tanto, los genes pueden tener diferentes versiones y a esto se le conoce como alelos.

Cuando los genes se encuentran en alguno de los cromosomas autosómicos (no sexuales) en la herencia, se denomina herencia autosómica, pero si el gen heredado se localiza directamente en los cromosomas sexuales se denomina herencia ligada al sexo, tanto para el cromosoma X como para el Y (Morton, 2006).

La homocigosidad se da cuando un individuo tiene copias iguales del gen, pero si se tiene dos copias diferentes el individuo tiene heterocigosidad para un gen. La expresión de las distintas variantes de un gen, puede variar si es dominante o recesivo. Si un alelo es dominante se caracteriza por su expresión sobre el alelo (dominancia) alterno. Usualmente, se manifiesta una enfermedad o discapacidad con una sola copia alterada. En cambio, en la recesividad la enfermedad o la discapacidad se manifiesta cuando los alelos son homocigotos (solo una variante del gen) (Morton, 2006).

## 4. El gen *GJB2*

Está compuesto por 2 exones, de los cuales el primero no es codificante y le sigue después el intrón 1, el otro exón tiene la región codificante y produce la proteína conexina 26 (ver Figura 5).

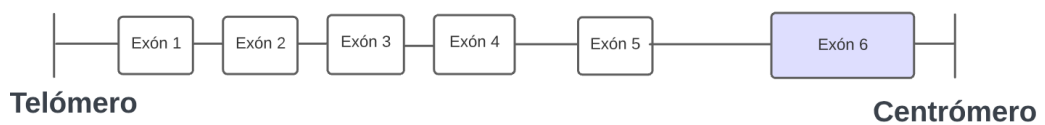


**Figura 5.** Estructura del gen *GJB2*, la región codificante está identificada por la caja color azul, las demás corresponden a las regiones no traducidas (Adaptado de Kenneson et al, 2002).

Las variantes del gen *GJB2* están asociadas a las hipoacusias no sindrómicas, dominantes autosómicas y recesivas autosómicas. Se han determinado una amplia lista de variantes, debidas a deleciones, sustituciones nucleotídicas, inserciones o duplicaciones en la parte codificante (Tabla 2). Además, se han descrito variantes de splicing como c.-23+1G>A o IVS1+1G>A en el intrón 1 y g.-77C>T en la región promotora (Wilch, et al,2006).

## 5. El gen *GJB6*

Está compuesto por seis exones, de los cuales los primeros cinco son de la región 5' UTR y el sexto exón se encarga de codificar directamente la proteína conexina 30 (ver Figura 6).



**Figura 6.** Estructura de gen *GJB6*, la región codificante está identificada por la caja color morada, las demás corresponden a las regiones no traducidas (Adaptado de Essensfelder et al ,2005).

La principal variante descrita es una deleción de 309kb en la región 5' del gen, esta deleción es la *GJB6-D13S1830*, además de esta deleción hay otra llamada *GJB6-D13S1854* (ver Figura 7) de 232Kb las cuales están asociadas a la hipoacusia no sindrómica (Batissoco, et al, 2009).



**Figura 7.** Mapa de la región del locus DFNB1, donde se representan las deleciones *GJB6-D13S1830* y *GJB6-D13S1854* (Adaptado de Castillo et al, 2005).

**Tabla 2.** Variantes y deleciones genéticas en pacientes con hipoacusia no sindrómica de los genes *GJB2* y *GJB6*.

| Gen         | Variante genética | Variante proteica              |
|-------------|-------------------|--------------------------------|
| <i>GJB2</i> | c.101T>C          | Met34Thr                       |
|             | c.131G>A          | Trp44Ter                       |
|             | c.167delT         | Leu56fs                        |
|             | c.235delC         | Leu79fs                        |
|             | c.35delG          | Gly12fs                        |
|             | c.-23+1G>A        | <i>splicing</i> en el intrón 1 |
|             | c.79G>A           | Val27Ile                       |
| <i>GJB6</i> | del309kb          | delección                      |
|             | Del232kb          | delección                      |

(Adaptado de Romanov et al, 2016)

## 6. Hipoacusias no sindrómicas y patrones de herencia

En la hipoacusia no sindrómica autosómica dominante, el individuo afectado solo necesita la copia de un gen alterado para presentar la hipoacusia, en estudios se ha reportado 38 loci en este tipo de sordera (Schrijver, 2004). En la mayoría de casos las pérdidas auditivas no sindrómicas son heredadas por patrones autosómicos recesivos y el 50% de las hipoacusias están relacionadas a variantes de los genes *GJB2* y *GJB6* (ver Tabla 3).

**Tabla 3.** Localizaciones de genes asociados a hipoacusia no sindrómica autosómica.

| Localización de cromosoma | Locus/Variantes                                    | Genes                           | Proteína    | Función                    |
|---------------------------|--|---------------------------------|-------------|----------------------------|
| 13q11-12                  | DFNB1/^3   | <i>GJB2</i>                     | Conexina 26 | Gap Junction               |
| 13q12                     |  | <i>GJB6</i>                     | Conexina 30 | Gap Junction               |
| 7q31                      | DFNB4  | <i>SLC26A4</i>                  | Pendrina    | Transportador a de Aniones |
| 14q12-13                  | DFNB9  | <i>COCH</i>                     | Coclina     | Matriz Extracelular        |
| Mitocondria               | 1555A > G<br>7445A > G<br>7472 ins C<br>7511 T > C | <i>MTRN R1</i><br><i>MTTS 1</i> | -           | ARNr 12S<br>ARNt Serina    |
| Xq21-1                    | DFN3   | <i>POU3 F4</i>                  | Dominio POU | Factor de Transcripción    |
| 4p16-1                    | DFNA6/14/38  | <i>WFS1</i>                     | WFS1        | Proteína transmembrana     |

(Schrijver, 2004).

Hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva es una hipoacusia más severa que la forma dominante, debido a los defectos en la cóclea no se asocian a otras anomalías. Este tipo de alteración es manifestada cuando la persona presenta dos copias alteradas del mismo gen proveniente de los padres. Si ambos padres poseen una copia con el gen alterado hay un 25% que los hijos tengan la discapacidad, el 50% pueden ser portadores de una copia del gen pero siendo sanos y el otro 25% puede heredar las copias de los genes sin anomalías (Castillo, et al, 2002).

Además de hipoacusia no sindrómica dominante y recesiva, se encuentra la ligada al cromosoma X, esta herencia corresponde al 2% de las hipoacusias no sindrómicas. La anomalía afecta directamente al sexo masculino por poseer solo un cromosoma X con una copia del gen, al contrario del sexo femenino para que se tenga la mutación debe contar con dos copias del gen mutado en los dos cromosomas lo cual es poco frecuente y esto se debe a que los hombres son más afectados y es un gen transmitido por mujeres portadoras (Castillo, et al, 2002).

Por último, la hipoacusia no sindrómica mitocondrial, es heredada exclusivamente de la madre, por lo tanto los descendientes sin importar su sexo, heredan la mitocondria de la madre, además se ha determinado una variante mitocondrial causante de hipoacusia en los genes.

La frecuencia de mutaciones del gen *GJB2* y *GJB6* en la población ha hecho que sea de importancia su diagnóstico molecular en las hipoacusias no sindrómicas. Esto posibilita al desarrollo de terapias para pacientes con hipoacusia, aunque actualmente no hay un tratamiento curativo, la detección temprana es de vital importancia para tratamientos paliativos (implante coclear o audífonos), además de tomar en cuenta la implementación del uso lengua de señas y que los diagnósticos genéticos proveen herramientas para la determinación molecular de hipoacusias no sindrómicas. Así los tratamientos dirigidos ayudan a mejorar la calidad de vida de los pacientes con sordera. (del Castillo et al, 2002),

## **H. Estrategias para determinación de variantes**

### **1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

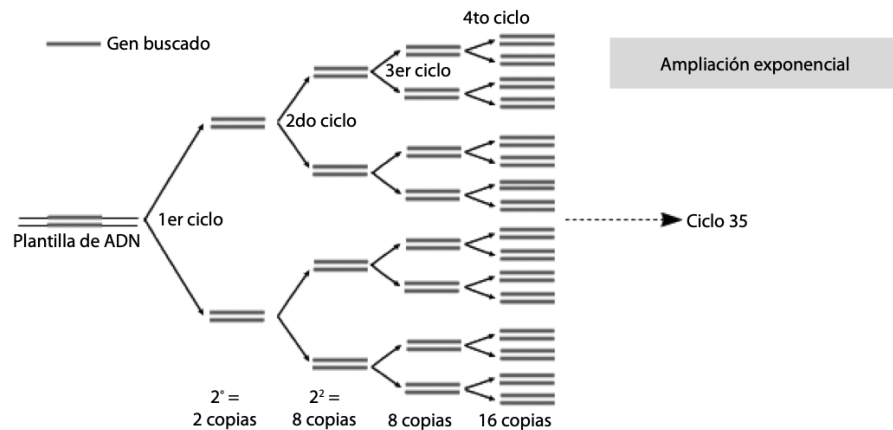
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis en 1983 se basa en obtener múltiples copias de un fragmento de ADN. Se puede amplificar y detectar con alta especificidad y sensibilidad el material genético de bacterias, virus o genes que causan enfermedades (Mullis, 1990).

La PCR reproduce in vitro la duplicación del ADN en las células, y puede sintetizar altas cantidades de segmentos de ADN a partir de cantidades menores a 1µg del ADN de las muestras. La técnica se divide en tres etapas (desnaturalización, hibridización y elongación). En el segmento de desnaturalización el ADN se desnaturaliza a una temperatura de 90-94 °C, después la temperatura baja para que los extremos 3' de las hebras se puedan unir con los oligonucleótidos complementarios (primers o cebadores), la

longitud debe ser de 20 a 30 nucleótidos para la formación de híbridos estables para la molécula de plantilla (Mullis, 1990).

La polimerasa más conocida como Taq Polimerasa llamada así por la bacteria *Thermus aquaticus*, que tiene resistencia a la desnaturalización, se encarga de extender los extremos 3' de los oligonucleótidos usando hebras de ADN como plantilla a esto se le conoce como elongación (primer extensión) (Vierstrarte, 2001).

En el primer ciclo se obtiene las moléculas bicatenarias del ADN, después el ciclo anterior se repite varias veces (alrededor de 20 a 50) sin la necesidad de agregar más enzima a la reacción y se produce un aumento de número de copias de forma exponencial de la secuencia específica (ver Figura 9) (Vierstrarte, 2001).



**Figura 8.** Proceso de reacción en cadena polimerasa (PCR) (Vierstrarte, 2001).

## 2. Amplificación de la muestra

Después de realizar la PCR se confirma la amplificación de la muestra por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida. Por medio de la cual se comprueba el tamaño del producto de PCR. Permite la separación de fragmentos del ADN según su tamaño.

