

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Detección de la presencia de mutaciones en el exón 2 del gen  
GJB2 que codifica la conexina 26 por medio de la técnica  
“PCR-SSCP”**

**Karen Sofía Hernández Vega**

Guatemala,

2009



**Detección de la presencia de mutaciones en el exón 2 del gen  
GJB2 que codifica la conexina 26 por medio de la técnica  
“PCR-SSCP”**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

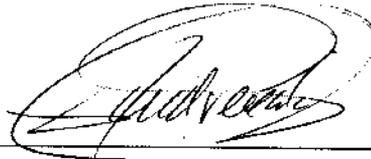


**Detección de la presencia de mutaciones en el exón 2 del gen  
GJB2 que codifica la conexina 26 por medio de la técnica  
“PCR-SSCP”**

Trabajo de investigación presentado por  
Karen Sofía Hernández Vega para optar al grado académico de  
Licenciada en Bioquímica y Microbiología.

Guatemala,  
2009

**Vo. Bo. Asesor Principal**



---

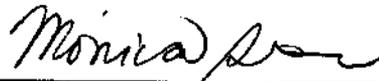
Lic. Andrés Ávalos

**Tribunal**



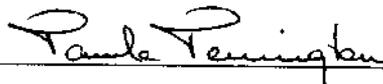
---

Lic. Andrés Ávalos



---

Dra. Mónica Stein



---

Dra. Pamela Pennington

**Fecha de aprobación:**

Guatemala, 2 de diciembre de 2009

## **PREFACIO**

Este trabajo de investigación es un componente de un estudio pionero en Guatemala. Este estudio, pretende conocer más sobre las mutaciones que causan hipoacusia en la población guatemalteca. Esta investigación se llevó a cabo en conjunto con la Dra. Yomara Bustamante, quien apoyó con la parte clínica. Además, se contó con el apoyo económico y científico del Instituto de Investigación Genética INVEGEM, así como apoyo institucional del Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala.

Para la realización de este estudio brindaron un valioso aporte innumerables personas, quienes han estado presentes en distintas etapas del proceso.

Deseo agradecer al Dr. Gabriel de Jesús Silva Arévalo por permitirme ser parte del equipo de INVEGEM. Al equipo de GENLAB por compartir experiencias dentro y fuera del laboratorio, especialmente al Lic. Andrés Ávalos y a la Licda. Elena Dardón por promover el trabajo científico y brindar un asesoramiento constante. A la Dra. Yomara Bustamante por el arduo trabajo de contactar a los sujetos para el estudio y coleccionar las muestras.

Al Dr. Daryl Scott y a David Pearson, por la generosa colaboración con la secuenciación de las muestras.

Agradezco a la Dra. Pennington por su disposición para ayudarme a avanzar con el proyecto de tesis. De igual manera, a la Licda. Margarita Palmieri por el respaldo para llevar a cabo la parte del análisis por SSCP en el laboratorio de Biología Molecular, Laboratorio de Protección Vegetal.

A mis amigos y amigas de la Universidad del Valle y del Laboratorio de Protección Vegetal, que me animaron de muchas maneras y me apoyaron con sus consejos en todo momento.

Por último, le agradezco a Dios por la vida, la oportunidad y la guía que me dio para concluir esta etapa estudiantil. A la vez agradezco a mis padres por brindarme todo lo necesario y por estar a mi lado incondicionalmente. Gracias a mi hermana Kenia, a mi hermano Gabriel y a Oscar, por su cariño y paciencia.

# ÍNDICE

LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes .....	1
1. Hipoacusia congénita neurosensorial y loci con mutaciones .....	1
2. Mutaciones: generalidades y nomenclatura .....	5
3. Diagnóstico clínico de hipoacusia .....	6
4. Proteínas conexinas .....	7
5. Gen GJB2: Generalidades y mutaciones.....	9
6. Detección de variantes de GJB2.....	10
7. SSCP ( <i>Single-Strand Conformation Polymorphisms</i> ) .....	11
8. Hipoacusia en Guatemala.....	14
9. Consejería genética.....	15
B. Justificación.....	17
C. Objetivos. ....	18
D. Hipótesis de trabajo .....	18
II. MÉTODOS .....	19
A. Procedimientos .....	19
B. Análisis estadístico.....	30
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
IV. CONCLUSIONES.....	47
V. RECOMENDACIONES.....	48
VI. LITERATURA CITADA .....	49

VII. APÉNDICES.....	53
Apéndice. 1    Constancia de aprobación del protocolo de toma de muestras, por la Universidad de San Carlos (Página 1 de 2) .....	53
Apéndice. 2    Incisos relacionados con la obtención de información de sujetos y muestras de sangre planteados por la Dra. Yomara Bustamante. ....	55
Apéndice. 3    Certificado del curso en línea “Protecting Human Research Participants” ...	57
Apéndice. 4    Formulario CE-LVII: Lista de verificación del investigador .....	57
Apéndice. 5    Formulario CE-ARP1: Solicitud de aprobación rápida de protocolo .....	57
Apéndice. 6    Formulario de Consentimiento informado.....	62
Apéndice. 7    Cuestionario del sujeto para toma de muestra.....	64
Apéndice. 8    Secuencia consenso de la región codificante del exón 2 del gen GJB2, con nucleótidos adyacentes. ....	65
Apéndice. 9    Cuantificación y pureza de extracciones de ADN de las muestras .....	66
Apéndice. 10   Figuras obtenidas de la optimización del PCR para los fragmentos del exón 2 GJB2. ....	67
Apéndice. 11   Cálculo de los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para la detección de mutaciones en Fragmento A1, por método PCR-SSCP. ....	69
Apéndice. 12   Diez productos inespecíficos obtenidos por análisis Primer-BLAST para el par de iniciadores para el Fragmento A del exón 2 GJB2 (Fragmentos menores de 1000 pb)..	70
Apéndice. 13   Alineamiento de secuencias del ADN de muestras con mutaciones en el exón 2 del gen GJB2. ....	72
Apéndice. 14   Alineamiento de secuencias de aminoácidos obtenidas por la traducción del ADN de muestras con mutaciones en el exón 2 del gen GJB2. ....	75
Apéndice. 15   Comparación de costos de detección de presencia de mutaciones por PCR-SSCP y por secuenciación.....	76
Apéndice. 16   Valores obtenidos de los geles de SSCP analizados con el programa computacional TotalLab 120 v.9. ....	77

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Mutaciones básicas a nivel de ADN .....	5
Cuadro 2. Mutaciones básicas a nivel de proteínas.....	6
Cuadro 3. Mutaciones más comunes causantes de hipoacusia no sindrómica autosómica de tipo recesivo en el gen GJB2. ....	10
Cuadro 4. Población estimada para la condición de HANSAR en la población infantil guatemalteca.....	14
Cuadro 5. Descripción de las etapas a seguir para el manejo de la consejería genética .....	16
Cuadro 6. Información de iniciadores para amplificar exón 2 de GJB2 en dos fragmentos. ....	23
Cuadro 7. Programa de PCR para la amplificación del exón 2 del gen GJB2.....	27
Cuadro 8. Mezcla de PCR para amplificar el exón 2 del gen GJB2 .....	27
Cuadro 9. Receta para preparar la mezcla de poliacrilamida para dos geles de SSCP, sin glicerol.....	28
Cuadro 10. Descripción de muestras incluidas en el estudio y resultados obtenidos por secuenciación y por PCR-SSCP. ....	33
Cuadro 11. Resumen de las mutaciones detectables en el exón 2 GJB2, por la técnica PCR-SSCP con las condiciones ensayadas. ....	42
Cuadro 12. Datos de cuantificación y pureza de la extracción de ADN de las muestras. ....	66
Cuadro 13. Comparación del costo de detección de mutaciones por muestra, por la prueba PCR-SSCP y por secuenciación. ....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las causas de hipoacusia en la infancia. ....	3
Figura 2. Loci causantes de hipoacusia de tipos recesivos y dominantes.....	4
Figura 3. Topología estructural de las conexinas.....	8
Figura 4. Ideograma de la localización del gen GJB2 en el cromosoma 13.....	9
Figura 5. Ideograma de las regiones codificantes y no traducidas del gen GJB2.....	9
Figura 6. Diagrama de flujo del procesamiento de muestras.....	21
Figura 7. Diagrama de flujo de proceso de optimización amplificación por PCR de los fragmentos del exón 2 GJB2 .....	25
Figura 8. Degradación de ADN en muestras sanguíneas extraídas por método Lahiri y Schnabel (1993).....	34
Figura 9. Diagrama de los fragmentos generados para amplificar el exón 2 de GJB2 en dos fragmentos.....	35
Figura 10. Efecto de los estabilizadores de enzima (seroalbúmina bovina [BSA] y dimetilsulfóxido [DMSO]) sobre la amplificación del fragmento A a distintas temperaturas de anillamiento.....	36
Figura 11. Amplificación de Fragmentos A (463 pb), A1 (444pb) y A2 (517 pb) a distintas temperaturas de anillamiento.....	37
Figura 12. Amplificación de Fragmentos B (490 pb) y B1 (447 pb) a distintas temperaturas de anillamiento. ....	38
Figura 13. Efecto del glicerol en la migración de Fragmentos A, B y B1; visualización de bandas agregando 2 – 5 ul de de muestra (vol.) y detección de bandas por el software TotalLab.....	39
Figura 14. Comparación del patrón de migración de los productos de PCR en fragmentos (A1, B) y producto completo del exón 2 GJB2.. ....	40
Figura 15. Patrón de migración del fragmento A1 en geles SSCP para las muestras con la mutación detectable W44X (H18, H8, H54).....	41
Figura 16. Patrón de migración del Fragmento B de muestras en gel no desnaturizante de poliacrilamida al 11% (SSCP).....	42

Figura 17. Migración de muestras y del marcador molecular (MM) en los carriles de los extremos del gel de poliacrilamida no desnaturizante al 11% (SSCP). .....	43
Figura 18. Patrones de migración para el Fragmento B en todos los carriles del gel poliacrilamida no desnaturizante al 11% (SSCP). .....	44
Figura 19. Repetibilidad de muestras en un gel, para la técnica de PCR-SSCP. ....	45
Figura 20. Curva de concentraciones de ADN plantilla para la amplificación de los fragmentos A y B en volúmenes de reacción de 12.5 ul. ....	67
Figura 21. Productos de amplificación por PCR de los Fragmentos A1 y B de muestras. ....	67
Figura 22. Análisis por PCR-SSCP del Fragmento A de muestras. ....	68
Figura 23. Migración en gel de SSCP, de muestras con mutaciones en Fragmento A1. ....	68

## RESUMEN

En las últimas décadas, más de 90 distintas mutaciones se han detectado en el gen que codifica la proteína conexina 26 (GJB2), siendo muchas las causantes de sordera. La sordera o hipoacusia es el desorden sensorial heredado con mayor prevalencia en la población humana (1 - 3 de cada 1000 nacidos vivos). Para proveer una intervención y tratamiento adecuado a este desorden sensorial, es necesario conocer de manera certera la etiología.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo utilizar la técnica molecular PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction* asociado al análisis por *Single-Strand Conformation Polymorphism*) como un método de detección de la presencia de mutaciones en el exón 2 de GJB2, para comparar los resultados con el método de secuenciación. Previo al análisis por PCR-SSCP se obtuvo la secuencia de 16 muestras sanguíneas de sujetos con hipoacusia no sindrómica recesiva. De estas, 9 presentaron mutaciones en la región a analizar, y 7 no tenían mutaciones. Se extrajo el ADN haciendo uso de un kit comercial, para procesar así, un total de 19 muestras. Entre los reactivos se contó con estabilizadores de enzima Taq polimerasa, y 7 iniciadores para optimizar la amplificación por PCR del exón 2 en dos fragmentos. Posteriormente se realizó un análisis para las condiciones de la prueba de SSCP: migración de las muestras en geles de poliacrilamida al 11%, con y sin glicerol, y con distintas condiciones eléctricas.

Los iniciadores escogidos para la amplificación por PCR produjeron un fragmento de 444pb y otro de 490pb, con apropiada especificidad. El análisis por SSCP presentó dos bandas definidas para cada fragmento en geles sin glicerol. Fue posible establecer un patrón de migración para ambos fragmentos de las muestras sin mutaciones. Las tres muestras con mutaciones contaban con la V27I, que es un polimorfismo. Sin embargo, se logró visualizar una migración distinta, solamente para la muestra que además contenía la mutación que codifica para un codón “alto” en lugar de triptófano (W44X). Por ello, bajo las condiciones experimentales, la sensibilidad de la prueba PCR-SSCP fue de 33% (I.C. al 90% 8 - 59%) y la especificidad de 100% (I.C. al 90% 100%), estos valores no fueron estadísticamente significativos ya que el valor p de la prueba exacta de Fisher tuvo un valor de 0.087. Los valores de VPP y de VPN fueron de 100% y 70%, respectivamente.

Se recomienda mantener el voltaje estable durante el tiempo de corrida, ya que sus variaciones inciden considerablemente en la uniformidad de las corridas electroforéticas. Para determinar si la validez de esta prueba puede aumentar, se recomienda analizar muestras de pacientes con distintas mutaciones.

# I. INTRODUCCIÓN

La técnica de PCR-SSCP es un método simple, barato y sensible que permite la detección de cambios de tan sólo un nucleótido en el ADN entre muestras, sin necesidad de secuenciar la totalidad de ellas, ni hacer uso de materiales radioactivos. Con esta técnica se desea detectar la presencia de mutaciones causantes de hipoacusia no sindrómica autosómica de tipo recesivo (HANSAR) en el exón 2 del gen GJB2, a partir de muestras de sangre completa.

En Guatemala no se cuenta con una técnica para detectar mutaciones causantes de sordera. La secuenciación es el método más moderno que existe actualmente, pero su costo es elevado para ponerlo a disposición de la población con hipoacusia, que desea conocer la etiología de su condición. Este estudio pretende determinar si la técnica de PCR-SSCP permite detectar la presencia de mutaciones, al determinar su sensibilidad y especificidad en base a la técnica de secuenciación. Esto incluye establecer las condiciones para la amplificación por PCR, de fragmentos del exón 2 del gen GJB2 que generen información de patrones de migración electroforética en geles no desnaturizantes de poliacrilamida (SSCP).