Tanto el gel de agarosa como de acrilamida forman una red de tamaños que obligan al ADN a pasar por poros y son jalados por medio de la corriente eléctrica hacia el polo positivo (ver Tabla 5). Esto ocurre debido a que el ADN tiene carga negativa debido a la presencia de grupos fosfatos, por lo tanto, los fragmentos pequeños son los primeros en pasar y los grandes pasan de forma lenta, por lo que los fragmentos que contengan un tamaño similar migrarán de forma similar, se agruparán y se formará una banda en el gel (Sosnick, 2003).



**Tabla 4.** Guía para el rango efectivo de separación en geles de agarosa.

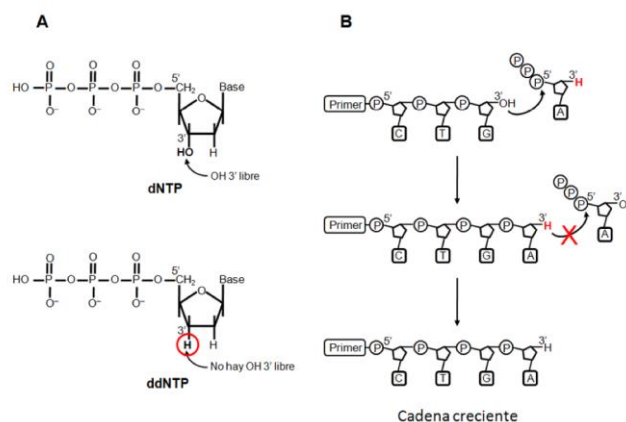
| Rango efectivo de separación (kb) | Agarosa (%) |
|-----------------------------------|-------------|
| 30 a 1                            | 0.5         |
| 12 a 0.8                          | 0.7         |
| 10 a 0.5                          | 1.0         |
| 7 a 0.4                           | 1.2         |
| 3 a 0.2                           | 1.5         |

(Adaptado de Sosnick, 2003)

### 3. Secuenciación de Sanger

En estudios relacionados a hipoacusias, es fundamental determinar la causa, para el diagnóstico de hipoacusias genéticas, ya que es de importancia realizar pruebas para determinar la existencia de variantes patogénicas. Por lo tanto, la secuenciación de Sanger es una herramienta útil para este tipo de estudios genéticos por su alta sensibilidad y especificidad, además de ser eficiente y rápida.

La secuenciación permite la determinación del orden de nucleótidos, de una molécula de ADN, este orden determina la información genética para el correcto funcionamiento de organismos. La técnica de Sanger fue propuesta en 1975, y desde entonces ha sido uno de los métodos más utilizados para confirmación de variantes. Este método tiene como objetivo la síntesis enzimática del ADN, con una ADN polimerasa con la presencia de nucleótidos modificados dideoxinucleótidos trifosfato(ddNTPs) (ver Figura 8) (Mendelsberg, 2013).



**Figura 9.** Dideoxinucleótidos Trifosfato. (Parte A) estructura de Dideoxinucleótidos Trifosfato y de deoxinucleótidos trifosfato. (Parte B) Incorporación de Dideoxinucleótidos Trifosfato en la síntesis enzimática donde se termina la extensión de cadena (Mendelsberg, 2013).

Estos carecen de hidroxilo en el carbono 3' en el azúcar que se lleva a cabo el enlace fosfodiéster en los nucleótidos en la síntesis de la cadena de ADN. Se divide en cuatro pasos y en cada paso se agregan los ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP). La ADN polimerasa se encargará de incorporar los ddNTPs, después de ser incorporados la extensión en cadena se detiene, por lo tanto se produce la generación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños en el extremo 5' por el primer o cebador y en el extremo 3' por el ddNTP de la reacción.

Por medio de dNTPs y los ddNTP se obtienen fragmentos que terminan con los nucleótidos de la molécula que es complementaria al ADN que secuenciará, estos fragmentos son separados por electroforesis. Esta técnica consiste en que cada reacción corre en un capilar, obteniendo el patrón de bandas por medio de la cual se lee la secuencia. La velocidad puede ser inversamente proporcional al tamaño y se determina el orden de cada uno de los nucleótidos en la molécula de ADN (Mendelsberg, 2013).

#### 4. Diseño de primers (oligonucleótidos)

Los primers son secuencias cortas de ADN utilizados para la técnica de PCR y secuenciación que hibridizan con el ADN de la muestra y se encargan de definir la región amplificada, dando especificidad a la técnica. Estos deben cumplir los siguientes parámetros (ver Tabla 4).

**Tabla 5.** Parámetros específicos en el diseño de primers (oligonucleótidos)

| Característica                  | Descripción                                |
|---------------------------------|--|
| Tamaño                          | 18 a 35 nucleótidos                        |
| Temperatura (T <sub>m</sub> )   | 50 a 60 °C                                 |
| Contenido de GC                 | 40 a 60%                                   |
| Similaridad                     | 100% de Apareamiento                       |
| Complementariedad entre primers | Se debe evitar por la formación de dímeros |
| La base 3'                      | Debe comenzar con G o con C                |

(Vierstrarte, 2001)

Hay variedad de softwares para el diseño de primers (oligonucleótidos), los paquetes se utilizan para el análisis completo del ADN y proteínas, prediciendo las estructuras. Los servicios de web son fáciles de usar y disponibles gratuitamente para el diseño de *primers* (Vierstrarte, 2001).

La herramienta de *primer blast* es un algoritmo para la comparación de secuencias biológicas (secuencias de nucleótidos o proteínas). Después se encarga de calcular la importancia estadística de coincidencias. Esta herramienta puede ser no solo utilizada para inferir en relaciones de secuencias si no también en la identificación de genes.

## 5. Programas para diseño de *primers*

**Thermo Fisher Design Primer:** Es de fácil acceso y gratuito, es utilizado para el diseño, síntesis de primers. Además, la base de datos consta alrededor de 650,000 pares de primers prediseñados para la secuenciación del exoma y genoma humano, los primers están libres de SNPs y dímeros, son específicos y se utilizan en condiciones universales para la técnica de PCR (Korver et al, 2016).

**Primer Blast:** Es una herramienta de Software para el diseño de primers, la cual combina la herramienta de BLAST con un algoritmo de alineamiento global para obtener una alineación completa, esta herramienta es sensible para targets que tiene un numero de mismatches con los primers, además esta herramienta permite a los usuarios a diseñar de forma específica (Korver et al, 2016).

## 6. Programas para el análisis bioinformático

**Clinvar:** Es un programa de acceso gratuito que contiene informes sobre las relaciones entre las variantes humanas y fenotipos e interpretan la relación de las variaciones y son alojadas en el centro nacional de información biotecnológica (NCBI), financiado por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos. Se relaciona sobre la ubicación de la variación de ensamblajes y a cada registro se le asigna un acceso al formato.

**Software Geneious:** Es un software que contiene herramientas de biología molecular y por medio de visualizaciones interactivas genera imágenes para analiza secuencias. Es utilizada para el análisis y visualización de datos biológicos.

## **V. MARCO METODOLÓGICO**

### **A. Hipótesis**

Debido a que es un estudio descriptivo no se consideró establecer hipótesis.

### **B. Viabilidad**

Este estudio fue viable debido a que en recursos humanos se cuenta con tres personas involucradas. La estudiante de la carrera de Bioquímica y Microbiología (coinvestigadora), y dos asesores: la licenciada Vera Alvarado de parte de la institución INVEGEM y el licenciado Augusto Franco de parte de la Universidad del Valle de Guatemala. Además, este estudio fue financiado un 70% de parte de INVEGEM, el otro 30% por parte de la coinvestigadora. También se cuenta con el apoyo de uso de laboratorio, equipo, materiales y muestras de pacientes con sordera no sindrómica de parte de Instituto en Investigación de Enfermedades Genéticas y Metabólicas INVEGEM.

### **C. Metodología**

Para este trabajo de investigación se obtuvo la aprobación del comité de ética de la Universidad del Valle de Guatemala, código de aprobación: BM-005-2022-17671 (ver Anexos A a D).

#### **1. Criterio de selección de muestras**

Las muestras se seleccionaron por conveniencia tomadas de un estudio anterior ("Estudios genéticos de deficiencias auditivas", realizado por la Dra Claudia Carranza PhD). Se trabajó con 54 muestras de pacientes con diagnóstico de sordera profunda unilateral o bilateral como única manifestación y resultado negativo para la detección de variantes en el exón 2 del gen *GJB2*, y sus familiares sin importar su sexo y edad.

#### **2. Obtención de muestras sanguíneas**

Se trabajó con muestras retrospectivas de leucocitos extraídos a partir de sangre periférica, colectada por punción venosa en tubos con EDTA como anticoagulante, de pacientes con sordera profunda no sindrómica para el estudio de variantes asociadas a sordera recolectadas por el Instituto de Investigación de Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM) ubicado en el Campus medico San José, Km 28.5 Carretera a Bárcenas, Santa Lucía Milpas Altas, Sacatepéquez. Para la investigación, las muestras se utilizaron como remanentes de casos ambulatorios trabajados respectivamente en el

laboratorio almacenadas a -20°C. A las muestras se les asignó un código correspondiente al paciente estudiado.

### **3. Extracción de ADN (kit QIAGEN-Gentra Pure)**

Se siguió el procedimiento del kit de extracción QIAGEN-Gentra Pure:

Los leucocitos se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 minutos, para remover la solución de almacenamiento, luego se resuspendieron en 200 µL de PBS 1X y se agregó 300 µL de la solución de lisis celular (solución detergente aniónica) para liberar el contenido de las células. Posteriormente se agregó 1.5µl de RNAsa A para eliminar el ARN y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Luego de la incubación, se agregó 100µl del reactivo de precipitación de proteínas y se mezcló en vórtex por 15 segundos a alta velocidad para obtener una mezcla homogénea. Las proteínas se separaron por centrifugación y el sobrenadante se trasvasó a un tubo que contenía 500 µL de isopropanol para precipitar el ADN. Este se lavó con 300 µL de etanol 70% y el ADN fue rehidratado con 20 a 300 µL de solución de hidratación (1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH=7.5) a 65°C por 30 minutos. Por último, se le dio un vórtex rápido y centrifugación de 8 a 10 segundos.

### **4. Muestras control**

Las muestras control fueron proveídas por INVEGEM para la estandarización de la PCR. Se utilizó la muestra A previamente extraída por el método de extracción de ADN por columnas (kit Purelink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) y las muestras B y C extraídas previamente por precipitación en isopropanol (kit de extracción QIAGEN-Gentra Pure).

### **5. Cuantificación de ADN (kit QuantiFluor® dsDNA System Promega)**

Se siguió el procedimiento del kit de cuantificación QuantiFluor® dsDNA System Promega:

Se preparó un blanco y un estándar para la curva de dos puntos (0 y 200 ng de ADN) y se estableció la concentración de las muestras según la fluorescencia emitida. Para la lectura de muestras, se utilizó el Quantifluor Modelo ST de la marca Promega.

### **6. Diseño de primers**

Se procedió a realizar los primers para encontrar variantes en la sección codificante del gen *GJB6*, para lo cual se buscó la secuencia del gen en NCBI con su locación 13q12.11 y su respectivo archivo fasta en las regiones 20222595 a 20223580. Se escogió una región que abarcó la parte codificante del gen. Utilizando el programa Multiple Primer Analyzer de Thermo Fisher Scientific se descartó la existencia de dímeros en los primers diseñados. Los

primers fueron sintetizados en Sigma-Aldrich y tenían las siguientes secuencias:

- **GJB6 F:** 5' - CTTTGCCCCACTTTTGTCTG - 3'
- **GJB6 R:** 5' - CTCCTTATGACGCAGCTACA - 3'

## 7. Estandarización de PCR punto final para variantes del gen *GJB6*

La PCR para amplificar la región deseada se realizó utilizando los primers diseñados con anterioridad. La enzima utilizada para amplificación fue la *NovaTaq™* DNA Polymerase (Novagen®, EMD Millipore Corporation) y los buffers correspondientes a la enzima. Las concentraciones iniciales de cada componente de la PCR están descritas en la Tabla 6

**Tabla 6.** Concentraciones iniciales de reactivos utilizados para PCR

| Reactivos         | Concentración Inicial |
|-------------------|-----------------------|
| Agua              | -                     |
| Buffer            | 10X                   |
| MgCl <sub>2</sub> | 25mM                  |
| dNTPs             | 2.5mM                 |
| Primer Forward    | 5μM                   |
| Primer Reverse    | 5μM                   |
| Taq Polimerasa    | 5 U/μL                |
| ADN               | 50 ng/μL              |

La amplificación se realizó en el termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems®). Las condiciones están descritas en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Protocolo de amplificación.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo      | No. de ciclos |
|---------------------------|-------------|-------------|---------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C        | 5 minutos   | 1             |
| Desnaturalización         | 95°C        | 45 segundos | 35            |
| Anidación                 | 60°C        | 45 segundos |               |
| Extensión                 | 72°C        | 1 minuto    |               |
| Extensión final           | 72°C        | 7 minutos   | 1             |
| Hold                      | 10°C        | ∞           |               |

Todos los productos de amplificación fueron cargados en un geles de agarosa al 2.5% utilizando GelRed (Biotium) como tinción de ADN de doble hebra. Se cargaron 3 μL de los productos de amplificación en los geles de agarosa, con 1.5 μL de la escalera Quick-Load® Purple 50bp DNA Ladder (New England Biolabs® Inc) o Perfect DNA™ 50bp ladder (Novagen) como

referencia. Se corrió la electroforesis a 120 V por una hora y media, y se procedió a observar el gel en el transiluminador (Benchtop 3UV™,UVP) para interpretar los resultados de amplificación.

## **8. Secuenciación de muestras (por medio de secuenciación de Sanger)**

Los productos de amplificación se enviaron a un laboratorio de secuenciación (Psomagen en EE.UU). Para realizar la secuenciación bidireccional de Sanger del fragmento y se obtuvo el archivo AB1 y FASTA de las secuencias de las muestras.

## **9. Análisis bioinformático**

Se obtuvieron archivos AB1 y se analizaron con el programa Geneious, versión 2022.2.1. utilizando la secuencia del genoma humano GRCh38 como secuencia de referencia. Los electroferogramas se compararon de forma visual para detectar variaciones en los picos de fluorescencia de cada posición de nucleótido dentro de la secuencia.

Antes de comenzar el análisis se instaló el ambiente de ANACONDA lo cual es contenedor de herramientas bioinformáticas. Luego se transformaron los formatos de ab1 a fastq, por medio de la herramienta EMBOSS utilizada para la conversión de las secuencias analizadas en el estudio para el control de calidad de las secuencias. Luego se determinó la calidad de las bases de las secuencias a analizar, por lo tanto las secuencias de baja de calidad se eliminaron por el proceso de recorte (trimming).

Después que se eliminaron las bases de baja calidad, se alinearon las secuencias contra el genoma de referencia para mapear las secuencias FASTA, por lo que se indexaron con el genoma de referencia, esta indexación por medio del comando BWA comprimió los archivos FASTA para que los comandos se ejecutaran de forma rápida y que permitiera encontrar las secuencias de interés. Se realizó una alineación local corta para las regiones de mapeo que están dentro de las secuencias a analizar contra la secuencia de consenso para determinar la posición exacta posibles variantes en las muestras.

Se generó un archivo SAM luego del alineamiento de las secuencias contra la del genoma de referencia, después se procedió a convertir de un archivo SAM a un archivo BAM utilizando la herramienta SAMTOOLS para convertirlo en formato binario (más comprimido). Después se procedió a realizar VARIANT CALLING utilizando la herramienta BCFTOOLS CALL para generar del alineamiento del genoma de referencia humano para determinar si existían posibles variantes. (ver en anexo G script utilizado para el análisis bioinformático).

## **10. Beneficios y riesgos**

La investigación no proporcionará ningún beneficio directo a los participantes, pero aportará la estandarización de una prueba de detección de variantes para el diagnóstico de sordera de origen genético, además de aportar información sobre las variantes del gen *GJB6* en la población guatemalteca. Existe un riesgo mínimo de pérdida de confidencialidad de los datos de los pacientes estudiados, para evitar el riesgo, INVEGEM asignará un nuevo código a los pacientes y el investigador no tendrá acceso a los datos.



## VI. RESULTADOS

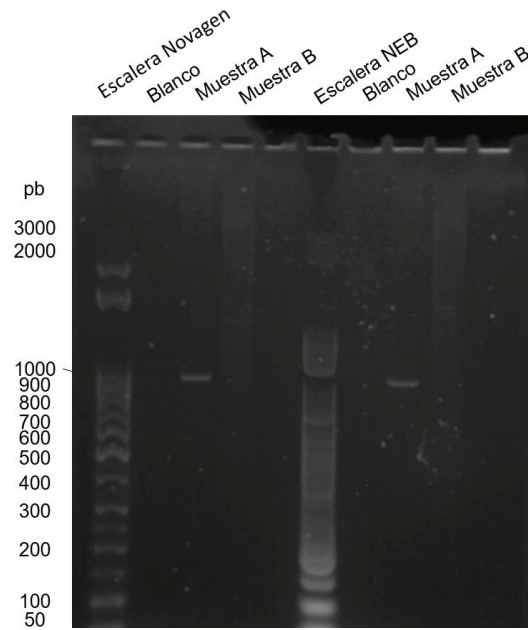
### A. Estandarización de la PCR para la región codificante del gen *GJB6*

Se realizaron cuatro PCRs con distintas condiciones para obtener una amplificación exitosa de la región de interés. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 8. Con la PCR 4 se obtuvo una mejor amplificación de la región de interés con respecto a las otras PCRs en las muestras control (A y B) (ver Figura 10).

**Tabla 8.** Condiciones\* para la estandarización de PCRs.

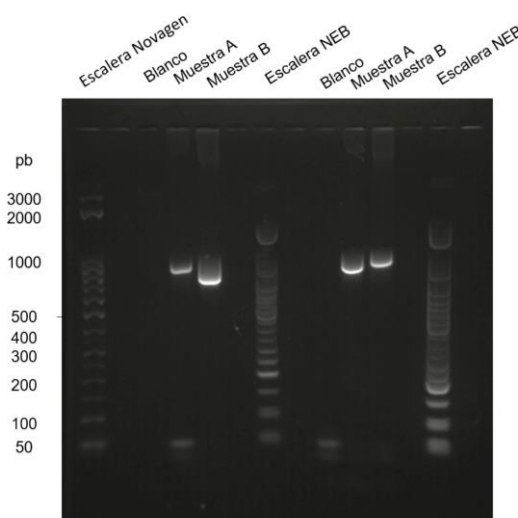
| Reactivos         | Concentración Inicial | Concentración final PCR 1 | Concentración final PCR 2 | Concentración final PCR 3 | Concentración final PCR 4 |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Agua              | -                     | -                         | -                         | -                         | -                         |
| Buffer            | 10X                   | 1X                        | 1X                        | 1X                        | 1X                        |
| MgCl <sub>2</sub> | 25mM                  | 2mM                       | 2mM                       | 2.5mM                     | 2.5mM                     |
| dNTPs             | 2.5mM                 | 0.5mM                     | 0.5mM                     | 0.5mM                     | 0.5mM                     |
| Primer Forward    | 5μM                   | 0.5μM                     | 0.8μM                     | 0.5μM                     | 0.8μM                     |
| Primer Reverse    | 5μM                   | 0.5μM                     | 0.8μM                     | 0.5μM                     | 0.8μM                     |
| Taq Polimerasa    | 5 U/μL                | 0.05 U/μL                 | 0.05 U/μL                 | 0.05 U/μL                 | 0.05 U/μL                 |
| ADN               | 50 ng/μL              | 5ng/μL                    | 5ng/μL                    | 5ng/ μL                   | 5ng/ μL                   |

\*Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron las mismas para todas las PCRs (Ver Tabla 7)



**Figura 10.** Gel de agarosa de muestras (A y B), para estandarización de PCR del gen *GJB6*.

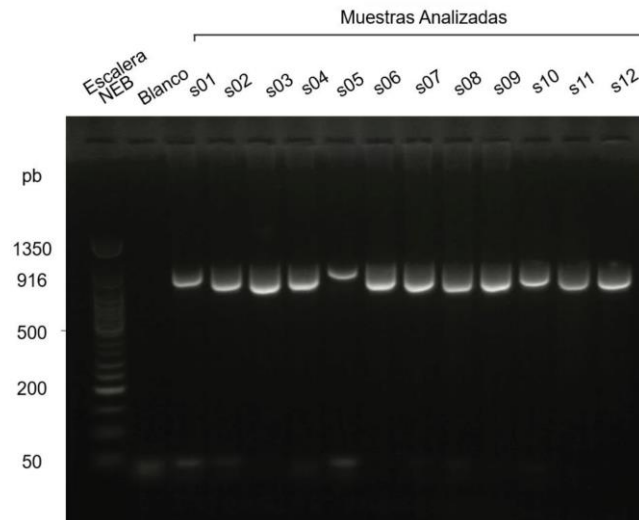
La primera PCR permitió la amplificación de un segmento de 900pb correspondiente al tamaño esperado en la muestra A, cuyo ADN fue extraído por el método de extracción por columna. Sin embargo, no se observó amplificación en la muestra B cuyo ADN fue extraído por el método precipitación en isopropanol. (Ver Figura 10). La segunda y tercera PCR se realizaron cambiando las concentraciones de  $MgCl_2$  y de primers respectivamente. La amplificación en ambas PCRs fue exitosa, observándose fragmentos del tamaño esperado en ambas muestras (Muestra A y B) (ver Figura 11).