En este estudio se logró determinar dos pares de iniciadores para el PCR y las condiciones adecuadas para generar la amplificación de dos fragmentos del exón 2 de GJB2. Además bajo las condiciones de la prueba SSCP ensayadas, fue posible observar patrones definidos para las muestras sin mutaciones. Debido a la falta de muestras con distintas mutaciones confirmadas por secuenciación (necesarias para realizar la comparación), solamente fue posible detectar un patrón electroforético distinto causado por una mutación, entre las siete mutaciones analizadas.

## A. Antecedentes

1. Hipoacusia congénita neurosensorial y loci con mutaciones. La hipoacusia, comúnmente llamada sordera, es el desorden sensorial heredado con mayor prevalencia en la población humana, afectando de 1 a 3 infantes de cada 1000 nacidos vivos (Kelsell *et al.* 1999; Kenneson *et al.* 2002). La hipoacusia consiste en la pérdida permanente de la audición, de manera bilateral o unilateral, sensitiva o conductiva, y oscila en 30 decibeles

(dB) o más en la frecuencia de la región importante para el reconocimiento del habla (Resendes *et al.* 2001).

La hipoacusia se puede describir por las siguientes manifestaciones clínicas:

a. Momento de inicio:

- 1) Aparición respecto al desarrollo del habla:
  - 2) Prelocutiva (0 a 2 años de edad).
  - 3) Perilocutiva (aparecen entre 2 y 4 años)
  - 4) Postlocutiva (después de que las adquisiciones lingüísticas están consolidadas).
- Todas las hipoacusias congénitas son prelocutivas (Smith y Van Camp 2007).

b. Aparición respecto a los períodos del desarrollo infantil:

- 1) Prenatal
- 2) Perinatal
- 3) Postnatal

c. Lugar de la lesión:

- 1) Conductiva o de transmisión, resulta de anomalías en el oído externo u oído medio.
- 2) Neurosensorial o de percepción, se debe al daño en estructuras del oído interno o el resto de la vía auditiva central.
- 3) Mixta, es la combinación de hipoacusia conductiva y neurosensorial.
- 4) Disfunción auditiva central, se debe a disfunciones a nivel nervioso o cerebral. (Smith y Van Camp 2007).

d. Severidad:

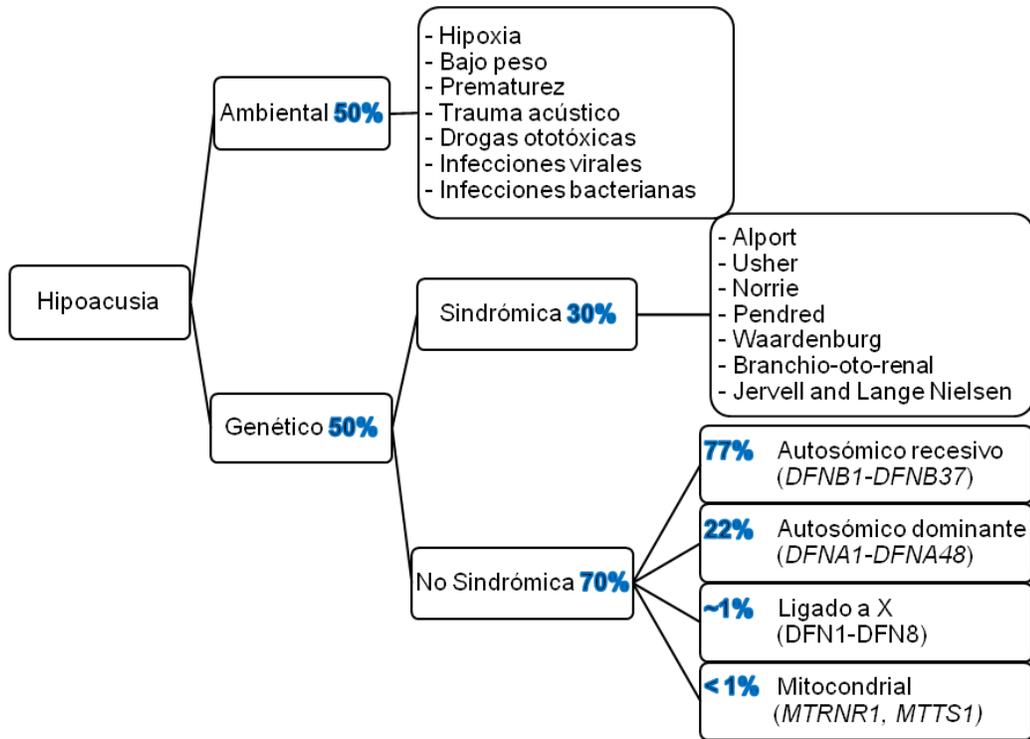
El sonido se mide en decibeles, por ello la severidad de la pérdida de audición se clasifica en:

- 1) Suave (26-40 dB)
- 2) Moderada (41-55 dB)
- 3) Moderadamente severa (56-70 dB)
- 4) Severa (71-90 dB)
- 5) Profunda (>90 dB) (Smith y Van Camp 2007).

El número de casos de hipoacusia atribuidos a causas ambientales y a factores genéticos es aproximadamente el mismo. Cuando la causa es genética, se sub-clasifica en sindrómica y no sindrómica. En el primer caso, la pérdida de la audición está asociada a malformaciones externas del oído u otros órganos o problemas en otros sistemas corporales. La hipoacusia no sindrómica no está asociada a anormalidades médicas o del oído externo, sin embargo sí puede estar asociada a anormalidades del oído medio. (Resendes *et al.* 2001, Smith y Van Camp 2007).

La pérdida de audición no sindrómica se puede subdividir en base al modo de herencia como se muestra en la Figura 1. Se le llama autosómica debido a que las mutaciones se encuentran en uno o varios de los cromosomas no sexuales (1 al 22). La prevalencia de personas con mutaciones con herencia recesiva predomina respecto a la de herencia dominante.

Figura 1. Distribución de las causas de hipoacusia en la infancia (adaptado de Resendes *et al.* 2001; Smith y Van Camp 2007).

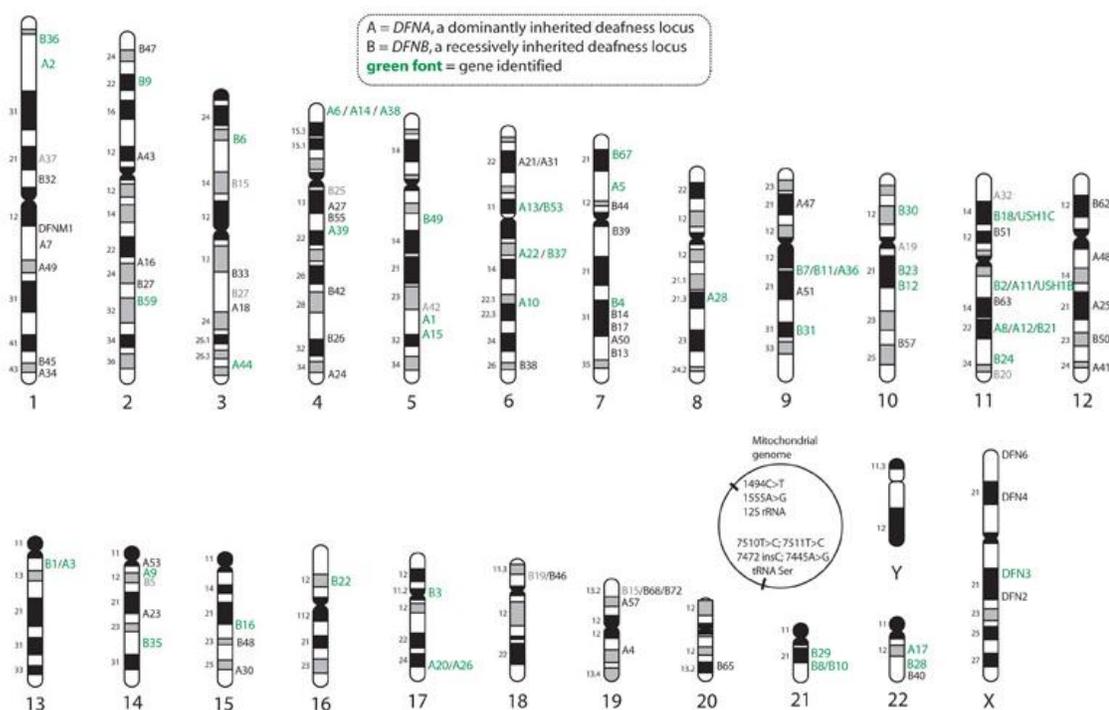


Con los datos de la prevalencia mostrados en la figura anterior, se puede estimar que la prevalencia de la condición HANSAR en la población general es de 0.054%.

Un locus (plural = loci) es el lugar específico que ocupa un gen. En el caso de las mutaciones recesivas los loci se denominan *DFNB1* al *DFNB48* (donde el significado es: DFN, *deafness* (sordera); B, recesivo; número, orden de descubrimiento). Los loci dominantes se

denotan “*DFNA*” y los loci ligados al sexo (ligados al cromosoma X), como “*DFN*” (Green *et al.* 1999). Además se han detectado loci ligados a sordera en el genoma mitocondrial (ver la siguiente figura).

Figura 2. Loci causantes de hipoacusia de tipos recesivos y dominantes (adaptado de Resendes *et al.*)



Se estima que el número y tipos de loci causantes de la hipoacusia no sindrómica, basándose en el análisis de ligamiento (filogenético) son: 30 autosómicos recesivos (*DFNB*), 29 autosómicos dominantes, 8 ligados a X, y 2 mitocondriales (Kenneson y Boyle 2004).

Los sujetos con problema de audición autosómico recesivo deben portar la mutación en ambos alelos para presentar un desorden auditivo. Generalmente estos pacientes tienen hipoacusia prelocutiva y profunda, mientras que los que tienen un problema auditivo autosómico dominante presentan hipoacusia progresiva y postlocutiva (Resendes *et al.* 2001).

El locus *DFNBI* fue el primero en ser definido como causante de sordera recesiva, se detectó utilizando distintos marcadores genéticos para el cromosoma 13 (D13S175, D13S143 y D13S115), así se comprobó que el locus *DFNBI* es un importante contribuyente a la sordera HANSAR en poblaciones caucásicas (Maw *et al.* 1995).

2. **Mutaciones: generalidades y nomenclatura.** Las mutaciones, también denominadas “variaciones de secuencia”, son cambios que pueden ocurrir a nivel del ADN (secuencia codificante), del ARN (secuencia del ARNm) o en las proteínas (secuencia de aminoácidos) (den Dunnen y Antonarakis 2000).

La Sociedad de Variación en el Genoma Humano (HGVS, por sus siglas en inglés) ha establecido las normas internacionales de nomenclatura para las mutaciones. Como fundamento se tiene que las mutaciones deben ser descritas respecto a una secuencia de referencia, es decir una secuencia conocida como consenso. En el nombre sistemático se inicia indicando la posición afectada y luego el cambio. A continuación se describe los tipos de mutaciones que pueden ocurrir, algunas de las normas de nomenclatura utilizadas a nivel de ADN y de proteína.

a. A nivel de ADN, se antecede de una “g.” si se está describiendo la secuencia genómica, o con una “c.” si se describe la secuencia codificante. Cambios básicos a nivel de ADN:

Cuadro 1. Mutaciones básicas a nivel de ADN (den Dunnen y Antonarakis 2000).

<b>Cambio</b>	<b>Notación</b>	<b>Ejemplo(s)</b>	<b>Descripción</b>
Sustitución	>	g.330G>A	El nucleótido 330 se sustituyó una guanina por una adenina.
Delección	del	g.304delG c.394_397delGACG	En la posición 304 se eliminó una guanina. Cuatro nucleótidos eliminados entre 394 a 397.
Inserción	ins	c.451_452insT	Se escribe “ins” después de los nucleótidos que flanquean la inserción.
Duplicación	dup	c.583dupT c.986_988dupGAC	Una timina duplicada en la posición 583. Tres nucleótidos duplicados desde la posición 986.
Inversión	inv	c.1077_180inv	Se escribe “inv” después del número de nucleótidos invertidos.
Conversión génica	con	c.45_1055conAC0965	Se escribe “región cambiada” con “región de origen en el genoma”.

Las mutaciones de sustitución de una sola base, pueden ser de dos tipos: transiciones o trasversiones.

Las transiciones suceden cuando el cambio de la base es de una purina por otra purina (A↔G, ambas son bases nitrogenadas de dos anillos), ó el cambio de una pirimidina por otra pirimidina (C↔T, ambas son bases nitrogenadas de un anillo).

Se llama una sustitución de tipo transversión cuando el cambio es entre una pirimidina (C o T) por una purina (A o G), o una purina por una pirimidina.

Debe notarse que para una base que sufre transición solo hay una posibilidad de variación, mientras que para una base que sufre transversión hay dos posibilidades. Sin embargo, las transiciones ocurren con mayor frecuencia, debido a que el cambio se hace entre dos bases del mismo tipo, y se puede dar por tautomerismo (den Dunnen y Antonarakis 2000).

b. A nivel de proteínas, se antecede de una “p.”, se puede usar el código de aminoácidos de 3 letras o de 1 letra.

Cuadro 2. Mutaciones básicas a nivel de proteínas (den Dunnen y Antonarakis 2000).

Cambio	Notación	Ejemplo(s)	Descripción
Sustitución	ninguno	p.W26C p.W26*	Cambio de triptófano por cisteína en 26. Cambio de triptófano por un codón <i>stop</i> .
Delección	del	p.Kdel6	Se eliminó lisina en la posición 6.
Duplicación	dup	p.G4_Q6dup	Se duplicaron 3 aminoácidos en posiciones 4-6.
Inserción	Ins	K2_L3ins34	Entre lisina posición 2 y leucina posición 3, se insertaron 34 aminoácidos.

3. Diagnóstico clínico de hipoacusia. Existen dos tipos de pruebas para determinar el estado de audición de una persona: (1) las fisiológicas son objetivas ya que determinan el estado funcional del sistema auditivo, estas se pueden realizar a cualquier edad; (2) las audiométricas se consideran subjetivas debido a que determinan la manera en que un individuo procesa la información auditiva, son pruebas conductuales (Smith y Van Camp 2007; Sweetow 2008).