**Figura 11.** de agarosa de muestras (A y B), para estandarización de PCR del gen *GJB6*.(Utilizando concentraciones de PCR 3 y 4).

## B. PCR para la región codificante del gen *GJB6*

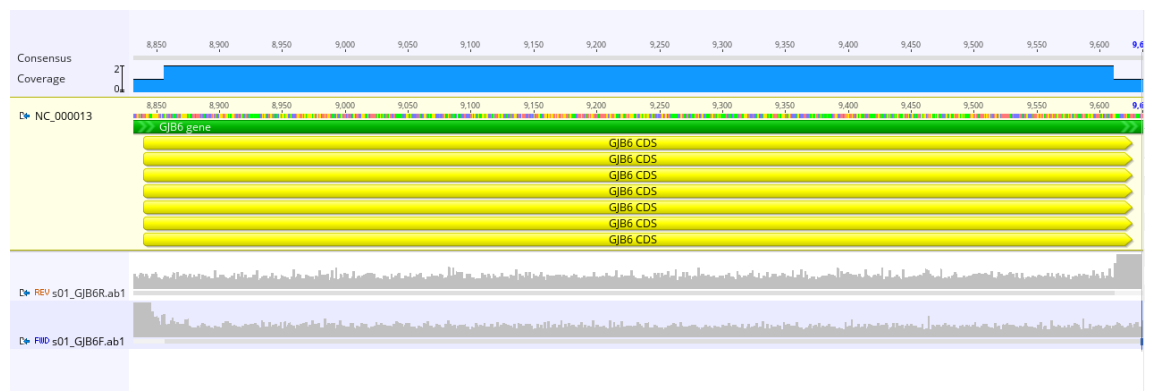
Se logró la recuperación de ADN de todas las muestras (concentraciones en el anexo E). Todas las muestras se amplificaron con las condiciones de la PCR 4 (ver Figura 12).



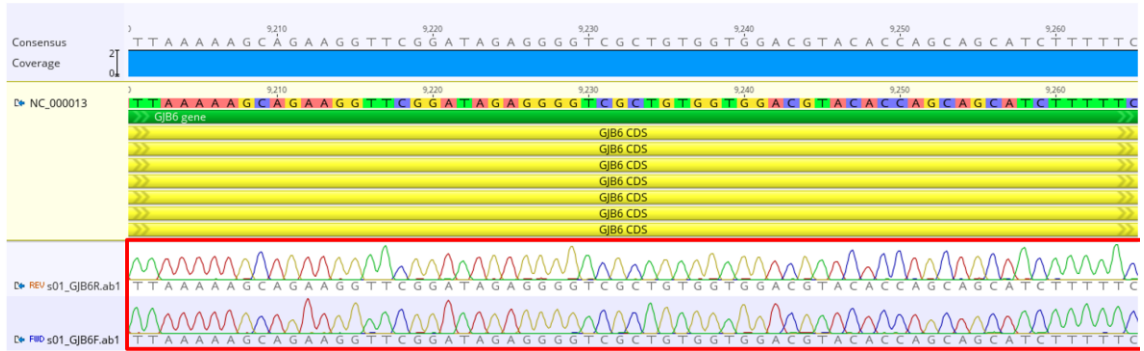
**Figura 12.** Gel de agarosa de amplificación de muestras de S01 – S12, De PCR del gen *GJB6*. (Todos los gels mostraron este patron de amplificación).

## C. Secuenciación bidireccional

El análisis bioinformático de las secuencias no identificó ninguna variante patogénica en la región codificante de las 55 muestras estudiadas.



**Figura 13.** Electroferograma de región codificante alineado con la secuencia de referencia. Se muestra el fragmento con tamaño de 862 pb de la muestra s01 para la determinación de posibles variantes en el *GJB6*.



**Figura 14.** Electroferograma de región codificante de muestra s01 en donde se muestra en cuadro rojo cada uno de los picos que representa un nucleótido (pico de color rojo para adenina, verde para timina, azul para citocina y amarillo para guanina). No se observan cambios o dobles picos (todas las secuencias mostraron este patrón sin ninguna variante).

## D. Análisis bioinformático

Se implementó un algoritmo utilizando herramientas bioinformáticas (ver metodología). Por lo tanto, se generaron archivos SAM, BAM para la compresión y fácil procesamiento de archivos y VCF. Este archivo se realizó con el fin de determinar la posición inicial y la posición en el genoma de referencia del cromosoma y cuales podrían haber sido las posibles variantes de lo cual, no se obtuvieron resultados diferentes al análisis realizado por el programa Geneious con anterioridad.

## VII. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue la determinación de prevalencia de variantes implicadas en el gen *GJB6* como causa de hipoacusia no sindrómica en pacientes diagnosticados con esta deficiencia. Para esto, se incluyeron 54 muestras retrospectivas de pacientes con hipoacusia no sindrómica unilateral y bilateral de un estudio anterior (Carranza et al,2015) en el cual se analizó el exón 2 en el gen *GJB2* por medio de PCR punto final y mediante la secuenciación de Sanger se determinó la existencia de variantes asociadas a sordera en la población guatemalteca, pero también se encontró un alto porcentaje de familias afectadas que presentaban un genotipo *wild type* para el gen *GJB2*.

El diagnóstico de sordera de origen genético suele ser complicado por tratarse de una enfermedad en la cual muchos genes pueden estar asociados. Sin embargo, el gen *GJB6* puede presentar variantes asociadas a sordera en mayor frecuencia que otros genes. Por lo tanto, se procedió a diseñar primers específicos para la región codificante del gen *GJB6*.

El gen tiene un 45% de contenido de guanina-citocina (GC) y la región amplificada contenía 48%. Para el diseño de primers se evitaron regiones repetitivas y la posible creación de dímeros de primers. El proceso de estandarización de PCR punto final únicamente requirió la modificación de las cantidades de primers y de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), siendo necesario un aumento de  $0.3 \mu M$  en la concentración final de primers y de  $0.5 \mu M$  de  $MgCl_2$  evidenciando que el diseño de primers fue adecuado.

Después de una amplificación y secuenciación exitosa se obtuvieron los archivos ab1 y fasta de las secuencias para la comparación de sitios homólogos entre las secuencias y determinar la existencia de cambios en estas.

En las secuencias se observó que no existen variantes patogénicas en ninguna de las muestras analizadas aunque pertenecían a pacientes con hipoacusia profunda familiar. En el anexo F se muestran los árboles genealógicos de nueve familias analizadas y todas presentaban por lo menos dos casos de sordera no sindrómica, pero las secuencias del gen *GJB6* fueron iguales a la secuencia de referencia.

Se realizó también un análisis de las 54 secuencias utilizando más herramientas bioinformáticas (ver metodología) para ampliar la información de las secuencias y corroborar a profundidad sobre la frecuencia de las variantes, pero, de igual manera, no fue posible encontrar ningún cambio en las secuencias analizadas.

En estudios previos se ha determinado variantes como la delección *GJB6* – D13S11830, en personas con hipoacusia prelingual (del Castillo, et al,2002). Esta alteración en la conexina 30 es la segunda mutación más frecuente. En

varios estudios se ha encontrado variantes en países de Latinoamérica como: México, Brasil, Argentina, Venezuela, Ecuador, Colombia y Chile. A pesar de la cercanía de las regiones, en Guatemala no fue posible encontrar estas variantes, además solo se han estudiado variantes de genes *GJB2* y *GJB6* debido a que en Latinoamérica no es fácil realizar secuenciación de nueva generación (NGS) para determinar otros genes implicados por lo que solo se enfocan en estos (Lezirovitz y Mingroni, 2021).

Los diversos genes implicados a hipoacusia no sindrómica son: *CEACAM16*, *P2RX2*, *OSBPL2*, *TBC1D24*, *TNC*, *ADCY1*, *BDP1*, *CABP2*, *ELMOD3*, *EPS8*, *GPSM2*, *GRXCR2*, *KARS*, *OTOGL*, *TBC1D24*, *TMEM132E*, *TPRN*, *TSPEAR*, *CLIC5*, *X-linked*, *COL4A6*, *SMPX*. Variantes en estos genes fueron determinadas por medio de secuenciación de nueva generación, metodología que fue diseñada principalmente para la investigación sobre genes y luego se convirtió en una herramienta utilizada para el diagnóstico como un panel específico para conocer acerca de cómo variantes en estos genes producen alteraciones en las personas ocasionando que estas padezcan de hipoacusia (Vona et al, 2015).

Por lo tanto, herramientas como la secuenciación de Sanger y NGS (secuenciación de nueva generación), permiten la detección de posibles variantes en diversos genes clínicamente relevantes para abordar un buen estudio y diagnóstico. Además, debido a la variedad de genes implicados a esta deficiencia, puede ser posible que debido a que Guatemala es un país multiétnico otros genes estén relacionados a causar hipoacusia en la población por lo tanto en un futuro se deberían realizar más estudios los cuales puedan confirmar la existencia de alteraciones en otros genes aunque en este estudio no se confirmó la presencia de variantes en el gen *GJB6* (Bitner, 2002).

El determinar si existe una predisposición genética en una familia tiene múltiples ventajas tanto para los individuos sanos como para los que ya padecen la enfermedad. Estos beneficios para los pacientes incluyen el diagnóstico y el pronóstico, así como en el tratamiento y los efectos sobre la reproducción. El papel de los implantes cocleares en este tipo de sordera es importante porque la técnica permite contrarrestar el daño causado por mutaciones en la conexina 26 y 30 (Rodríguez, et al 2011). La estimulación mediante implante de electrodos se realiza a nivel celular del ganglio espiral coclear, cuando se introducen directamente en él, permitiendo así una estimulación eléctrica directa, conducida por la vía aferente a la corteza cerebral ayudando al tratamiento del paciente.

Este estudio fue diseñado con base en la falta de investigación de hipoacusia no sindrómica genética para generar un impacto, el cual pretende ser base de nuevos estudios los cuales permitan establecer y estandarizar nuevos protocolos con más genes implicados en hipoacusia no sindrómica para la población guatemalteca y que permitan conocer de manera epidemiológica y genética diversas variantes implicadas en genes que causan hipoacusia, Además de brindar asesoramiento genético a familias lo cual les permite tener un amplio conocimiento de a qué se debe que tengan este tipo de deficiencia y cuáles pueden ser los potenciales tratamientos.

## VIII. CONCLUSIÓN

Se realizó un diseño experimental exitoso el cual permitió la amplificación de la región codificante del gen *GJB6* y secuenciación de Sanger bidireccional. Mediante el uso herramientas bioinformáticas, se llevó a cabo el análisis de las secuencias y se determinó que no se encontraron variantes en la región codificante del gen *GJB6* en los individuos analizados ya que no se encontró ningún tipo de alteración en las 54 muestras analizadas de pacientes con hipoacusia no sindrómica con resultados *wild type* en el exón 2 del gen *GJB2*. A pesar de que se podría haber obtenido un resultado positivo ya que es el segundo gen con una alta frecuencia en alteraciones asociadas a hipoacusia. Además, el tamizaje temprano para detectar hipoacusia, tiene una alta importancia para su intervención temprana para así lograr evitar consecuencias negativas que tiene la hipoacusia no sindrómica durante el desarrollo cognitivo en el desarrollo de las personas con esta deficiencia y que son eficientes para determinar la heterogeneidad genética para obtener un mejor diagnóstico y determinar si hay poblaciones que carecen de la delección *de GJB6* u otros genes que puedan interactuar con los alelos de *GJB2* para causar sordera.

## IX. RECOMENDACIONES

Debido a que es el primer estudio de *GJB6* realizado en Guatemala, se recomienda aumentar el número de individuos con hipoacusia no sindrómica, debido a que este posible aumento incrementaría la frecuencia y daría como resultado una mayor diversidad de variantes patogénicas para así diagnosticar un mayor número de pacientes afectados por hipocausia genética. Unas de las limitaciones en el estudio fue el bajo número de muestras analizadas y la limitada capacidad de la secuenciación de Sanger para analizar regiones más grandes. También se recomienda realizar más estudios con otros genes que estén implicados en hipocausia en Guatemala, ya que cabe la posibilidad que otros genes sean los causantes de hipoacusia y no necesariamente *GJB6* a pesar de que sus variantes son comunes a nivel de Latinoamérica. El diseño de nuevos protocolos permitirá ampliar el rango de detección e implementar abordajes más eficaces para los pacientes que son afectados por esta condición.



## X. REFERENCIAS

1. Agustin D, Martinez R, Acuña V, Figueroa J, Nicholson B, *Gap Junction Channels dysfunction in Deafness and hearing loss*. Antioxid Redox Signal (2009), 11(2): 309-322.
2. Batisso A, Serafim R, Silva A, Braga M, Lezirovitz L, Della R, Mingroni N. (2009) *Prevalence of GJB2 (Connexin-26) and GJB6 (Connexin-30) Mutations in a Cohort of 300 Brazilian Hearing-Impaired Individuals: Implications for Diagnosis and Genetic Counseling*. Ear & Hearing; 30; 1–7.
3. *Applied Biosystems Genetic Technologies (2009) Analyzer*. Applied User Biosystems guide. Life Corporation.
4. Bej, A, Mahbubani y R. (1991) *Atlas. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 26:301-334.
5. Buonfiglio P, Bruque C, Luce L, Giliberto F, Lotersztein V, Menazzi S, Paoli B, Elgoyhen A, Dalamón V. (2020) *GJB2 and GJB6 Genetic Variant Curation in an Argentinean Non-Syndromic Hearing-Impaired Cohort*. Genes (Basel). 21;11(10):1233. doi: 10.3390/genes11101233. PMID: 33096615; PMCID: PMC7589744.
6. Carranza C, Menendez I, Herrera M, Castellanos P, Amado C, Maldonado F, Rosales L, Escobar N, Guerra M, Alvarez D, Foster J 2nd, Guo S, Blanton SH, Bademci G, Tekin M. (2015) *A Mayan founder mutation is a common cause of deafness in Guatemala*. Clin Genet. Apr;89(4):461-465. doi: 10.1111/cge.12676. PMID: 26346709; PMCID: PMC5484753.
7. Castillo F, Rodríguez M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira C, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering K, Weil D, Wuyts W, Aguirre L, Martín Y, Moreno-Pelayo M, Villamar M, Avraham K, Dahl H, Kanaan M, Nance W, Petit C, Smith R, Van Camp G, Sartorato E, Murgia A, Moreno F, del Castillo I, (2005) *A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment*. Genet. 42(7):588-94.
8. Castillo I, Villamar M, Moreno M, del Castillo F, Alvarez A, Tellería D, Menéndez I, Moreno F, (2002) *A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment*. Med.346(4):243-9.
9. Castillo M, Peñaloza Y, Hernandez F (2001) *Etiología de la hipoacusia – sordera*. Med Mex 137(6).

10. *Clinics of North America*. 1996;29(5):725-39.
11. de Necochea, R., y Canul, J. (2004) *Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-47
12. Del Castillo I, Moreno M, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering K, Chamberlin G, Ballana E, Wuyts W, Maciel A, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Dahl H, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T, Nance W, Sartorato EL, Smith J, Van Camp G, Avraham K, Petit C, Moreno F. (2003) *Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study*. *Am J Hum Genet*. 73:1452–1458.
13. Del Castillo I, Villamar M, Moreno P, (2002), *A deletion Involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment*, *Engl J Med* 24;346(4):243-9.
14. Díaz C , Goycoolea M, Cardemilb, (2016), *HEARING LOSS: TRANSCENDENCE, INCIDENCE AND PREVALENCE*, Departamento Otorrinolaringología, Clínica Las Condes. Santiago, Chile.
15. Duman D and Tekin M. (2012) *Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review*. *Frontiers in Bioscience*. 17:2213-2236.
16. Egilmez O, Kalcioğlu M. (2016) *Genetics of Nonsyndromic Congenital Hearing Loss*. *Scientifica*. ;2016:7576064.
17. Essenfelder G, Larderet G, Waksman G, Lamartine J. (2005) *Gene structure and promoter analysis of the human GJB6 gene encoding connexin 30*. *Gene*; 350:33–40.
18. Francesco Z, Polles G, Zanotti G, Mammano F, (2012) *Permeation Pathway of Homomeric Connexin 26 and Connexin 30 Channels Investigated by Molecular Dynamics* *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, ISSN 0739-1102 Volume 29, Issue Number 5.
19. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, (2001). *High carrier frequency of the del35G deafness mutation in European population*. *Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG*. *Eur J Hum Genet* 8: 19-23.
20. Gil Carcedo L. (2003) *Hipoacusia neurosensorial*. Ed. Masson. Barcelona.
21. Hall, J., Guyton, A., & Hall, M. (2021). *Tratado de fisiología médica*. Barcelona: Elsevier.

22. Jahn A, Santos J. (2001) *Physiology of the Ear*: Taylor & Francis US.
23. Rodriguez-Paris J, Schrijver I. (2009) *The digenic hypothesis unraveled: The GJB6 del(GJB6-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389 354–359.
24. Jun A, McGhuit W, Hinojosa R, Green G (2000), *Temporal Bone Histopathology in connexin 26-related Hearing loss Laryngoscope* 110:269-275.
25. Kelly K, Mohs D. (2010) *The external auditory canal. Anatomy and physiology*. *Otolaryngologic*.
26. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. (2002) *GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review*. *Genet. Med.*4: 258– 274.
27. Keyko P. (2005) *Hipoacusia de causa genética*. *Rev. Otorrinolaringol. Cir.* 65:39-44.
28. Kikuchi T, Adams J, Miyabe Y, Kobayashi T.(2000) *Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness*. *Med Electron Micros.* 33(2):51-6.
29. Kochhar A, Hildebrand M, Smith R, (2007) *Clinical aspects of hereditary hearing loss*. *Genet Med* 9(7):393-408.
30. Korver A, Smith R, Van Camp G, Schleiss M, Bitner M, Lustig L, Usami S, Boudewyns A. (2017) *Congenital hearing loss*. *Nat Rev Dis Primers.* 12;3:16094. doi: 10.1038/nrdp.2016.94. PMID: 28079113; PMCID: PMC5675031.
31. Lee R, White T. (2009) *Connexin-26 mutations in deafness and skin disease*. *Expert Reviews in molecular medicine.* 1-19.
32. Lezirovitz K, Mingroni R. (2021) *Genetic etiology of non-syndromic hearing loss in Latin America*. *Hum Genet.* doi: 10.1007/s00439-021-02354-4. Epub ahead of print. Erratum in: *Hum Genet.* PMID: 34652575.
33. Loeza F, Rivera R, Martínez M, Gonzalez L, Urueta H, Berruecos P, Cuevas S. (2014) *Particular distribution of the GJB2/GJB6 gene mutations in Mexican population with hearing impairment*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* ;78(7):1057-60. doi: 10.1016/j.ijporl.2014.04.002.
34. Mange E, Mange A. (1999) *Basic human genetics*: Sinauer Associates, Incorporated

35. Manrique M, Morera C, Moro M. (1994) *Detección precoz de la hipoacusia infantil en recién nacidos de alto riesgo*. Estudio multicéntrico. *An Esp Pediatr*. 40(suppl 59):11-45.
36. Mcpherson P. Quirke y Taylor G (1995). *Polymerase chain reaction : a practical approach* . Oxford university, New York, EUA.
37. Mendelsberg P. (2013), *Importancia del diagnóstico de mutaciones en el gen de la conexina 26 en el manejo integral de la sordera congénita no sindrómica*. *Bol Med Hosp Infant Mex* 70(2):89-97.
38. Marlin S, Feldmann D, Blons H. (2005) GJB2 and GJB6 Mutations: Genotypic and Phenotypic Correlations in a Large Cohort of Hearing-Impaired Patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. ;131(6):481–487. doi:10.1001/archotol.131.6.481
39. Morton C and Nance W. (2006) *Newborn hearing screening-a silent revolution*. *New Engl J Med*. 354: 2151-2164.
40. Morton C. (2002) *Genetics, genomics, and gene discovery in the auditory system*. *Human Molecular Genetics*. 11(10): 1229-1240.
41. Mullis K. (1990) *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. *Scientific American*. 262(4):56-61.
42. Nail M, Kumar A, Norton B, (1996), *The Gap Junction Communication Channel Cell* 84:381-388.
43. Paz C. (1994) *Genética humana: conceptos básicos e investigaciones en el Ecuador*: Fundación Científica Cultural y Educativa Simon Bolivar.
44. Pellares N, Ruiz, P (2002). A large deletion including most of *GJB6* in recessive non syndromic *deafness: a digenic effect*. *Journal of Human Genetics*. 10,72-76
45. Petit C, Richardson G. (2009) *Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function*. *Nature Neuroscience*. 12(6): 703–710.
46. Rodriguez J, Tamayo M, Gelvez N, Schrijver I. (2011) *Allele-specific impairment of GJB2 expression by GJB6 deletion del (GJB6-D13S1854)*. *PLoS One*. 6(6):e21665.
47. Segretain D, Falk M. (2004) *Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal*. *Biochim BiophysActa*.1662(1-2):3-21.