Pruebas físicas (objetivas):

a. Reflejo estapedial (timpanometría y reflejo del músculo del estribo).

b. Audiometrías de respuestas eléctricas. Registran en forma de ondas la actividad eléctrica de las vías nerviosas auditivas cuando son estimuladas por un sonido.

1) Electrocoqueografía. Es una técnica muy fiable y objetiva, pero no está difundida en la infancia, porque precisa anestesia general.

2) Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral. Es el método objetivo más empleado. El registro obtenido es muy fiable, estable y no modificable con la sedación del paciente.

c. Otoemisiones acústicas. Las otoemisiones son señales acústicas originadas en la cóclea, bien de forma espontánea o bien provocadas mediante estímulos sonoros. Tienen su origen en la actividad contráctil de las células ciliadas externas del órgano de Corti.

Pruebas de audiometría (subjetivas):

d. Pruebas de comportamiento. Exploran intensidades altas (70-100 dB) de forma bilateral.

1) Audiometrías de observación del comportamiento (AOC) (en recién nacidos hasta la edad de seis meses).

2) Audiometría de reflejos frente a sonidos (en niños de seis meses hasta los dos años).

e. Audiometría de reflejo condicionado. Se asocia un componente lúdico para atraer la atención del niño. Destacan: Prueba de Suzuki-Ogiba y Peep-show de Dix-Hallpike.

f. Audiometría tonal. Para pacientes mayores a los 4-5 años. Es la prueba ideal, cuando es factible ya que determina el límite de recepción del habla.

g. Audiometría de conducción aérea, el límite de audición dependen del estado del canal del oído externo, oído medio e interno.

h. Audiometría de conducción ósea, presenta el sonido por un vibrador colocado en el hueso mastoideo o en la frente. El límite de audición depende de la condición del oído interno.

i. Audiometría convencional. El individuo indica las ocasiones en que escucha un sonido (Smith y Van Camp 2007; Sweetow 2008).

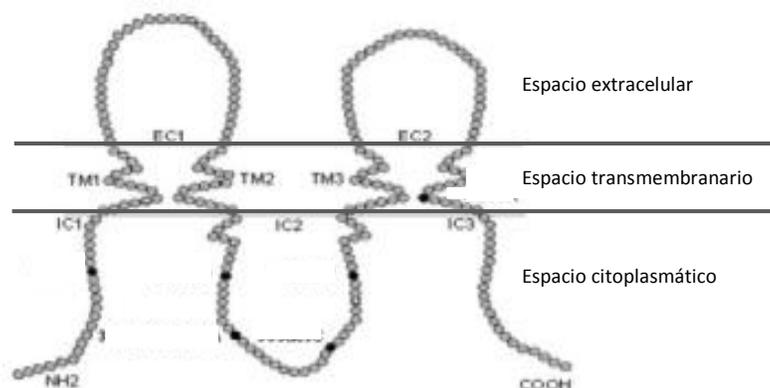
4. Proteínas conexas. El oído interno contiene células epiteliales muy diversificadas que rodean la endolinfa. La secreción de iones  $K^+$  hacia la endolinfa genera un potencial endococlear que contribuye significativamente a la transducción de la señal auditiva. Esta transducción en la cóclea y en el laberinto vestibular tiene requerimientos electroquímicos distintos, sin embargo todos dependen de la circulación de  $K^+$  entre la endolinfa y la perilinfa (Lang, *et al.* 2007).

Células del oído interno y de otros órganos del cuerpo poseen canales que transportan iones como  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , segundos mensajeros, y otras pequeñas moléculas como glucosa, de esta

manera permiten la comunicación intercelular. Las uniones comunicantes (*gap junctions*) están formadas por unidades básicas llamadas conexinas (Gerido *et al.* 2007; Mese *et al.* 2008).

Las proteínas conexinas tienen una topología estructural similar: poseen cuatro dominios transmembranales y dos dominios extracelulares tipo *loop*, además presentan sus regiones amino y carboxilo terminal dentro de la célula (Figura 2). Para formar medio canal (conexón) intercelular se deben oligomerizar seis conexinas en la membrana. Una unión comunicante completa se forma al alinearse dos conexones de células adyacentes en el espacio extracelular. De esta manera se crea una ruta de comunicación entre los citoplasmas de las células vecinas. Se sabe que los canales comunicantes de conexinas tienen un importante rol en la homeostasis bajo distintas condiciones fisiológicas (Gerido *et al.* 2007; Ko *et al.* 2000)

Figura 3. Topología estructural de las conexinas (Modificado de Hashemzadeh *et al.* 2008)



La conexina 26 se expresa en la cóclea y en la epidermis, esta proteína de 26 kDa (26,201 Da, 226 aminoácidos) puede interactuar con la conexina 30, conexina 32, conexina 46, y conexina 50 para formar conexones heterotípicos (compuestos de más de un tipo de subunidades) u homotípicos (compuestos de seis unidades del mismo tipo de conexina) (Wang *et al.* 2002). En las células del oído interno la mayoría de canales comunicantes están formados por complejos heteroméricos de conexina 26 y conexina 30 (Lang *et al.* 2007).

La importancia de las uniones comunicantes para la función coclear se destaca debido a que las mutaciones en las conexinas son la principal causa de enfermedades hereditarias como tipos de sordera congénita no sindrómica (Lang *et al.* 2007). Siendo las mutaciones en el gen GJB2, responsables, en ciertas poblaciones, del 50% de la hipoacusia profunda no sindrómica autosómica de tipo recesivo (Gerido *et al.* 2007; Resendes *et al.* 2001).

5. Gen GJB2: Generalidades y mutaciones. El gen GJB2 (*Gap Junction Beta 2*) se ha identificado como la fuente de los loci *DFNBI* (hipoacusia autosómica recesiva) y *DFNA3* (autosómica dominante). Este gen codifica la conexina 26 (unión comunicante tipo beta) y se localiza en el cromosoma 13 (lugar cromosomal próximo a centrómero: 13q11-12) (ver Figura 3). El gen tiene un tamaño relativamente pequeño, ya que su secuencia total consta de 5,510 bases nucleotídicas en la hebra negativa, su ARNm consta de 2,331 bases, y su región codificante (exón 2) tiene un tamaño de 681 bases (ver Figura 5) (Kenneson *et al.* 2002; NCBI).

Figura 4. Ideograma de la localización del gen GJB2 en el cromosoma 13 (Lancet 2009).

Flecha, lugar cromosomal 13q11-12.

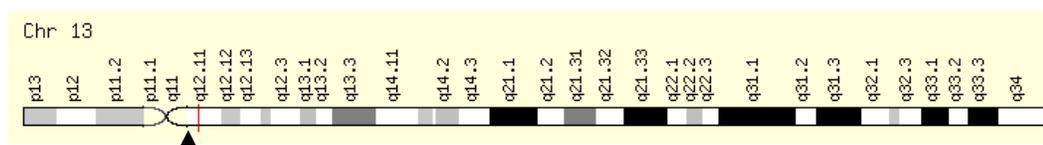
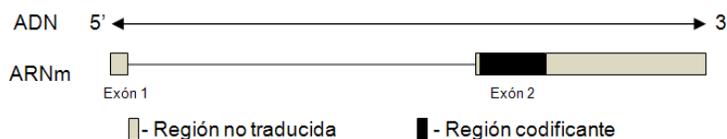


Figura 5. Ideograma de las regiones codificantes y no traducidas del gen GJB2 (modificado de NCBI).



En el exón 2 del gen GJB2 se ha identificado 92 de las 94 variantes existentes hasta el 2002. Entre las variantes reportadas hay casos raros, alelos recesivos, dominantes y polimorfismos; todas estas pueden incluir cambios de marco de lectura (*frameshift*), inserciones, deleciones, o variaciones sin sentido (*nonsense*) (Kenneson y Boyle 2004).

La información epidemiológica existente indica diferencias entre poblaciones respecto a dos medidas que son clave para determinar la validez de las pruebas genéticas: (1) el porcentaje de casos de hipoacusia no sindrómica asociada a variantes de GJB2, y (2) la frecuencia de variaciones en los alelos de GJB2 en la población (Kenneson y Boyle 2004).

De las variantes existentes en GJB2 se ha reportado que usualmente predomina una variante en poblaciones específicas, por ejemplo la 167delT en los judíos Askenazíes, 35delG en

los caucásicos descendientes de europeos nórdicos, 235delC en japoneses y coreanos, y R143W en poblaciones de Ghana (Kenneson *et al.* 2002).

Un resumen de 22 estudios, realizado por Kenneson y colaboradores en 2002, mostró las siguientes prevalencias de alguna variación en la secuencia del locus GJB2 en los individuos con hipoacusia no sindrómica autosómica de tipo recesivo (HANSAR): 43% en israelíes, 20% en los caucásicos descendientes de europeos, 20% en japoneses, 17% en tunecinos, 14% en australianos, y 5% en coreanos. Esto sugiere que la contribución de las variantes de GJB2 también difiere entre poblaciones.

En el Cuadro 3 se presenta las mutaciones más comunes causantes de HANSAR.

Cuadro 3. Mutaciones más comunes causantes de hipoacusia no sindrómica autosómica de tipo recesivo en el gen GJB2 (Kelsell *et al.* 1997; Kenneson *et al.* 2002).

Nombre de la mutación	Descripción	Efecto	Dominio proteico	Principal población con la mutación
c.35delG	Deleción de G en 30-35	Cambio marco de lectura (ML)	IC1	Caucásicos descendientes de europeos nórdicos
c.167delT	Deleción de T en 167	Cambio ML	EC1	Judíos Askenazíes
c.235delC	Deleción de C en 233-235	Cambio ML	TM2	Asiáticos
M34T	Cambio de T a C en 101	Met en 34, a Thr	TM1	Caucásicos descendientes de europeos nórdicos
W77X	Cambio de G a A en 231	Trp en 77, a Stop	TM2	Españoles

Además de los alelos predominantes entre poblaciones, existe una tasa relativamente alta de portadores de alelos de GJB2 en las poblaciones estudiadas. En algunas regiones se ha observado tasas mucho mayores, como en el Mediterráneo. Sin embargo se desconoce la causa (Kenneson *et al.* 2002).

6. Detección de variantes de GJB2. Existen numerosos métodos enfocados en el ADN para detectar la diversidad de alelos reportados para el gen GJB2.

Las pruebas rápidas para variantes comunes son altamente sensibles y específicas. Sin embargo solo detectan el alelo para el que fueron diseñadas, por ello son métodos rápidos y económicos para el tamizaje de poblaciones, ya que existen alelos que son más comunes en

ciertas poblaciones. Estas pruebas también tienen utilidad para analizar si un individuo es portador en familias con alelos conocidos. Se listan los siguientes métodos:

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de alelo-específica (AS-PCR)
- PCR seguido de digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP)
- PCR con hibridación hacia alelos específicos (Kenneson *et al.* 2002).

Otro tipo de pruebas para detectar alelos, incluye las que se podrían clasificar como exploratorias ya que permiten analizar distintas variantes a la vez, sin embargo son menos específicas que el AS-PCR. Estas son:

- Electroforesis desnaturizante en gel con gradiente
- Análisis por polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP, por sus siglas en inglés)
- Análisis de heteroduplex
- Cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (D-HPLC) (Kenneson *et al.* 2002).

La secuenciación de los productos de PCR del gen GJB2 es un método común para detectar la mayoría de alelos, además posee la ventaja que permite descubrir mutaciones nuevas (Kenneson *et al.* 2002). Se puede considerar la secuenciación como *gold standard* (prueba de referencia) para confirmar resultados obtenidos por otros métodos (como PCR-SSCP), ya que el costo de la secuenciación es aún muy elevado para realizar tamizajes a gran escala.

Los microarreglos o biochips son una técnica de última tecnología que consiste en el genotipado por medio de hibridación, lo que permite analizar simultáneamente varias mutaciones. Esta plataforma es muy conveniente en el caso de estudiar la sordera, debido a que esta enfermedad no es causada solamente por un gen, sino que es genéticamente heterogénea. Pruebas iniciales se han realizado ya, un ejemplo es el estudio australiano que validó un microarreglo que permite analizar simultáneamente 15 mutaciones en cuatro genes, entre los que se incluye el *GJB2* (Siemering *et al.* 2006).

7. SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphisms*). La técnica de SSCP permite analizar los polimorfismos conformacionales de la hebra simple de los productos de amplificación del PCR. Al estar asociadas estas dos técnicas, se le denomina PCR-SSCP. Este método fue desarrollado por Orita *et al.* en el año 1989, con el objetivo de identificar polimorfismos en el

ADN de manera más eficiente que los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ya que el método permite detectar cambios en la movilidad de la hebra simple debido a mutaciones en un solo nucleótido (Orita *et al.* 1989).

La simplicidad que presenta el método de PCR-SSCP es una útil ventaja sobre otros métodos moleculares, al momento de hacer estudios comparativos con muestras de muchos individuos. Esto se debe a que en el análisis de poblaciones sería necesario secuenciar muchas muestras, sin embargo muchos individuos portan la misma secuencia. Por ello, el análisis por SSCP es un método barato y sensible que permite detectar si la secuencia de distintos fragmentos de ADN es idéntica, reduciendo así la secuenciación necesaria (Sunnucks *et al.* 2000).

El PCR-SSCP se basa en que la movilidad electroforética de una partícula en un gel es dependiente de su tamaño y de su forma (conformación). Bajo condiciones no desnaturalizantes el ADN de hebra simple presenta una estructura plegada que es determinada por las interacciones moleculares causadas por su secuencia nucleotídica. En SSCP una mutación se detecta como un cambio en la movilidad de la electroforesis en gel de poliacrilamida, que es causada por la estructura plegada de la hebra de ADN (Hayashi, K. 1991).

Debido al alto poder de resolución de la poliacrilamida es posible detectar cambios conformacionales causado por la sustitución de tan solo una base en fragmentos de varios cientos de bases. Sin embargo, después de muchos estudios, aún no es posible predecir el cambio en el movimiento electroforético que causará una mutación (Hayashi, K. 1991; Sunnucks *et al.* 2000).