48. Schrijver I (2004), *Hereditary Non- Syndromic sensorineural hearing loss* JMD 6(4).
49. Smith, L, Sanders, J, Kaiser, R, Hughes, P., Dodd, C., Connell, C, Heiner, C., Kent, S, Hood, L (2004) *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. Nature 321:674-679.
50. Sosnick T. (2003). *Agarose gels* [http://sosnick.uchicago.edu/agarose\\_gels.html](http://sosnick.uchicago.edu/agarose_gels.html).
51. Subirana J. (1985) *Estructura del ADN*. Alhambra, Madrid. 2281-3.
52. Tortora G, Derrickson B. (2018) *Principles of anatomy and physiology: Wiley*. John Wiley & Sons.
53. Vierstraete A. (2001). *Principle of the PCR* <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>, accesado 08/01.
54. Vona B, Nanda I, Hofrichter M, Shehata W, Haaf T. (2015) *Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future*. Mol Cell Probes;29(5):260-70. doi: 10.1016/j.mcp.2015.03.008.
55. Watson, J, Crick, F. (1953) *Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature 171(4356), 737-738.
56. White B. (1997). *PCR cloning protocols: from molecular cloning to genetic engineering. Methods in molecular biology*: 67. Humana Press. Totowa, New Jersey.
57. Wilch, E., Zhu, M., Burkhart, K., Regier, M., Effenbein, J, Fisher, R., Friderici, K. H. (2006). *Expression of GJB2 and GJB6 is reduced in a novel DFNB1 allele*. American journal of human genetics, 79(1), 174–179. <https://doi.org/10.1086/505333>.
58. Willems PJ. (2000) *Genetic causes of hearing loss*. NEJM 1101-9.
59. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I. (2012) *Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

## XI. ANEXOS

### A. Consideraciones éticas

La etiología de la sordera genética está relacionada a más de 150 genes que ocasionan el 70% de sordera genética no sindrómica, siendo genes de conexinas como *GJB6* los que presentan mayor cantidad de variantes patogénicas. La investigación aportará una prueba estandarizada para ampliar el diagnóstico de sordera genética no sindrómica en poblaciones de Guatemala mediante la identificación de variantes en gen *GJB6*, distinto al reportado en el estudio ya mencionado.

El investigador está totalmente desligado a información personal y contacto de los sujetos de estudio, ya que se trabajará con un código distinto al asignado a las muestras originales del estudio previamente realizado por INVEGEM y serán entregadas al investigador con el objetivo de disminuir el riesgo de pérdida de confidencialidad de los datos de los participantes.

“Dado que las muestras fueron recolectas con un consentimiento informado que contemplaba el uso de las muestras para investigaciones futuras, que no es factible localizar a los participantes de dicho estudio para obtener una nueva autorización y que no se obtendrá información privada identificable de los participantes, se solicitó dispensa del requisito de consentimiento al comité de Ética de la facultad de Ciencias y Humanidades de la UVG. (ver en anexos cartas y consentimiento informado del estudio del origen de las muestras.) No se recibirá información identificable del paciente a parte de edad, sexo, procedencia y relación familiar. Debido a que la información individual de los pacientes no será recolectada, no se corre el riesgo de divulgar la información personal o identidad de los mismos.

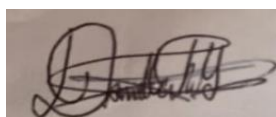
## B. Carta de solicitud de aprobación del comité de ética

Guatemala 11 de mayo de 2022

### A QUIEN INTERESE

Reciba un cordial saludo, espero sus actividades diarias sean de éxito. Por este medio solicito de parte del comité de ética de la facultad de ciencias y humanidades, aprobación de este proyecto que no involucra sujetos humanos, debido que la investigadora Daniella Mariee Roque Garzona, no tuvo ni tendrá interacción con las personas que proporcionaron las muestras, ya que las mismas fueron recolectadas para otra investigación, por otros investigadores y no se recolectarán nuevas muestras para el respectivo estudio. La investigadora obtendrá las muestras y la información de las mismas desvinculada de identificadores personales y no tendrá acceso a los datos que permitan esa vinculación. Por lo tanto, no se tendrá forma de asociar ninguna información con alguna persona en particular. El Instituto de Investigación de Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM), proveerá las muestras para el estudio, las cuales obtuvo mediante consentimientos informados de los pacientes, los cuales autorizaron su uso para estudios futuros sobre hipoacusia no sindrómica, y acredita que no compartirá información identificable con la investigadora como se consta en la carta adjunta.

Agradeciendo su autorización y atención a la presente, me suscribo.



Daniella Mariee Roque Garzona  
Estudiante de Bioquímica y Microbiología

**C. Carta por parte INVEGEM haciendo constar que el investigador está totalmente desligado a información personal y contacto de los sujetos de estudio.**



**INVEGEM**  
INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA DE LAS  
ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS

---

Santa Lucia Milpas Altas Sacatepéquez 21 de abril de 2022

A QUIEN INTERESE

Reciba un cordial saludo, esperamos sus actividades diarias sean un éxito. Por este medio le hacemos saber que la estudiante Daniella Marie Roque, realizará en INVEGEM su proyecto de investigación, el cual consiste en la estandarización de una prueba de detección de variantes en el gen *GJB6*. Para esto utilizará leucocitos extraídos a partir de sangre periférica de personas con sordera, que fueron caracterizadas para el gen *GJB2* durante los años 2015 a 2021. A dichas muestras se les asignará un nuevo código con el fin de que Daniella no tenga acceso a la información personal de los pacientes.

Agradeciendo su autorización y atención a la presente, nos suscribimos.

Atentamente,

Dr. Mauricio Villegas Fortuny  
Gerente de la Unidad Técnica de Laboratorios

Dr. Rolando José Obiols Escobar  
Gerente de la Unidad Técnica Administrativa



## D. Consentimiento informado del estudio del origen de las muestras



# INVEGEM

Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA  
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**



### Consentimiento informado para pruebas Genéticas

#### 1. Título del proyecto

**“Estudios genéticos de deficiencias auditivas”**

(Esta es una investigación de tipo genética, es decir investigación de los genes. Los genes controlan la herencia transmitida de padres a hijos. La investigación Genética es necesaria por muchas razones como: Aumentar el conocimiento médico; desarrollar nuevos fármacos o medicinas; nuevas pruebas y nuevos tratamientos, y obtener información útil sobre seguridad y salud pública)

#### 2. Investigador Principal

**Dra. Claudia Carranza**

#### 3. Institución

INVEGEM, Guatemala y Universidad de MIAMI

El presente documento es un consentimiento informado que le brindará a usted y su familia información importante sobre el estudio. Puede que el documento contenga palabras que usted no entienda. Por favor pregunte al investigador encargado o a cualquier personal del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente. Usted puede llevarse a su casa una copia de este documento para pensar sobre este estudio o para discutir con su familia o amigos antes de tomar la decisión de participar en él.

#### INTRODUCCIÓN

Usted o su hijo(a) ha sido invitado a participar en esta investigación. Antes de que usted decida participar en él, por favor lea este documento cuidadosamente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

#### PROPÓSITO DEL ESTUDIO

El propósito del presente estudio es identificar los factores genéticos que contribuyen o causan la pérdida de la audición. Una vez identificados, estos factores podrán estudiarse con mayor detalle a fin de conocer como contribuyen a la deficiencia auditiva. En última instancia, este tipo de investigación puede dar como resultado un mejor diagnóstico de su enfermedad, un mejor tratamiento y, posiblemente, la prevención. También le ayudará para



# INVEGEM

Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA  
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

---

orientar a su hijo(a) sobre las posibilidades de que él o ella tengan hijos con deficiencia auditivas.

Se le proporcionó este formulario, debido a que se desea incluir información y muestras biológicas suyas o de su hijo(a) en investigaciones genéticas y porque se quiere guardar estas muestras para investigaciones futuras. No se le puede prometer ni a usted ni a su hijo(a) ningún beneficio directo de esta investigación, pero las personas que participan en investigaciones médicas a menudo hablan sobre la satisfacción que tienen. Es importante que hable con su médico, audiólogo, enfermero o asesor genético si tiene preguntas o inquietudes acerca del estudio de investigación o acerca de la información contenida en este documento.

## **PARTICIPANTES**

Las personas que podrán participar en este estudio deberán tener un diagnóstico confirmado y documentado de deficiencia auditiva no-sindrómica pre lingüística y además cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

### **Criterios de inclusión:**

- Hipoacusia de origen genético: No-sindrómica y/o sindrómica.
- Deficiencia auditiva demostrable a partir de 25 dB.
- Deficiencia unilaterales y bilaterales.
- Cualquier tipo de Herencia: (indicar el tipo de herencia en el árbol genealógico):
  - Herencia recesiva
  - Herencia autosómica
  - Herencia ligada al X
  - Herencia Mitocondrial
- Casos familiares (en casos familiares tomarle a toda la familia que está afectada por) o casos esporádicos.
- Edad de 0 a 99 años.
- Evaluación audiológica que evidencie la deficiencia auditiva. Esta puede ser únicamente: audiometría tonal, potenciales evocados de tallo cerebral o potenciales evocados de estado estable.

### **Criterios de exclusión:**

- Hipoacusias de origen no genético.
- Hipoacusias de causa ambiental.



# INVEGEM

Rozas Botrán ONG

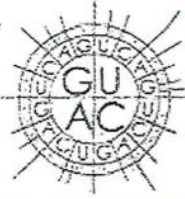
**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA  
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

Con el fin de identificar la causa genética de la hipoacusia en Guatemala, este estudio requiere su participación o la de su hijo(a), ya que reúne los criterios de inclusión para colaborar con el estudio. **Su participación o la de su hijo(a) es completamente voluntaria y puede abandonar el estudio en cualquier momento sin ser penalizado.**

## PROCEDIMIENTOS

Se solicita que usted y/o su hijo(a) otorguen el consentimiento a los puntos que se presentan a continuación.

- (a) **Antecedentes médicos familiares.** Una entrevista telefónica o directa (en persona) Para analizar los antecedentes de factores de riesgo familiar, médico y/o ambiental.
- (b) **Muestra de sangre.** Extracción de hasta 40 ml (menos de 3 cucharadas) de sangre mediante la punción de una vena.
- (c) **Estudios de cromosomas.** Consisten en el uso de una parte de la muestra de sangre de usted o de su hijo(a) con el fin de identificar cambios en los cromosomas. Los cromosomas son estructuras que se encuentran en las células y que contienen la información genética. Los estudios de cromosomas pueden ayudar a localizar un gen o genes para la sordera. Si se realizan estos estudios, los resultados estarán disponibles para que su proveedor de atención médica los interprete, después de que usted o su hijo(a) presenten una solicitud por escrito.
- (d) **Muestra de saliva e hisopado de la mejilla.** La extracción de células del interior de su boca o de la boca de su hijo(a) utilizando un kit para la toma de muestras de saliva o un cepillo tipo hisopo de cerdas suaves. La obtención de saliva supone escupir una pequeña cantidad de saliva dentro de un recipiente. La extracción de células mediante un cepillo tipo hisopo consiste en girar el cepillo dentro de cada mejilla durante 30 segundos. Ninguno de los métodos es doloroso ni implica el uso de agujas ni la punción de la piel.
- (e) **Proporcionar una muestra de su ADN o del ADN de su hijo(a) a partir de una fuente biológica preexistente para el uso en este estudio de investigación.**
- (f) **Línea celular.** Uso de una muestra de su sangre o de la sangre de su hijo(a) para crear una línea celular para esta investigación. Una línea celular es una muestra de tejido que sigue reproduciéndose. Por lo tanto, puede proporcionar una fuente ilimitada de ADN para utilizar en este estudio. Esta línea celular puede conservarse durante el tiempo que dure el estudio.