Se sabe que la sensibilidad de la técnica PCR-SSCP disminuye cuando aumenta el tamaño de los fragmentos amplificados. Siendo la detección de mutaciones >99% cuando los fragmentos tienen un tamaño entre 100 y 300 nucleótidos, y disminuye a >80% con fragmentos mayores a 400 nucleótidos (Sunnucks *et al.* 2000).

En los inicios de esta metodología, algunos científicos determinaron que el tamaño óptimo de un fragmento para obtener alta sensibilidad en la técnica de SSCP era de 150 bases (Sheffield *et al.* 1993). Sin embargo, al añadir glicerol en el sistema se aumenta la sensibilidad de la técnica, haciendo posible su uso para fragmentos de hasta 800 nucleótidos. Esto se debe a que el glicerol causa la reducción del pH del amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA) debido al efecto de los iones de borato en el sistema (Kukita *et al.* 1997).

En un principio esta metodología se planteó utilizando iniciadores o deoxinucleótidos marcados radioactivamente (Orita *et al.* 1989), sin embargo en la práctica actual se utiliza la tinción con plata como medio de visualización (Batissoco *et al.* 2009).

Como se mencionó antes, la detección de mutaciones depende en los cambios conformacionales de la hebra simple inducidos por las mutaciones, por ello la conformación es altamente sensible al ambiente físico del gel: temperatura, concentración de iones y solventes. Por esta razón es muy importante mantener las condiciones constantes, principalmente la resistencia óhmica y el uso de bajas temperaturas (Sheffield *et al.* 1993).

El método de SSCP puede presentar algunas complicaciones al momento de estandarizar el protocolo para un fragmento en específico. Es posible que una hebra no se separe como banda discreta, sino mostrando un barrido en el gel de SSCP. Esto podría implicar que las hebras están en un estado transicional entre dos o más conformaciones bajo las condiciones empleadas. La solución a dicho problema es variar sutilmente las condiciones electroforéticas del gel (Hayashi 1991).

Cabe mencionar otra ventaja que presenta el uso de PCR-SSCP, respecto a la obtención de resultados. Debido a que en esta metodología las mutaciones se detectan por la presencia de patrones o cambios en las bandas, en vez de la presencia o ausencia de la señal (como en otros métodos), se asegura que un fallo en el PCR no lleva a falsos positivos (o falsos negativos) (Hayashi 1991).

La metodología de PCR-SSCP se ha utilizado en estudios de biología evolutiva, ecología molecular, diagnóstico de cánceres y de enfermedades hereditarias como fibrosis quística, Tay-Sachs y hemofilia B (Hayashi 1991; Sunnucks *et al.* 2000).

Para el análisis de mutaciones asociadas a hipoacusia no sindrómica recesiva se ha utilizado el PCR-SSCP asociado a la secuenciación para caracterizar las mutaciones encontradas. Estos estudios han sido conducidos en tamizajes en Estados Unidos (Green *et al.* 1999), Turquía (Bayazit *et al.* 2003) y Brasil (Batissoco *et al.* 2009), entre muchos otros países. Haciendo uso de esta metodología se ha podido detectar nuevas mutaciones patogénicas o posiblemente patogénicas.

8. Hipoacusia en Guatemala. Las estadísticas de los últimos 5 años del Hospital Rodolfo Robles indican que la ocurrencia de hipoacusia a nivel nacional está entre 1 y 2 por cada 1,000 nacidos vivos, similar a los datos internacionales. Más de la mitad de estos casos son causados por factores genéticos, siendo entre el 70% y 80% los no sindrómicos (Sahin-Calapoglu *et al.* 2005).

En las Clínicas de Niño Sano del Hospital Roosevelt durante el 2006 se detectaron por medio de audiometrías 29 casos de sordera moderada a profunda (15%). En el 2007 se atendieron más pacientes, resultando 107 casos (23%) de sordera y en los primeros 3 meses del año 2008 se detectaron 41 casos (27%) (Araujo *et al.* 2008).

En el año 2005 se estima que ocurrieron 374,066 nacimientos en la República de Guatemala, siendo 64,186 en la capital (INE 2005). Los datos proyectados del INE para el año 2010, indican que habrá una población infantil (entre 0 y 14 años) de 5,968,677 (INE 2006). Si se toma este número para calcular la prevalencia de HANSAR, se obtiene que el 0.054% de esta población (3,217 infantes menores a 14 años) presenta este tipo de sordera (Ver siguiente Cuadro). Debido a la importancia de las mutaciones en el gen GJB2 como causa de hipoacusia, se estimó (por falta de datos) que un 40% de HANSAR es causado por las mutaciones en el gen de la proteína conexina 26.

Cuadro 4. Población estimada para la condición de HANSAR en la población infantil guatemalteca.

Condición	Prevalencia		Población calculada para la condición
	DIRECTA <sup>1</sup>	ACUMULADA <sup>2</sup>	
1. Población general (Niños/as mayores de 14 años, 2010)	-	100%	5,968,677 <sup>3</sup>
2. Sordera	0.2%	0.2%	11,937
3. Sordera por causa genética	50%	0.100%	5,969
4. Sordera causa genética y no sindrómica	70%	0.070%	4,178
5. Sordera causa genética, no sindrómica y autosómica recesiva (HANSAR)	77%	0.054%	3,217
6. HANSAR debido a mutaciones en el gen GJB2 (Cx26) *dato estimado	40%	0.022%	1,287

<sup>1</sup> Tomada de la Figura 1.

<sup>2</sup> Obtenida de la multiplicación de la prevalencia de todas las condiciones anteriores (acumuladas).

<sup>3</sup> Tomado de INE 2006.

9. Consejería genética. El consejo genético por parte de un experto, es un paso crucial después de haberse realizado una prueba genética y tener un diagnóstico genético.

Una prueba genética es todo análisis de ADN, ARN, cromosomas, proteínas o metabolitos específicos humanos, que se realiza para detectar alteraciones relacionadas a un desorden hereditario (NCBI 2009).

La consejería genética es parte de la genética clínica, está relacionada con el diagnóstico y manejo de los aspectos médicos, sociales y psicológicos de una enfermedad o condición hereditaria (Nussbaum *et al.* 2001).

Cuando se sospecha que un desorden es hereditario, el enfoque clínico ya no es solo en el paciente, sino que en sus familiares actuales y futuros: se debe informar a otros miembros de la familia el riesgo de presentar el desorden, y los medios disponibles para modificar dichos riesgos (Nussbaum *et al.* 2001).

El consejo genético ayuda a las familias e individuos a:

1. Comprender el diagnóstico, el probable desarrollo del desorden y medios disponibles para tratarlo.
2. Entender el rol de la herencia en el desorden y el riesgo de recurrencia en el paciente o familiares.
3. Conocer opciones para manejar el riesgo de recurrencia.
4. Identificar todos aquellos valores, creencias, metas y hasta relaciones que pueden ser afectadas por presentar una enfermedad hereditaria, o tener riesgo de ella.
5. Escoger las acciones para enfrentar su condición, respecto a su riesgo, metas, religión y étnica, entre otras.
6. Proveer apoyo y consejería personal después de reconocer las respuestas emocionales, ante el diagnóstico. Esto puede ser en grupo. Explorar las maneras de comunicar la información a otros (NCBI 2004, Nussbaum *et al.* 2001).

Para el manejo de un caso de consejería genética, el/la experto/a debe seguir ciertos pasos, cruciales. En el Cuadro 5 se describe en resumen como se debe manejar la consejería genética.

Cuadro 5. Descripción de las etapas a seguir para el manejo de la consejería genética (NCBI 2004, Nussbaum *et al.* 2001).

---

Compilación de información

- Historia familiar, historial médico (desde el nacimiento hasta el estado actual),
- Pruebas físicas a paciente o familiares, y pruebas clínicas adicionales.
- Grado de conocimiento de genética, percepción de la enfermedad (creencias de la causa y repercusiones).

Evaluación

- Interpretación de resultados de exámenes físicos, e historial médico personal y familiar.
- Validación o establecimiento del diagnóstico (si es posible).

Consejería

- Comunicar en un grado en que la familia comprenda: la información sobre la naturaleza y consecuencias del desorden.
- Descripción del riesgo de recurrencia.
- Disponibilidad de más pruebas.
- Discusión de opciones reproductivas o decisiones a tomar.
- Referir a otros especialistas o grupos de apoyo.

Seguimiento

- Evaluación clínica continua, especialmente si no hay diagnóstico.
  - Apoyo psicológico.
-

## B. Justificación

Este estudio forma parte de la primera fase de una secuencia de investigaciones que tienen como fin generar información sobre la epidemiología genética de la hipoacusia no sindrómica asociada al gen GJB2 en la población guatemalteca. En Guatemala no se cuenta con un método de análisis genético para detectar la presencia de mutaciones en GJB2 que causan hipoacusia no sindrómica autosómica de tipo recesivo (HANSAR). En países desarrollados se utiliza comúnmente la secuenciación de muestras amplificadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) como método para la detección de estas mutaciones. Debido al alto costo que implica la tecnología de secuenciación, muchas investigaciones y tamizajes han aplicado la técnica de PCR-SSCP para la detección de mutaciones y polimorfismos, sin necesidad de secuenciar la totalidad de las muestras.

En este protocolo se propone utilizar la técnica de bajo costo (SSCP) para detectar mutaciones en el exón 2 del gen GJB2 de muestras de ADN de guatemaltecos. Para ello se utilizará muestras confirmadas por secuenciación (como prueba de referencia o *gold standard*), para establecer si la técnica PCR-SSCP detecta las mismas mutaciones que la secuenciación. Al determinar las condiciones ideales del método, la implementación de la prueba por PCR-SSCP reduciría el costo en el proceso de tamizaje a gran escala, ya que permitirá seleccionar para la secuenciación entre las muestras de pacientes, solamente aquellas que presentan un patrón distinto al normal.

Al contar con una metodología de bajo costo para la detección de polimorfismos en pacientes y en la población en general, se podrá contar con un método confiable para determinar la HANSAR. Conocer de manera certera la etiología de la hipoacusia puede tener propósitos clínicos como: excluir el surgimiento de complicaciones sindrómicas, predecir si la audición puede empeorar, predecir la hipoacusia moderada a profunda para iniciar una intervención temprana con terapia del lenguaje, además de ayudar a la decisión del tratamiento y, la consejería genética respecto a las tasas de recurrencia de la hipoacusia en otros hijos.

## C. Objetivos

### 1. Objetivo general

Detectar por PCR-SSCP cambios conformacionales en el exón 2 del gen GJB2 (conexina 26) asociados a mutaciones en sujetos con hipoacusia no sindrómica autosómica de tipo recesivo.

### 2. Objetivos específicos

- a. Obtener sangre de 10 individuos sin mutaciones en el exón 2 de GJB2, confirmado previamente por secuenciación.
- b. Obtener sangre de 10 sujetos con HANSAR y con mutaciones en el exón 2 de GJB2, confirmadas previamente por secuenciación.
- c. Extraer, utilizando un método salino no enzimático, ADN de sangre periférica de cada individuo.
- d. Amplificar en dos fragmentos, mediante PCR, el exón 2 del gen GJB2 de todas las muestras del estudio.
- e. Determinar las condiciones óptimas para el análisis del exón 2 de GJB2 por SSCP (temperatura y tiempo de calentamiento para las muestras; concentración de glicerol en el gel de poliacrilamida y de la solución amortiguadora TBE, temperatura del sistema, tiempo de corrida).
- f. Comparar el patrón de SSCP de los sujetos con mutaciones causantes de HANSAR en el exón 2 de GJB2; respecto al patrón de los individuos del grupo control.
- g. Determinar el porcentaje de detección de mutaciones por el método PCR-SSCP, respecto a los datos de secuenciación.

## D. Hipótesis de trabajo

Es posible detectar la presencia de mutaciones en el exón 2 del gen GJB2 por la técnica de PCR-SSCP, en un grupo de 10 muestras de sujetos con mutaciones confirmadas, comparándolos con los patrones de muestras de 10 sujetos sin mutaciones en ese mismo exón.

## II. MÉTODOS

### A. Procedimientos

1. Reclutamiento de sujetos y obtención de la muestra de sangre. El reclutamiento y toma de muestras de sangre estuvo a cargo de la médica Yomara Yardén Bustamante, como parte de su estudio de Postgrado de Pediatría de la Universidad de San Carlos, titulado *Mutaciones de conexina 26 en niños con hipoacusia no sindrómica de moderada a profunda y de tipo recesivo*.

En los Apéndices se incluye:

- Constancia de aprobación por la Universidad de San Carlos, del protocolo utilizado para la toma de muestras (Apéndice A).
- Incisos del Protocolo que describen: Instrumentos para la recolección de información, Aspectos éticos, Procedimiento para recolección de muestras e información (Apéndice B).
- Formulario de Consentimiento Informado (Apéndice D).
- Cuestionario del sujeto para la toma de muestra (Apéndice E).

La muestra sanguínea se identificó con la fecha de toma de muestra y el código del sujeto. Si la muestra contenía el nombre del sujeto, se eliminó del tubo de muestra y de cualquier base de datos, sustituyéndolo por el código dado por la médico.

Las muestras se almacenaron a 4°C durante el día que se hizo el muestreo, luego se transportaron al laboratorio en una hielera con ice-packs. Posterior a su uso, se guardaron a -20°C.

Además de la Base de Datos que la médico llevó, se trabajó con una “Base de Datos de Muestras Sanguíneas” (ver en Apéndice F).

a. Individuos con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva (HANSAR) con mutaciones confirmadas por secuenciación (sujetos). El estudio se llevó a cabo con muestras de sangre entera de 16 sujetos pediátricos guatemaltecos (menores a 12 años) diagnosticados clínicamente con HANSAR. El análisis clínico era normal, con lo que se excluyó casos de sordera sindrómica.

Se analizó la secuencia del ADN con el programa computacional Sequencher 4.9, de la compañía Gene Codes Co. para detallar la información de la mutación encontrada y determinar si los alelos eran homocigotos o heterocigotos.

Las mutaciones se compararon respecto a la secuencia consenso obtenida del NCBI *Reference Sequence Project* NG\_008358.1, la cual fue proporcionada por Baux y colaboradores en el 2008, que después de ser revisada se la categorizó como estándar de referencia (NCBI).

En el Apéndice. 8 (p. 65) se incluye la secuencia consenso. En los Apéndices 13 y 14 se presentan los alineamientos de las secuencias con mutaciones, respecto a la secuencia consenso.

b. Individuos sin mutaciones en exón 2, GJB2 (grupo control). El grupo control estuvo conformado por muestras de sangre entera de 10 diez sujetos sin mutaciones en el exón 2 GJB2 (siete sujetos pediátricos con hipoacusia y tres sujetos adultos sin hipoacusia). El análisis clínico fue normal, con lo que se excluyó la presencia de otros síndromes en los individuos.

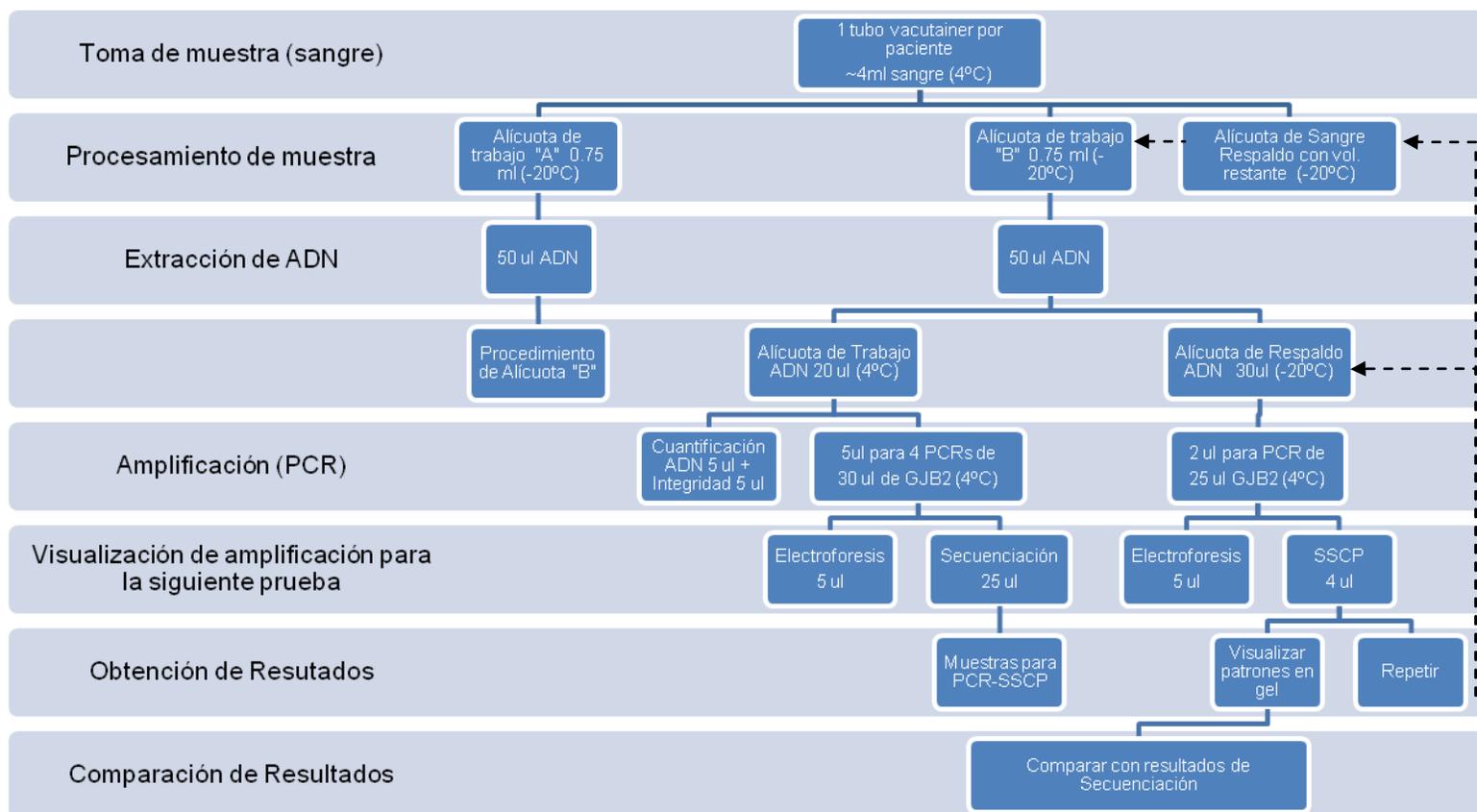
2. Extracción de ADN. En la siguiente página se muestra un diagrama de flujo que indica los pasos del procesamiento de las muestras desde la toma de sangre, hasta la obtención de resultados por PCR-SSCP.

El trabajo de laboratorio (extracción de ADN, amplificación por PCR y visualización por electroforesis en agarosa) se llevó a cabo en el laboratorio GENLAB, ubicado en UNICAR (9a av. 8-00, z.11, ciudad de Guatemala).

En el laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala se realizó la etapa de SSCP y digitalización de geles.

Figura 6. Diagrama de flujo del procesamiento de muestras.

Se tomó entre 1.5 y 5 ml de sangre de cada sujeto. Se utilizó 0.75 ml de sangre para extraer el ADN de la sangre por duplicado (Alícuota A y B). Como resultado de la extracción de ADN, se obtuvo 50 ul de cada alícuota. Este volumen se dividió (Alícuota de Trabajo y Alícuota de Respaldo), con distintos usos cada una.



Para extraer el ADN se utilizó el método modificado de Lahiri y Schnabel (1993) y el sistema de extracción “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” de Promega.

Todas las muestras se trabajaron por duplicado, a partir de la sangre con EDTA.

El procedimiento modificado de Lahiri y Schnabel (1993) es el siguiente:

- a. Para cada muestra, rotular dos minitubos de polipropileno (1.5ml) estériles con:
  - 1) nombre de proyecto (Cx26),
  - 2) tipo de muestra (H, Hipoacúsico; C, Control),
  - 3) número correlativo sujeto (##),
  - 4) duplicado (A ó B) y
  - 5) fecha de extracción de ADN (dd/mm/año). Ejemplo: Cx26 H12 A , 5/06/09
- b. Colocar 0.750 ml de sangre con EDTA en un minitubo de 1.5 ml, estéril. Como control negativo de extracción, colocar 0.750 ml de agua estéril en un minitubo.
- c. Agregar en el minitubo 0.750 ml de buffer TKM (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 4mM MgCl<sub>2</sub>).
- d. Agregar 19 ul de Triton X-100 para lisar las células al mezclar por inversión varias veces.
- e. Centrifugar la suspensión a 13,400 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- f. Eliminar el sobrenadante, conservar el precipitado (compuesto principalmente de leucocitos)
- g. Realizar el lavado con buffer TKM (siguientes 3 pasos) dos veces:
  - 1) Agregar 500 ul de buffer TKM, agitar varias veces por inversión.
  - 2) Centrifugar la suspensión a 13,400 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Eliminar sobrenadante.
- h. Resuspender el precipitado final en 150 ul de buffer TKM.
- i. Agregar 11.3 ul de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, mezclar vigorosamente.
- j. Incubar la suspensión a 55°C por 10 min.
- k. Agregar 112.5 ul de solución NaCl 3 M, mezclar vigorosamente.
- l. Centrifugar a 13,400 rpm por 5 min.
- m. Transferir el sobrenadante a otro minitubo de 1.5 ml estéril.
- n. Agregar dos volúmenes de etanol al 100% para precipitar el ADN, mezclar por inversión.
- o. Incubar la mezcla a -20°C por mínimo 1 hora, o toda la noche.
- p. Centrifugar a 13,400 rpm por 10 min.
- q. Descartar el sobrenadante y secar el tubo invertido por 10 min.

- r. Resuspender el ADN en 0.05 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).
- s. Transferir 20 ul de la extracción de ADN para generar la “alícuota de trabajo ADN”. El volumen restante en el tubo de extracción (30 ul) consiste en la “alícuota de Respaldo ADN” que será almacenada a -20°C, precipitada con isopropanol y acetato de sodio.

La alícuota de trabajo de ADN se almacenó a 4°C para realizar el PCR en los siguientes dos días. Después de su uso se conservó a -20°C.

3. Determinación de pureza y cantidad del ADN extraído. Previo a la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se debía asegurar una extracción adecuada, por ello se analizó la pureza y cantidad del ADN.

La cantidad de ADN obtenido de la extracción, se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro ultravioleta (Maniatis *et al.* 1982). Se realizaron tres réplicas de la cuantificación, utilizando la absorbancia a 320 nm para corregir las lecturas.

4. Amplificación del exón 2 del GJB2. A todas las muestras de ADN se les realizó la PCR para la amplificación del exón 2 de GJB2, en dos fragmentos que se traslapan en 127 pares de bases (pb). Para la generación del primer fragmento se probaron tres combinaciones de iniciadores, y para el segundo fragmento se probaron dos combinaciones. Todos los iniciadores presentan una homología del 100% con la secuencia objetivo.

En el Cuadro 6 se presentan los iniciadores utilizados durante el proceso de optimización. Ver en Apéndice 8 (p. 65) la secuencia de las regiones amplificadas con los distintos iniciadores.

Cuadro 6. Información de iniciadores para amplificar exón 2 de GJB2 en dos fragmentos (Primer-BLAST).

Fragmento	Dirección*	Iniciador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)		Tm (°C)	GC %
				Iniciador	Amplificación		
A1	F <sup>(1)</sup>	Cx26 F	TCTTTTCCAGAGCAAACCGC (+)	20	444	53.3	50.0
	R <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1AR	TTGTGTAGGTCCACCACAGG (-) CCTGTGGTGGACCTACACAA (+)	20		53.4	50.0
B	F <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1BF	GCCTACCGGAGACATGAGAA (+)	20	490	53.1	55.0
	R <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1BR	GGGAAATGCTAGCGACTGAG (-) CTCAGTCGCTAGCATTTC (+)	20		52.7	55.0

Continuación Cuadro 6.

Frag- mento	Direc- ción*	Inicia- dor	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)		Tm (°C)	GC %
				Inicia- dor	Ampli- ción		
A	F <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1AF	CCTGTGTTGTGTGCATTCGT (+)	20	463	53.6	50.0
	R <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1AR	TTGTGTAGGTCCACCACAGG (-) CCTGTGGTGGACCTACACAA (+)	20		53.4	50.0
A2	F <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1allF	TGCTTGCTTACCCAGACTCA (+)	20	517	53.0	50.0
	R <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1AR	TTGTGTAGGTCCACCACAGG (-) CCTGTGGTGGACCTACACAA (+)	20		53.4	50.0
B1	F <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1BF	GCCTACCGGAGACATGAGAA (+)	20	447	53.1	55.0
	R <sup>(2)</sup>	DP Cx26 1allR	CCTCATCCCTCTCATGCTGT (-) ACAGCATGAGAGGGATGAGG (+)	20		60.2	55.0
Com- pleto	F <sup>(3)</sup>	DP Cx26 1allF	TGCTTGCTTACCCAGACTCA (+)	20	837	53.0	50.0
	R <sup>(2)</sup>	DP Cx26 1allR	CCTCATCCCTCTCATGCTGT (-) ACAGCATGAGAGGGATGAGG (+)	20		60.2	55.0

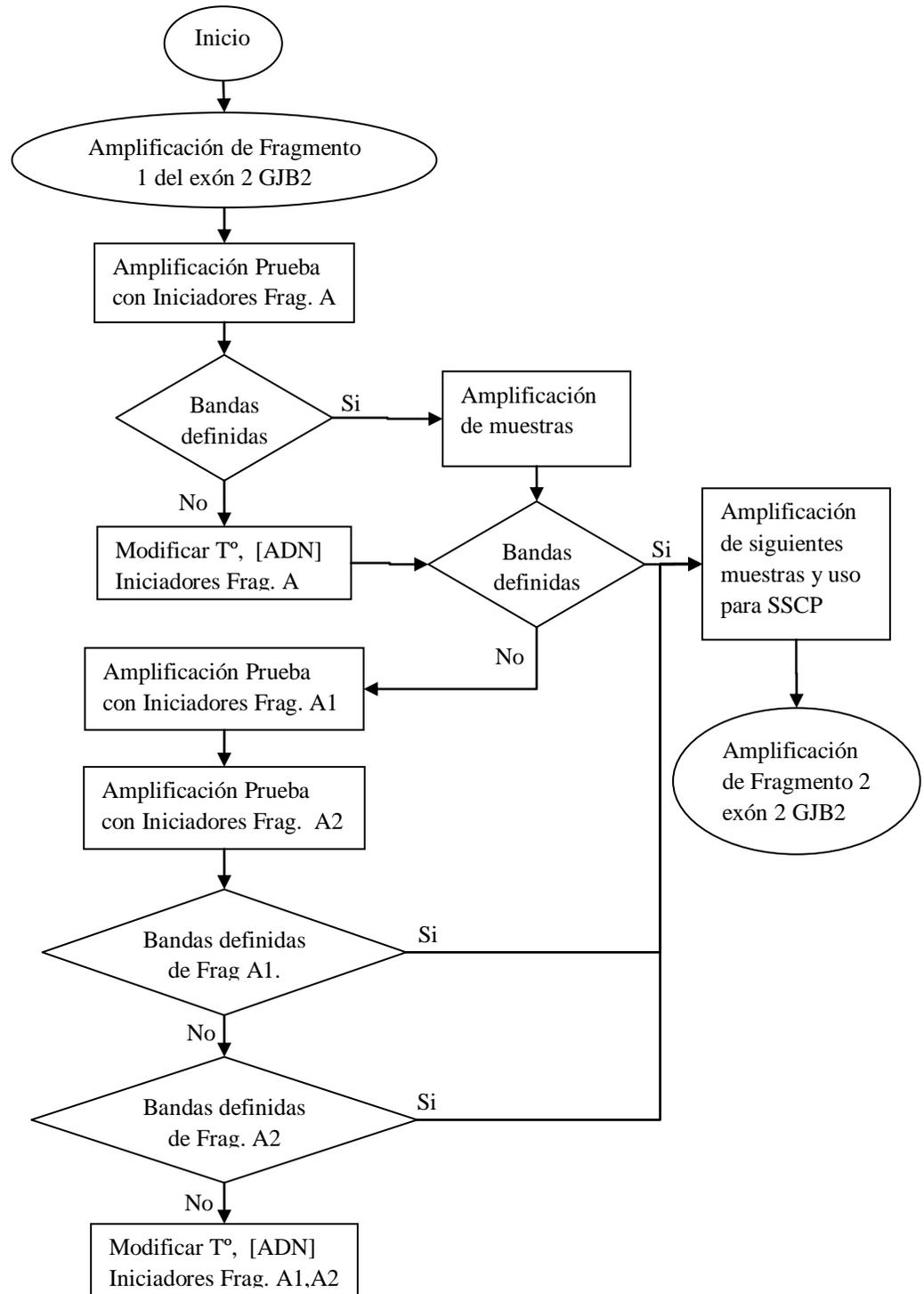
\*F, Forward; R, Reverse.