# INVEGEM

Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA  
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

## **RIESGOS**

Los riesgos de la extracción de sangre incluyen: desmayos, molestias temporales y/o moretones en el lugar de la punción. En raras ocasiones se puede producir una infección o un pequeño coágulo o inflamación en la vena y el área circundante.

Los riesgos de obtener una biopsia de piel son los siguientes: Resentimiento en el área durante varios días luego del procedimiento, molestias temporales y/o moretones en el lugar de la punción, hinchazón local, hipersensibilidad o alergia a la xilocaína y, en casos poco probables, infección. El lugar de la biopsia cicatrizará al cabo de varias semanas y quedará una pequeña cicatriz.

Además de los riesgos mencionados anteriormente, es posible que haya otros riesgos derivados de la investigación genética que todavía no conocemos.

## **BENEFICIOS**

Se brindará la adecuada consejería genética según los resultados obtenidos en cada familia. La investigación está diseñada para beneficiar a la sociedad a través de la adquisición de nuevos conocimientos. Ni usted ni su hijo(a) se beneficiarán personalmente por participar en este estudio de investigación. Al descubrir los genes que originan la sordera, esperamos conocer las causas de por qué ocurre ésta y cómo se pueden mejorar los tratamientos futuros.

## **COSTOS Y COMPENSACIÓN**

Ni usted ni su hijo(a) tendrán que afrontar costo alguno por participar en este estudio de investigación.

No se le pagará por el uso de muestras de sangre o de tejido que pertenezcan a usted o a su hijo(a), por la información que éstas contengan, ni por la información recopilada.

INVEGEM será dueño de los derechos sobre cualquier fármaco, prueba y/o tratamiento que se desarrolle a partir de la investigación de sus muestras de sangre o tejido.

## **PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD**

Si usted elige participar en este estudio o que su hijo(a) participe, el investigador del estudio conseguirá información personal sobre usted o su hijo(a). También puede conseguir información sobre su salud o la de su hijo(a) incluyendo, expedientes médicos actuales y del pasado que pueden incluir resultados de laboratorios, placas o exámenes físicos.

Los resultados de esta investigación pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en las reuniones médicas, pero su identidad o la de su hijo(a) no será



# INVEGEM

Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA  
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

---

**divulgada. La información de su salud o la de su hijo(a) será mantenida tan confidencial como sea posible bajo la ley.** Esta autorización servirá hasta el final del estudio, a menos que usted la cancele antes. Usted puede cancelar esta autorización en cualquier momento enviando un aviso escrito al Investigador Principal: Dra. Claudia Carranza, Coordinadora de Laboratorios INVEGEM al número de teléfono: 40507444 o al correo electrónico: [ccarranza@invegem.org](mailto:ccarranza@invegem.org).

Si usted cancela esta autorización, el Investigador Principal no usará ni divulgará su información personal, de salud o la de su hijo(a). La autorización para el uso y el acceso de la información protegida de la salud para los propósitos de la investigación es totalmente voluntaria.

## **PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIOS**

**Su participación o la de su hijo(a) en este estudio es voluntaria.** Usted puede decidir participar, retirarse, que su hijo(a) participe o se retire del estudio en cualquier momento, su decisión no resultará en ninguna penalidad.

## **UTILIZACIÓN DE MUESTRAS Y RESULTADOS**

La muestra de sangre periférica o biopsia de piel obtenida de usted y/o hijo(a) será utilizada para el presente estudio, en coordinación con INVEGEM y la Universidad de Miami, y podrá salir del país para futuras investigaciones que se consideren pertinentes. El análisis se realizará en INVEGEM en conjunto con la Universidad de Miami. Se podrá almacenar su muestra y/o la de su hijo(a) para futuros estudios dentro de las instalaciones de INVEGEM por un período aproximado de 10 años, y se podrá utilizar para otros estudios que ayuden al conocimiento de la hipoacusia congénita.

## **PREGUNTAS**

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio, sobre su participación o la de su hijo(a) usted puede contactar a: Dra. Claudia Carranza, Coordinadora de Laboratorios INVEGEM Tel. 40507444, Correo electrónico: [ccarranza@invegem.org](mailto:ccarranza@invegem.org).

## **OTROS ASPECTOS DE INTERÉS:**

- Si existiera información de relevancia en el presente estudio se le dará conocimiento del mismo.
- No se dará ningún tipo de compensación para la participación, su participación o la de su hijo(a) es totalmente voluntaria.
- No existe ningún conflicto de interés con respecto al patrocinio del proyecto ni en el equipo investigador.

No firme este consentimiento a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y recibir contestaciones satisfactorias.



# INVEGEM

Rozas Botrán ONG

INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS

## DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Señores  
Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas  
INVEGEM

Yo, [REDACTED] (nombre y apellidos) de [REDACTED] años edad y con cédula de vecindad o DPI [REDACTED] he sido infirmado/a sobre mi participación; o la de mi hijo [REDACTED] en el proyecto "Estudios Genéticos de deficiencias auditivas" en el que se tomará una muestra de sangre periférica o biopsia de piel para la realización de las pruebas necesarias. El resultado de la prueba de brindará información sobre las causas genéticas de la hipoacusia.

El procedimiento de extracción de sangre periférica o biopsia de piel constituye un procedimiento seguro para mi salud y sin complicaciones importantes o que afecten mi integridad física.

Autorizo el uso de la muestra de sangre periférica o biopsia para la presente investigación y otras investigaciones que contribuyan a conocer más sobre el comportamiento y tratamiento de la enfermedad.

Por lo tanto, otorgo mi consentimiento para la extracción de sangre periférica o biopsia y uso de los resultados para la presente y futura investigación. Comprendo que mis datos pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en reuniones médicas, pero mi identidad no será divulgada.

Fecha:

Firma del Paciente o huella digital: X

Firma del médico/persona que realizó la extracción: [REDACTED]

Sello de la  
institución



### INVEGEM

INVEGEM / ROZAS BOTRÁN ONG  
Instituto para la Investigación Científica y Educación  
de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas  
Humanas

## E. Concentraciones de ADN de muestras

Las lecturas de las muestras fueron divididas por dos debido a que se agregaron 2  $\mu\text{L}$  para la reacción de cuantificación. Después se utilizó la fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$  para la dilución de muestras a  $50\text{ng}/\mu\text{L}$  y se calculó el volumen de agua necesario para realizar la dilución.

Fórmula:

$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{C_1}$$

**Tabla 9.** Concentraciones y diluciones de muestras de ADN.

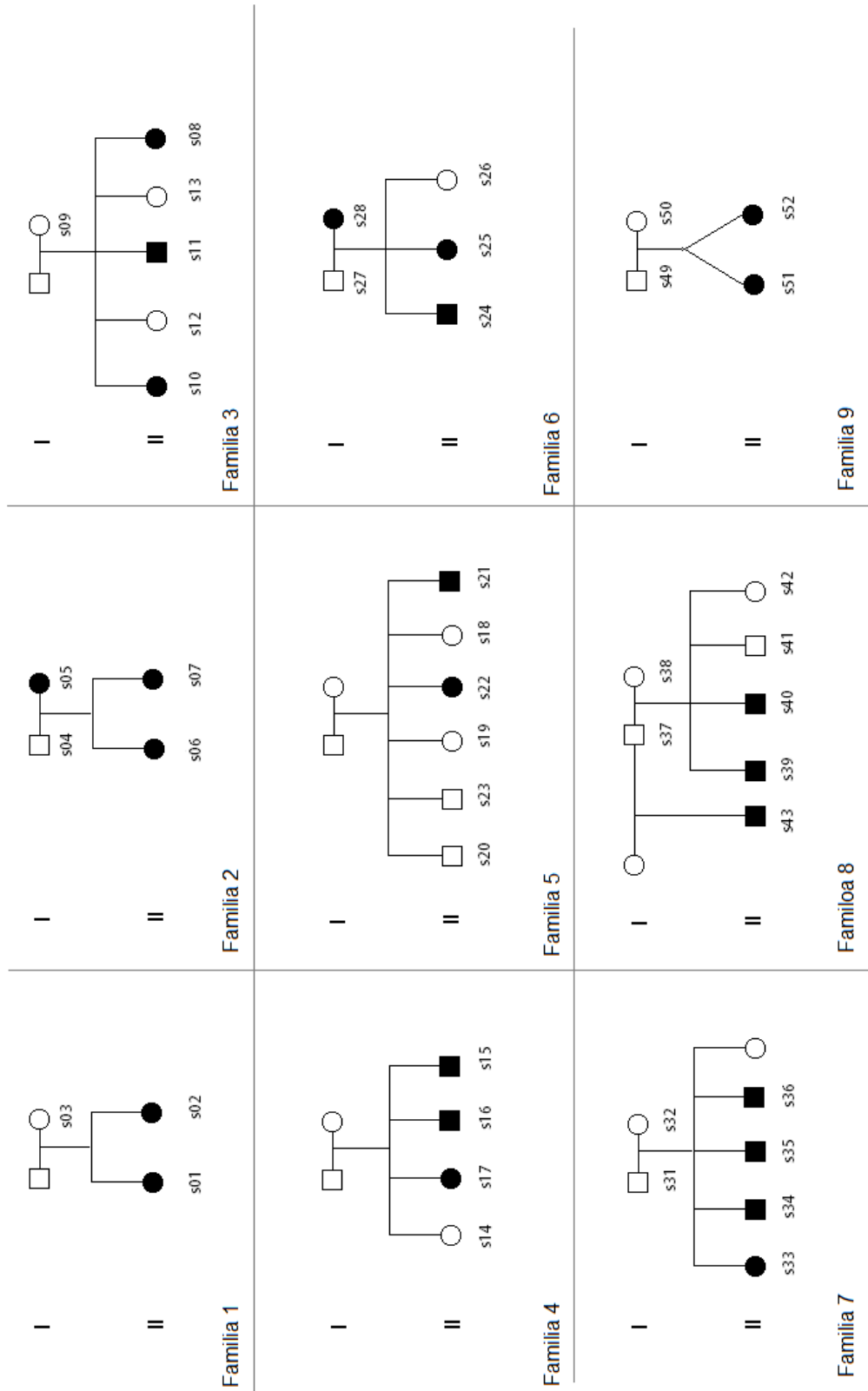
| Muestras | Lectura en QuantiFluor ST | Concentración de ADN $\text{ng}/\mu\text{L}$ | Cantidad de muestra $\mu\text{L}$ | volumen de agua para dilución $\mu\text{L}$ |
|----------|---------------------------|--|-----------------------------------|---|
| S1       | 200.9                     | 100.5  | 4.97                              | 5.03  |
| S2       | 219.9                     | 109.9  | 4.54                              | 5.46  |
| S3       | 223.2                     | 111.6  | 4.48                              | 5.52  |
| S4       | 230.6                     | 115.3  | 4.34                              | 5.66  |
| S5       | 229.5                     | 114.7  | 4.36                              | 5.64  |
| S6       | 129.3                     | 64.6   | 7.73                              | 2.27  |
| S7       | 224.9                     | 112.5  | 4.44                              | 5.56  |
| S8       | 234.6                     | 117.3  | 4.26                              | 5.74  |
| S9       | 240.5                     | 120.3  | 4.16                              | 5.84  |
| S10      | 234.3                     | 117.2  | 4.27                              | 5.73  |
| S11      | 249.0                     | 124.5  | 4.02                              | 5.98  |
| S12      | 275.0                     | 137.5  | 3.64                              | 6.36  |
| S13      | 204.9                     | 102.4  | 4.88                              | 5.12  |
| S14      | 220.8                     | 110.4  | 4.52                              | 5.48  |
| S15      | 207.2                     | 103.6  | 4.83                              | 5.17  |
| S16      | 225.9                     | 112.9  | 4.43                              | 5.57  |
| S17      | 225.8                     | 112.9  | 4.42                              | 5.58  |
| S18      | 222.5                     | 111.2  | 4.49                              | 5.51  |
| S19      | 227.7                     | 113.8  | 4.39                              | 5.61  |
| S20      | 181.8                     | 91.0   | 5.49                              | 4.51  |
| S21      | 237.3                     | 118.6  | 4.21                              | 5.79  |
| S22      | 226.9                     | 113.4  | 4.41                              | 5.59  |
| S23      | 270.0                     | 135.0  | 3.70                              | 6.30  |
| S24      | 243.3                     | 121.6  | 4.11                              | 5.89  |
| S25      | 236.4                     | 118.2  | 4.23                              | 5.77  |
| S26      | 269.6                     | 134.8  | 3.71                              | 6.29  |
| S27      | 236.6                     | 118.3  | 4.23                              | 5.77  |
| S28      | 238.1                     | 119.1  | 4.20                              | 5.80  |
| S29      | 329.5                     | 164.7  | 3.03                              | 6.97  |
| S30      | 167.3                     | 83.6   | 5.98                              | 4.02  |