Referencias: <sup>(1)</sup> Obtenido de Scott *et al.* 1998; <sup>(2)</sup> Modificado de Lesirovitz *et al.* 2009;

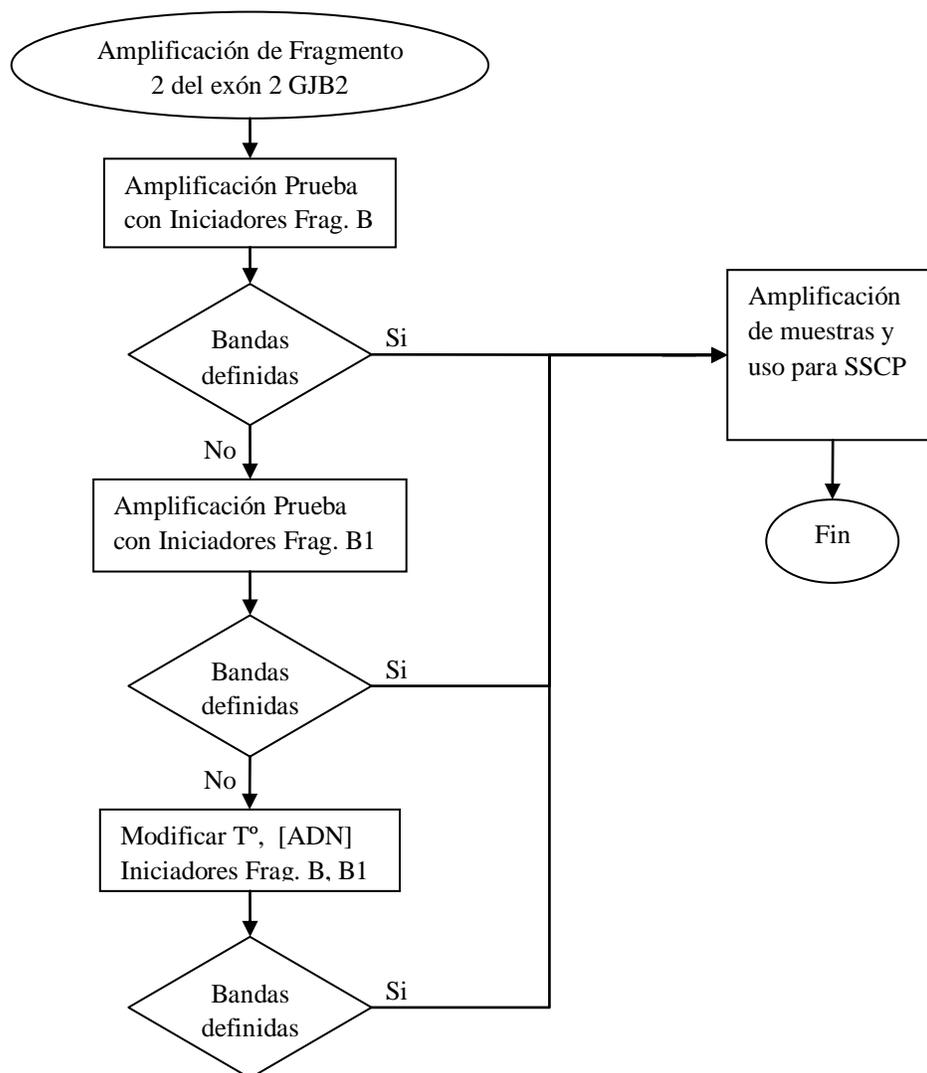
<sup>(3)</sup> Diseñado por D. Pearson 2009 (Scott Laboratory).

A continuación se presenta el diagrama de flujo del proceso de optimización (Figura 7).

Figura 7. Diagrama de flujo de proceso de optimización amplificación por PCR de los fragmentos del exón 2 GJB2



Continuación Figura 7.



Se realizó una curva de amplificación con los iniciadores para el fragmento A y B. Debido a que los iniciadores para el fragmento B tuvieron muy buena detección, se optó por no utilizar iniciadores de la *Human Ribosomal Protein* (rpS13) para el control interno PCR.

El programa de PCR para amplificar el exón 2 de GJB2 en fragmentos y la mezcla de la reacción se muestran en el Cuadro 7 y Cuadro 8, respectivamente.

Cuadro 7. Programa de PCR para la amplificación del exón 2 del gen GJB2 (Scott *et al.* 1998).

Ciclos	Temperatura y tiempo
1	94°C, 5 min
32	94°C, 30 s 62°C, 30 s 72°C, 35 s
1	72°C, 5 min
1	15°C, indefinido

Cuadro 8. Mezcla de PCR para amplificar el exón 2 del gen GJB2 (Scott *et al.* 1998)

Componente	Concentración inicial	U	Concentración final	U	Volumen en reacción (uL)
PCR buffer	10	X	0,7	X	1,75
MgCl <sub>2</sub>	25	mM	3	mM	3,00
dNTPs	2,5	mM	0,15	mM	1,50
Primer F	15	uM	0,3	uM	0,50
Primer R	15	uM	0,3	uM	0,50
BSA	1	%	0,08	%	2,00
DMSO	50	%	4	%	2,00
Taq pol	5	U/ul	0,04	U/ul	0,20
H <sub>2</sub> O d.d.	-				10,55
ADN	100	ng/ul	100	ng	3,00
Volumen total/ reacción					25,0

## 5. SSCP

## a. Preparación de muestras:

- Una alícuota de 2.5 - 4 ul del producto amplificado se mezcló con 2 volúmenes de buffer de carga (formamida 45%, 0.025% azul de bromofenol, 0.025% xilen cianol, 10 mM NaOH).
- Se calentó la mezcla a 95°C por 5 min y luego se colocó los tubos en hielo.
- En todos los geles se corrió una muestra como control interno. Esta consistió en el producto de PCR del ADN de un mismo sujeto, sin mutaciones en el exón 2. Se prepararon alícuotas de 3 ul para mantenerlas congeladas individualmente, para evitar su degradación.
- Cada gel contó con 15 pozos (carriles) como máximo, por lo que el máximo a analizar eran 4 muestras y el control interno. El uso de marcador molecular fue

optativo. En cada corrida se tenía la posibilidad de colocar dos geles dentro de la cámara del sistema de electroforesis.

b. Preparación de los geles de poliacrilamida no desnaturizantes. La electroforesis se llevó a cabo mediante el sistema vertical, en cámaras Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3.

A continuación se describe el procedimiento adaptado de Hennessy *et al.* 1998:

1. Se usó geles de 10.5% - 11% poliacrilamida (concentración inicial 40%, 37.5:1 acrilamida:bis-acrilamida), con TBE 0.53%.
2. Se probó con y sin glicerol (0%, 5%) para optimizar las condiciones de electroforesis. Ver receta en el siguiente cuadro.

Cuadro 9. Receta para preparar la mezcla de poliacrilamida para dos geles de SSCP, sin glicerol.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (mL)
Agua	-	-	7.03
TBE	5X	0.53X	1.2
Poliacrilamida 37.5:1	40%	11%	3.15
TEMED	100%	0.14%	0.016
Persulfato de amonio (APS)	25%	0.035%	0.016

3. Se cargó 4-6 ul de cada producto de PCR desnaturizado.
4. Se corrió los geles (8cm ancho, 7.5 cm alto, 0.75 cm espesor) en baño de hielo (a temperatura constante, 3-4°C) con solución buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X.
5. Las condiciones de corrida utilizadas estuvieron entre los siguientes rangos:

Condiciones	Rango	Característica en la corrida
Voltaje (V)	250 - 500	Variable
Corriente (I, mA)	15 – 30	Constante
Potencia* (W)	4.5 – 12.5	Variable
Tiempo (h)	2.5 – 4.5	Constante

\* La Potencia (W) no se especificaba en la fuente de poder, pero se calcula con la fórmula  $W = V$  (voltios) x I (amperes)

- c. Tinción con solución de nitrato de plata:
1. Se incubó los geles de poliacrilamida en una solución acuosa de ácido acético al 10%, por 20 minutos a temperatura ambiente (con agitación) o toda la noche a 4°C (sin agitación).
  2. Después se lavó los geles 3 veces por 2 minutos con agua desmineralizada y agitación.
  3. Posteriormente se incubó los geles por 30 minutos en una solución acuosa de nitrato de plata 0.1% p/v, formaldehído 0.15% v/v. Esta solución se re-usó un máximo de 2 veces.
  4. Se lavó por 10 segundos con agua desmineralizada.
  5. Por último se incubó los geles con agitación, en solución de carbonato de sodio al 3% p/v, que contenía tiosulfato de sodio al 0.45% p/v y formaldehído al 0.055% v/v. Hasta visualizar las bandas. La solución de carbonato de sodio se preparó fresca cada vez.
  6. Se detuvo la reacción con la solución de ácido acético al 10% (guardada del paso c.1).
  7. Para preservar los geles, se colocaron sobre un papel filtro, cubiertos con acetato. Se deshidrataron manteniéndolos presionados por 3 días y con servilletas secas.
  8. Una vez secos los geles, se digitalizaron con un scanner.

6. Análisis de patrones de bandas. Cada gel digitalizado, se codificó con la fecha y un correlativo.

Las bandas de los sujetos con HANSAR fueron comparadas con las bandas de los controles por medio la aplicación “1D Gel Analysis” del programa computacional “TotalLab 120 v.2009” de la compañía NonLinear Dynamics Ltd.

En este programa se definieron los carriles, luego las bandas, y por último se obtuvo valores de Rf (factor de migración relativa).

Con los valores de Rf para cada muestra, se obtuvo un valor de Razón de Rf, calculado de la siguiente manera:  $\text{Razón Rf} = \text{Rf banda}_1 \text{ (inferior)} / \text{Rf banda}_2 \text{ (superior)}$

También se calculó la distancia de Rf entre bandas:

$$\text{Distancia Rf entre bandas} = \text{Rf banda}_1 \text{ (inferior)} - \text{Rf banda}_2 \text{ (superior)}$$

## B. Análisis estadístico

1. Detección. Para analizar si el método de PCR-SSCP planteado es una prueba confiable para la detección de mutaciones reportadas por secuenciación (prueba comparativa *gold standard*), se analizaron distintos factores: validez, reproducibilidad y seguridad.

Se preparó un cuadro similar al siguiente, los valores VP, FP, FN y VN serán utilizados para las pruebas (adaptado de Pita y Pértegas 2003).

Resultado de prueba PCR-SSCP	Resultado de prueba de referencia (Secuenciación)	
	Presencia de mutación	Ausencia de mutación
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

2. Validez. La validez se determinó con los valores de sensibilidad y especificidad, utilizando el valor del estadístico p de la prueba exacta de Fisher, con 2 colas (con el Programa Epi-Info, del CDC)

La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo “enfermo”, en este caso se trata de un individuo que posea una mutación.  $\text{Sensibilidad} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$

La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sin mutaciones. Es decir, la probabilidad de que un sujeto sin mutaciones por secuenciación, obtenga un resultado negativo por PCR-SSCP.  $\text{Especificidad} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$

Para la sensibilidad ( $s$ ) y especificidad ( $e$ ) se determinó el intervalo de confianza al 90% y al 95%, respectivamente.

$$\text{Se utilizó las siguientes fórmulas: } \quad s \pm 1.64 * \sqrt{[ s*(1 - s) / \text{VN} ]}$$

$$e \pm 1.64 * \sqrt{[ e*(1 - s) / \text{VN} ]}$$

### 3. Reproducibilidad

- Intra-ensayo: Se obtuvo el intervalo de confianza para la posición de bandas de dos muestras colocadas en un mismo gel en triplicado, y en sextuplicado.
- Inter-ensayo: Este factor se determinó realizando el PCR-SSCP para la misma muestra, en tres distintas ocasiones.

4. Seguridad (Valores predictivos). La seguridad de la prueba se da por el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

El VPP es la probabilidad de que una persona sea portador de una mutación en caso obtenga un resultado positivo en la prueba de PCR-SSCP.

$$\text{VPP} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})$$

El VPN es la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo por PCR-SSCP, no tenga mutaciones en el gen en estudio.

$$\text{VPN} = \text{VN} / (\text{FN} + \text{VN})$$

### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **A. Mutaciones encontradas en las muestras**

Las mutaciones que se trabajaron fueron siete (E147K, R127L, V27I, M34T, W44X, R32C, W172X). Estas mutaciones se encontraron distribuidas en nueve muestras de sujetos con hipoacusia. Los genotipos de los sujetos en estudio presentaron una, dos y hasta tres mutaciones en la secuencia del exón 2 de GJB2. Como se esperaba, la mayoría de mutaciones fueron de tipo transición (lo que es más común) y solamente una de las siete mutaciones (R127L) fue de tipo transversión, ya que el cambio fue de una purina por una pirimidina, como se detalló en los antecedentes.

Entre las anteriores mutaciones, fue posible detectar la mutación W44X, que es de especial importancia ya que es considerada “patogénica”.

En el Cuadro 10 se muestra la información de las muestras, respecto a su genotipo y los resultados obtenidos por las dos técnicas utilizadas para detectar las mutaciones.

Cuadro 10. Descripción de muestras incluidas en el estudio y resultados obtenidos por secuenciación y por PCR-SSCP.

No	Grupo	Sujeto	Muestra	Resultados de secuenciación (posición y cambio de nucleótido)		Resultados de PCR-SSCP (Patrón de migración)		
				Fragmento A1	Fragmento B	Fragmento A1	Fragmento B	Genotipo detectable
1	HANSAR (con mutaciones)	H <sup>a</sup>	H55	<b>E147K</b> (439 G→A)* V27I (79 G→A)*	s.m. <sup>d</sup>	s.m.	s.m.	No
2		H	H49	<b>R127L</b> (380 G→T)*	s.m.	s.m.	s.m.	No
3		H	H64	<b>V27I</b> (79 G→A)*	s.m.	s.m.	s.m.	
4		H	H21	V27I (79 G→A)**	s.m.	s.m.	s.m.	No
5		H	H50	V27I (79 G→A)**	s.m.	s.m.	s.m.	
6		H	H10	<b>M34T</b> (101 T→C)* V27I (79 G→A)*	s.m.	s.m.	s.m.	No
7		H	H18	<b>W44X</b> (131 G→A)** V27I (79 G→A)*	s.m.	2 bandas	s.m.	Sí
8		H	H8	W44X (131 G→A)* V27I (79 G→A)*	<b>W172X</b> (515 G→A)*	4 bandas	s.m.	Sí (W44X), No (W172X)
9		H	H54	W44X (131 G→A)* <b>R32C</b> (94 C→T)** V27I (79 G→A)*	s.m.	4 bandas	s.m.	Sí
10	Control sin mutaciones	H	H9	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
11		H	H15	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
12		H	H17	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
13		H	H22	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
14		H	H47	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
15		H	H48	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
16		H	H62	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
17		SH <sup>b</sup>	C105 <sup>c</sup>	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
18		SH	S004	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí
19	SH	S006	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	Sí	

<sup>a</sup> H, sujeto hipoacúsico; <sup>b</sup> SH, sujeto sin hipoacusia

\* Genotipo heterocigoto. \*\* Genotipo homocigoto.

<sup>c</sup> C105 fue la muestra utilizada como patrón de referencia de migración en SSCP, ya que no presentó mutaciones en el exón 2 GJB2.

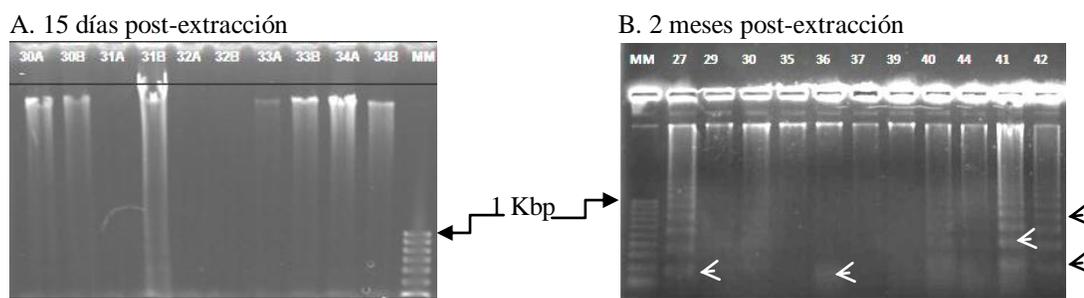
<sup>d</sup> s.m: Patrón de migración en SSCP sin mutaciones (de la muestra C105).

## B. Extracción de ADN

1. Método de extracción de ADN. La extracción de ADN para las muestras del estudio se realizó con sistema “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” de Promega, a partir de 300 ul de sangre completa, y no por el método salino de Lahiri y Schnabel (1993). Esto se debe a que a largo plazo el ADN extraído por el método salino, se degradaba hasta masas moleculares de incluso 100 pb (ver la Figura 8). Fue posible observar este efecto con muestras extraídas previamente a las del estudio, aun manteniendo las extracciones congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Esta degradación a temperaturas de almacenamiento es mucho más acelerada que la reportada a mayores temperaturas ( $4^{\circ}$  y  $25^{\circ}\text{C}$ ) (Lahiri y Schnabel 1993). Bajo estas condiciones la inestabilidad del ADN sería un problema para amplificar los fragmentos del exón 2 GJB2 (de alrededor de 400 pb). Es por ello que todas las muestras se extrajeron haciendo uso del sistema de Promega.

Figura 8. Degradación de ADN en muestras sanguíneas extraídas por método Lahiri y Schnabel (1993).



Marcador Molecular (MM) de 100pb. Las flechas indican las bandas de fragmentación del ADN.

Además de la estabilidad del ADN haciendo uso del kit, otra ventaja evidente es que en esta extracción se utiliza únicamente 0.300 ml en vez de los 0.750 ml de sangre utilizados para la extracción por el método salino.

2. Rendimiento. Fue posible la extracción de ADN de 9 muestras de sujetos con hipoacusia (grupo HANSAR con mutaciones) y de 10 muestras del grupo control.

En el Cuadro 12 (p.66) se muestra los resultados de la concentración de ADN y la pureza obtenida para cada extracción de ADN. En promedio se obtuvo una concentración de  $99.3 \pm 35.3$  ng ADN/ul (rango entre 27.5 – 218.8 ng ADN/ul) y una pureza de  $2.0 \pm 0.3$  (rango 1.1 –

4.7). Los resultados indican que se obtuvo un rendimiento adecuado para continuar el análisis por amplificación con la técnica de PCR.

Al contar con duplicados de la extracción en la mayoría de casos, permitió escoger la extracción con mayor concentración y pureza de ADN.

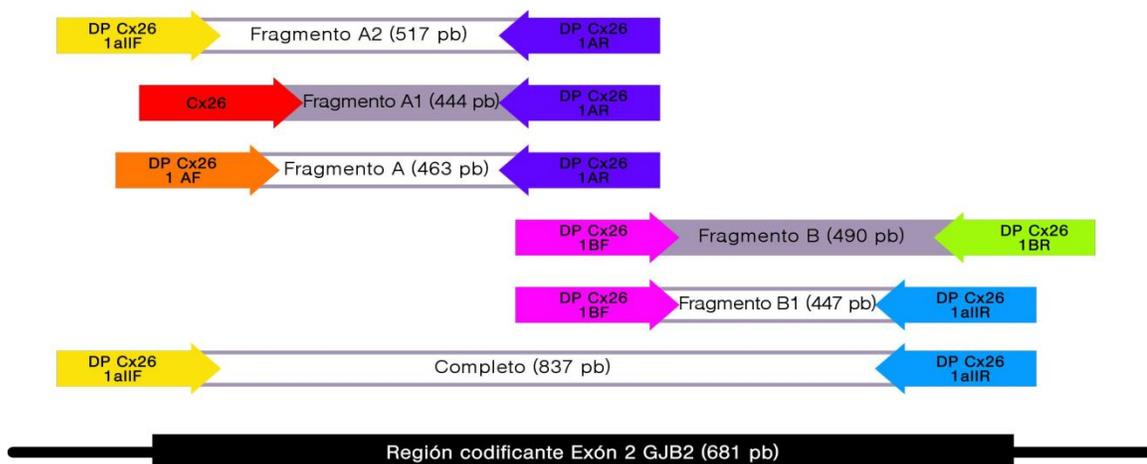
## C. Optimización de PCR

1. Iniciadores. Se logró amplificar adecuadamente el exón 2 GJB2 en dos fragmentos, para todas las muestras del estudio. Para ello se generó el fragmento denominado A1 de 444pb (con iniciadores Cx26 F y DP Cx261AR); y el fragmento B de 490 pb (con iniciadores DP Cx26 1BF y DP Cx26 1BR).

Los fragmentos diseñados para este estudio (A1 y B) cumplen con el requerimiento de que deben ser menores a 800 pb para posibilitar la detección de polimorfismos con la técnica de SSCP (Kukita *et al.* 1997).

En la Figura 9 se presenta un diagrama de los fragmentos generados durante el proceso de optimización de la amplificación de los fragmentos.

Figura 9. Diagrama de los fragmentos generados para amplificar el exón 2 de GJB2 en dos fragmentos.



Las flechas en colores flanqueando cada uno de los fragmentos representan los iniciadores.

Los fragmentos en gris son los escogidos para la amplificación de las muestras del estudio.

Para generar el primer fragmento del exón en estudio, se probó la amplificación de tres fragmentos. Se escogió el par de iniciadores de Frag. A1 ya que es el fragmento con menor

longitud, además los productos de PCR presentaron bandas bien definidas e intensas al ser visualizados en agarosa al 1.5%.

Una condición favorable para la reacción de PCR de Frag. A1 fue el uso de estabilizadores de la enzima Taq polimerasa [seroalbúmina bovina (BSA) y dimetilsulfóxido (DMSO)] a 62°C. Estos reactivos ayudaban a la especificidad de la reacción, ya que en el caso de Frag. A se logró eliminar la intensidad de bandas inespecíficas (carriles 5-6, Figura 10).

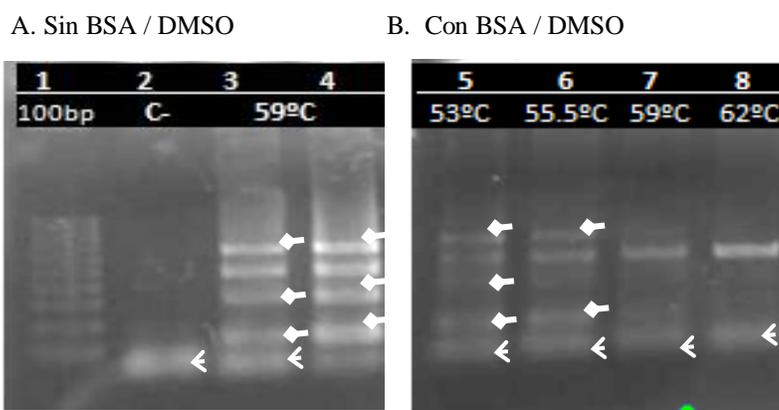
El par de iniciadores para A no logra una amplificación adecuada, ya que genera una banda intensa de dímeros (*primer dimer*) en todos los carriles. Este *primer dimer* es más evidente para el control negativo (carril 2, Figura 10).

Los iniciadores para Frag. A tampoco son específicos entre 53°C y 59°C, ya que generan tres bandas aparte del producto deseado (ver carriles 3 – 6, Figura 10). A 62°C se obtiene exclusivamente la banda deseada. Sin embargo al compararla con el producto Frag. A1 y A2, se observa que es muy tenue (ver respectivamente: carriles 10 – 17 y carriles 10-21 en Figura 11).

Se encontró que solamente con alta concentración de ADN plantilla en la reacción de PCR (12 ng/ul) se logra visualizar una tenue banda del producto esperado (carriles 1 – 2,

Figura 20.A, Apéndice p. 67). Al amplificar Frag. A de muestras y correrlas por SSCP se observó que no se obtenía suficiente producto de PCR para el análisis por SSCP (Figura 22, en Apéndice p. 68).

Figura 10. Efecto de los estabilizadores de enzima (seroalbúmina bovina [BSA] y dimetilsulfóxido [DMSO]) sobre la amplificación del fragmento A a distintas temperaturas de anillamiento (53°C, 55.5°C, 59°C y 62°C), para la muestra C105 (carriles 3-8).



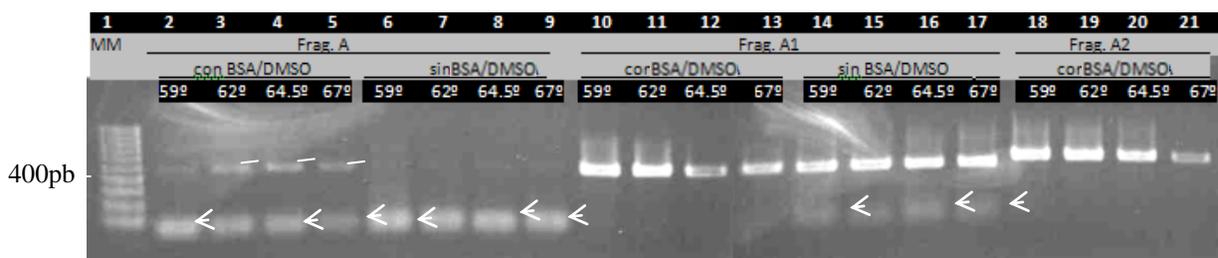
Carril 1: Marcador de masa molecular (100 pb). Carril 2: Control negativo (C-). Las flechas con punta de rombo indican las bandas inespecíficas en el producto de amplificación. Las flechas comunes indican *primer dimer*.

Puesto que la baja detección de Frag. A1 no se debía a un mal anillamiento (los iniciadores tienen 100% de homología con la secuencia objetivo) y de que fueron probados a distintas temperaturas de anillamiento (entre ellas la del  $T_m$ ), se analizaron con el programa en línea Primer-BLAST de NCBI. Se encontró que los iniciadores A1 pueden generar diversos productos con longitudes entre 200 a 1000 pares de bases, aunque no uniéndose con 100% de homología (ver ejemplos en Apéndice. 12, pág. 70). Esto puede explicar, en parte, que no se genere el amplicón deseado.

Una vez descartada la funcionalidad de Frag. A para amplificar muestras del estudio, bajo las condiciones de reacción planteadas, se prosiguió a analizar el uso de otros iniciadores para generar Frag. A1 y A2.

Para los fragmentos A1 y A2 se obtuvo bandas intensas en la visualización del producto de PCR. En la Figura 11 se confirma que los estabilizadores de la enzima Taq (BSA y DMSO) tienen un efecto positivo en la reacción. Se observa que Frag. A1 presenta bandas más intensas con BSA y DMSO (carriles 10 -13) y sin *primer dimer*, comparado a cuando no se utilizan los estabilizadores (carriles 14 -17). Esta reacción es estable en el rango de temperaturas de 59°C a 67°C. Aunque Frag. A2 también presentó bandas específicas e intensas, se escogió utilizar Frag. A1 para analizar las muestras por PCR-SSCP ya es el producto con menor longitud.

Figura 11. Amplificación de Fragmentos A (463 pb), A1 (444pb) y A2 (517 pb) a distintas temperaturas de anillamiento (59°C, 62°C, 64.5°C y 67°C) con y sin los estabilizadores de enzima Taq polimerasa: DMSO y BSA.