(continuación de Tabla 9)

| <b>Muestras</b> | <b>Lectura en QuantiFluor ST</b> | <b>Concentración de ADN ng/μL</b> | <b>Cantidad de muestra μL</b> | <b>Volumen de agua para dilución μL</b> |
|-----------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---|
| S31             | 160.2                            | 80.1                              | 6.24                          | 3.76                                    |
| S32             | 234.1                            | 117.1                             | 4.27                          | 5.73                                    |
| S33             | 202.0                            | 101                               | 4.95                          | 5.05                                    |
| S34             | 164.5                            | 82.2                              | 6.08                          | 3.92                                    |
| S35             | 222.3                            | 111.2                             | 4.50                          | 5.50                                    |
| S36             | 226.1                            | 113.1                             | 4.42                          | 5.58                                    |
| S37             | 211.6                            | 105.8                             | 4.73                          | 5.27                                    |
| S38             | 228.2                            | 114.1                             | 4.39                          | 5.61                                    |
| S39             | 228.1                            | 114.1                             | 4.38                          | 5.62                                    |
| S40             | 233.3                            | 116.7                             | 4.28                          | 5.72                                    |
| S41             | 241.4                            | 121.0                             | 4.13                          | 5.87                                    |
| S42             | 207.7                            | 103.8                             | 4.81                          | 5.19                                    |
| S43             | 239.1                            | 120.0                             | 4.16                          | 5.84                                    |
| S44             | 216.2                            | 108.1                             | 4.63                          | 5.37                                    |
| S45             | 225.6                            | 112.8                             | 4.43                          | 5.57                                    |
| S46             | 281.1                            | 141.0                             | 3.55                          | 6.45                                    |
| S47             | 279.8                            | 139.9                             | 3.57                          | 6.43                                    |
| S48             | 217.7                            | 108.9                             | 4.59                          | 5.41                                    |
| S49             | 223.2                            | 112.0                             | 4.46                          | 5.54                                    |
| S50             | 237.3                            | 119.0                             | 4.20                          | 5.80                                    |
| S51             | 255.1                            | 128.0                             | 3.91                          | 6.10                                    |
| S52             | 253.2                            | 127.0                             | 3.94                          | 6.10                                    |
| S53             | 279.8                            | 139.9                             | 3.57                          | 6.43                                    |
| S54             | 251.3                            | 126.0                             | 3.97                          | 6.03                                    |



## F. Diagramas de familias con hipoacusia no síndrónica



## G. Datos demográficos e información de los pacientes analizados

**Tabla 10.** Datos de pacientes analizados

| Código | Edad | Sexo | Sordera          | Tipo        | Variantes patogénicas en <i>GJB2</i> |
|--------|------|------|------------------|-------------|--------------------------------------|
| S01    | 4    | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S02    | 13   | M    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S03    | 30   | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S04    | 56   | M    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S05    | 28   | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S06    | 12   | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S07    | 15   | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S08    | 9    | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S09    | 46   | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S10    | 24   | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S11    | 17   | M    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S12    | 28   | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S13    | 14   | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S14    | 22   | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S15    | 9    | M    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S16    | 15   | M    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S17    | 17   | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S18    | 48   | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S19    | 62   | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S20    | 88   | M    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S21    | 47   | M    | No<br>sindrómica | Postlingual | Negativo                             |
| S22    | 53   | F    | No<br>sindrómica | Postlingual | Negativo                             |
| S23    | 66   | M    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S24    | 16   | M    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S25    | 5    | F    | No<br>sindrómica | Prelingual  | Negativo                             |
| S26    | 2    | F    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S27    | 43   | M    | No<br>sordera    | No aplica   | Negativo                             |
| S28    | 38   | F    | No<br>sindrómica | Postlingual | Negativo                             |
| S29    | 10   | M    | No<br>sindrómica | Postlingual | Negativo                             |
| S30    | 17   | F    | No<br>sindrómica | Postlingual | Negativo                             |

(continuación de Tabla 10)

| <b>Código</b> | <b>Edad</b> | <b>Sexo</b> | <b>Sordera</b> | <b>Tipo</b> | <b>Variantes patogénicas en GJB2</b> |
|---------------|-------------|-------------|----------------|-------------|--------------------------------------|
| S31           | 37          | M           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S32           | 34          | F           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S33           | 13          | F           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S34           | 11          | M           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S35           | 10          | M           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S36           | 7           | M           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S37           | 40          | M           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S38           | 38          | F           | No sindrómica  | No aplica   | Negativo                             |
| S39           | 18          | M           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S40           | 8           | M           | No sordera     | Prelingual  | Negativo                             |
| S41           | 7           | M           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S42           | 5           | F           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S43           | 21          | M           | No sindrómica  | Postlingual | Negativo                             |
| S44           | 11          | M           | No sindrómica  | Postlingual | Negativo                             |
| S45           | 14          | F           | No sindrómica  | Postlingual | Negativo                             |
| S46           | 8           | F           | No sindrómica  | Postlingual | Negativo                             |
| S47           | 16          | F           | No sindrómica  | Postlingual | Negativo                             |
| S48           | 35          | F           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S49           | 24          | M           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S50           | 24          | F           | No sordera     | No aplica   | Negativo                             |
| S51           | 4           | F           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S52           | 4           | F           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S53           | 14          | M           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |
| S54           | 36          | F           | No sindrómica  | Prelingual  | Negativo                             |

## H. Script utilizado para el análisis bioinformático de secuencias

### 1. Instalación ambiente anaconda

```
conda env create --name VariantCall-ENV --file environment.yaml
```

### 2. Emboss seqret

#### Transformación de formato ab1 a fastq

```
cd Secuencias/  
for file in *.ab1; do  
    seqret -sformat abi -osformat fastq -auto -stdout -sequence "$file" > "${basename "$file" .ab1}.fastq"  
done
```

### 3. Quality control

#### Se removieron las bases de mala calidad

```
cd Secuencias/  
for infile in *F.fastq; do  
  
    base=$(basename ${infile} F.fastq)  
    trimmomatic PE ${infile} ${base}R.fastq \  
        ${base}_F.trim.fastq ${base}_Fun.trim.fastq \  
        ${base}_R.trim.fastq {base}_Run.trim.fastq \  
        LEADING:20 MINLEN:25 -phred33  
  
done  
cd ..
```

### 4. Alineamiento a un genoma de referencia

#### 4.1 Descarga genoma de referencia

```
mkdir reference/  
cd reference/  
wget http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/bigZips/chromFa.tar.gz
```

```
tar zvfX chromFa.tar.gz
cat *.fa > hg19.fa
rm chr*.fa
cd ..
```

## 4.2 Index genoma de referencia

```
bwa index reference/hg19.fa
```

## 4.3 Alinear secuencias contra genoma de referencia

```
mkdir results
cd results
mkdir -p sam bam bcf vcf
for fq1 in ../Secuencias/*_F.trim.fastq
do
    echo "working with file $fq1"

    base=$(basename $fq1 _F.trim.fastq)
    echo "base name is $base"

    fq1=../Secuencias/${base}_F.trim.fastq
    fq2=../Secuencias/${base}_R.trim.fastq
    bwa mem ../reference/hg19.fa $fq1 $fq2 > sam/${base}.aligned.sam

    samtools view -S -b sam/${base}.aligned.sam > bam/${base}.aligned.bam

    samtools sort -o bam/${base}.aligned.sorted.bam bam/${base}.aligned.bam

    samtools index bam/${base}.aligned.sorted.bam

    bcftools mpileup -O b -o bcf/${base}_raw.bcf -f ../reference/hg19.fa bam/${base}.aligned.sorted.bam

    bcftools call -m -v -Ou -o vcf/${base}_variants.vcf bcf/${base}_raw.bcf

    vcfutils.pl varFilter vcf/${base}_variants.vcf > vcf/${base}_final_variants.vcf

donem
```