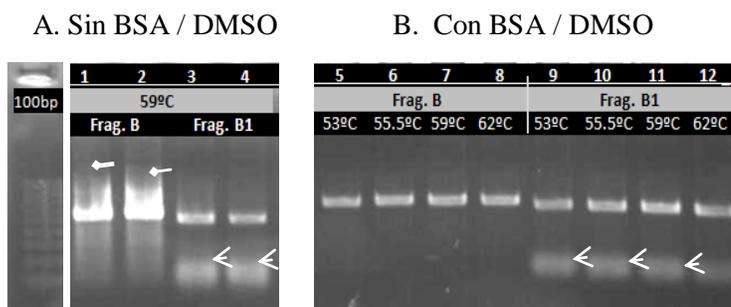
MM, marcador de masa molecular (100 pb). Las flechas indican *primer dimer*. Las flechas sin punta indican bandas poco definidas.

Para la amplificación del segundo fragmento del exón 2, se determinó que se haría con el par de iniciadores de Frag. B, utilizando los estabilizadores de enzima, a 62°C de temperatura de anillamiento. Se observó que los iniciadores para Frag. B y B1 funcionaban específicamente en todo el rango de temperaturas experimentadas (53°C a 62°C), ver carriles 5 – 12 en la Figura 12.

Sin embargo para Frag. B no se generó *primer dimer* (carriles 5 – 8, Figura 12), como sucedió con Frag. B1 (carriles 9- 12) Debido a que se desconoce la influencia del *primer dimer* en el proceso de SSCP, se decidió utilizar Frag. B y evitar problemas en el proceso posterior.

Cuando no se utilizó BSA y DMSO se observó bandas poco definidas y aun más intensas (carriles 1 – 2, Figura 12).

Figura 12. Amplificación de Fragmentos B (490 pb) y B1 (447 pb) a distintas temperaturas de anillamiento (53°C, 55.5°C, 59°C y 62°C), con y sin estabilizadores de enzima Taq polimerasa (DMSO y BSA).



Marcador de masa molecular (100 pb). Las flechas con punta de rombo indican bandas poco definidas. Las flechas indican *primer dimer*.

Para determinar la menor cantidad de ADN con la que se obtenía una adecuada amplificación con los iniciadores de Frag. B, se realizó una curva de concentración de ADN para evaluar el límite de detección de los iniciadores.

En la

Figura 20.B (p. 67, Apéndice. 10) se observa que la amplificación de Frag. B es posible aun con 0.96 ng de ADN por ul de reacción (carriles 11 - 12), esto indica una alta capacidad de detección bajo las condiciones planteadas. La concentración utilizada para la generalidad de reacciones normalmente está entre 4 – 6 ng/ul (carriles 5 - 8). Se observa buena amplificación a dichas concentraciones y aun a 12 ng/ul (carriles 1 - 2). Esto hace notar que una alta concentración de ADN plantilla no tienen un efecto inhibitor para esta reacción.

## D. Optimización de condiciones para SSCP

1. Efecto del glicerol en geles de poliacrilamida y volumen de muestra a cargar. Previamente se ha reportado que el uso de glicerol al 5% o 10% en los geles no desnaturizantes

de poliacrilamida tiene distintos efectos en la migración electroforética, dependiendo en conjunto de las condiciones utilizadas (fuerza iónica del buffer de migración, temperatura de corrida, porcentaje de acrilamida).

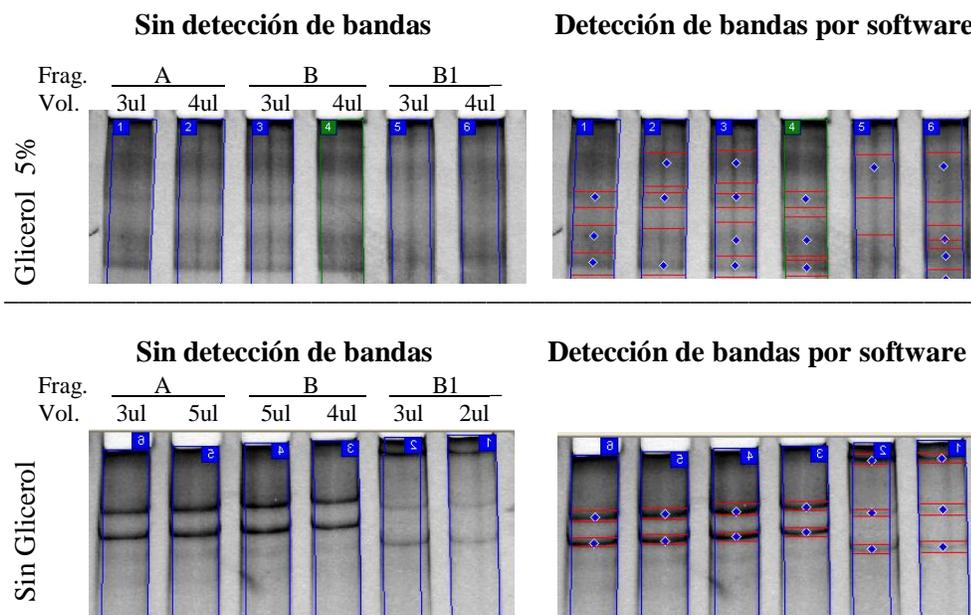
En este estudio se observó que la presencia de glicerol al 5% en los geles produjo manchas con mayor migración que las bandas bien definidas observadas en los geles sin glicerol (Figura 13). Esto es consistente con estudios previos que al analizar por PCR-SSCP el exón 2 de GJB2 no reportan el uso de glicerol (Batissco *et. al* 2009; Green *et. al* 1999).

El glicerol es utilizado ya que en algunos casos ayuda a la separación de las bandas, aunque se desconoce la razón exacta (Hayashi 1991). Su uso podría ser ventajoso al separar muestras con varias bandas, o cuando se tiene amplicones de mayor longitud.

En la Figura 13 se muestra que al utilizar glicerol al 5% en los geles, el programa computacional TotalLab no es capaz de detectar correctamente bandas, sino que marca varias secciones. Debido a que los geles sin glicerol muestran bandas definidas, y sin ambigüedad para el programa, se trabajaron todos los siguientes geles sin glicerol.

A partir de la Figura 13 (siguiente página) se determinó que es suficiente cargar entre 3 a 5 ul de muestra desnaturalizada con el buffer de carga en proporción 1:2.

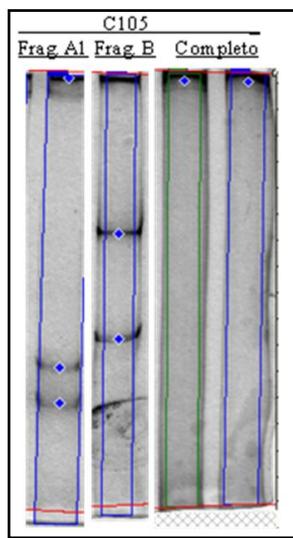
Figura 13. Efecto del glicerol en la migración de Fragmentos A, B y B1; visualización de bandas agregando 2 – 5 ul de de muestra (vol.) y detección de bandas por el software TotalLab.



Muestra control (C105) en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 10.5% con o sin glicerol. Condiciones: 300V máx., 15 mA constante, 190 min. Tinción con solución de nitrato de plata. Con puntos azules se identifican las bandas detectadas por el software TotalLab.

2. Patrones de migración de los fragmentos A1 y B en SSCP. La generación de los fragmentos A1 y B permitió la detección de patrones de migración en las muestras. Al migrar el exón completo (amplicón de 837pb) no se logró que el producto de PCR saliera completamente del pozo. Es decir no se observó ninguna banda (ver Figura 14).

Figura 14. Comparación del patrón de migración de los productos de PCR en fragmentos (A1, B) y producto completo del exón 2 GJB2. Con puntos azules se identifican las bandas en cada carril.



Los fragmentos A1 y B mostraron dos bandas cada uno, en la migración por SSCP para todas las muestras sin mutaciones.

Las bandas de Frag. A1 tuvieron valores de Rf mayores que las bandas de Frag. B.

Cuando las muestras mostraron solamente dos bandas en los geles de SSCP, se calculó la razón de Rfs o la distancia de Rf entre bandas para comparar con las bandas control del mismo gel. Estos valores solamente confirmaron los cambios de migración notados visualmente.

El promedio de la razón de Rf de A1 (de las 10 muestras sin mutaciones) fue 1.093 I.C. 90% de 1.092 – 1.093; mientras que la razón de Rf de B fue de 1.511 con un I.C. 90% de 1.510 – 1.513. Esto deja ver que a la vez que las bandas de B migraban menos en el gel, estaban mucho más separadas entre sí, que las de Frag. A1.

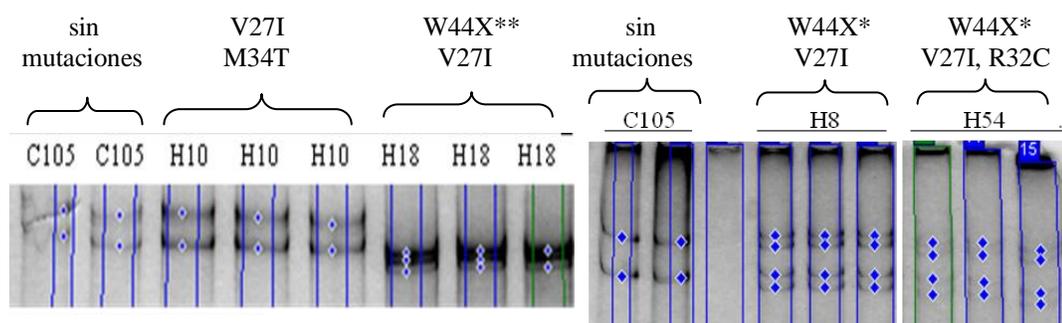
De las nueve muestras con mutaciones confirmadas por secuenciación, solamente H8, H18 y H54 mostraron distinto patrón por SSCP respecto a las muestras confirmadas sin mutaciones (ver

Figura 15). Estas tres muestras poseen dos mutaciones en común: la W44X y la V27I. Debido a que tres muestras (H21, H50, H64) que contaban exclusivamente con la mutación V27I,

no mostraron cambio en el patrón de migración, se concluye que la mutación causante del cambio en la migración es W44X.

Además de que W44X sea detectable, cumple con lo esperado respecto al patrón que presenta al estar en homocigosis o heterocigosis (Walker y Rapley 1998). Se logró distinguir en su forma homocigótica, mostrando únicamente dos bandas; mientras que en su forma heterocigótica mostró cuatro bandas. Ya que esta mutación recesiva causa una señal de detención en el marco de lectura (Ballana *et. al* 2009), es muy conveniente que por PCR-SSCP se pueda conocer el estado de portador de un sujeto con hipoacusia, o el de un sujeto sano.

Figura 15. Patrón de migración del fragmento A1 en geles SSCP para las muestras con la mutación detectable W44X (H18, H8, H54)



Con puntos azules se identifican las bandas en cada carril. La mutación W44X homocigota (\*\*\*) muestra solamente dos bandas, mientras que en heterocigosis (\*) muestra cuatro bandas.

Las mutaciones V27I y M34T (en muestra H10,

Figura 15) no lograron generar un cambio conformacional en la hebra simple de ADN, que repercutiera en un patrón de migración distinto en el gel de SSCP.

V27I está reportada como polimorfismo; y M34T como posible polimorfismo, ya que en la comunidad científica no hay suficiente evidencia que apoye que sea causante de hipoacusia (Kenneson *et al.* 2002).

Durante este estudio se encontró el polimorfismo V27I en 5 de 10 sujetos con audición normal analizados para ser incluidos en el grupo Control Sin Mutaciones. Fue por ello que en dicho grupo se debió incluir muestras de sujetos con hipoacusia, pero libres de mutaciones en el exón a analizar. En el caso de esta mutación, y posiblemente para M34T se puede tomar como una ventaja el hecho de que no sean detectables y que no causen hipoacusia (ni patrones distintos por la técnica PCR-SSCP). Para el propósito planteado para esta técnica, evitaría que muestras con un polimorfismo común, sean enviadas a secuenciar.

La muestra H54 posee, además de las mutaciones de H8, la mutación R32C. Sin embargo, presenta el mismo patrón de migración que la muestra H8 (

Figura 15). Esto indica que R32C no influye en la conformación de la hebra de ADN, por lo que se incluye entre las mutaciones no detectables bajo las condiciones ensayadas (Cuadro 11).

De igual manera, las mutaciones E147K (presente en conjunto con V27I) y R127L, no generaron cambio en la migración en SSCP, por lo que no se consideran detectables por el método PCR-SSCP planeado.

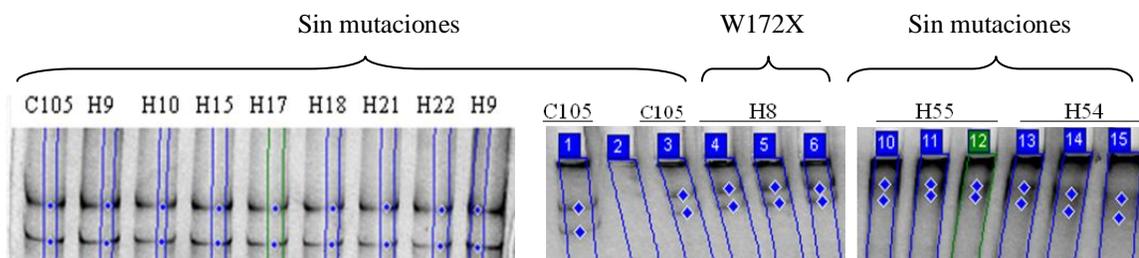
Se ha reportado que en ocasiones el que haya cambio visible en la migración electroforética de SSCP depende del sitio en que se dispone la mutación, dentro de la conformación que adopta la hebra de ADN al migrar.

Cuadro 11. Resumen de las mutaciones detectables en el exón 2 GJB2, por la técnica PCR-SSCP con las condiciones ensayadas.

Fragmento	Mutaciones	Detectable por PCR-SSCP	Mutaciones	Detectable por PCR-SSCP
A1	E147K	No	V27I	No
	M34T	No	W44X	Sí
	R127L	No	R32C	No
B	W172X	No		

Respecto al segundo fragmento del exón 2 GJB2, se observó un mismo patrón para los Frag. B de las 19 muestras. La muestra H8 fue la única con mutación (W172X) en esta región y no pudo ser detectada por PCR-SSCP (Figura 16).

Figura 16. Patrón de migración del Fragmento B de muestras en gel no desnaturalizante de poliacrilamida al 11% (SSCP).



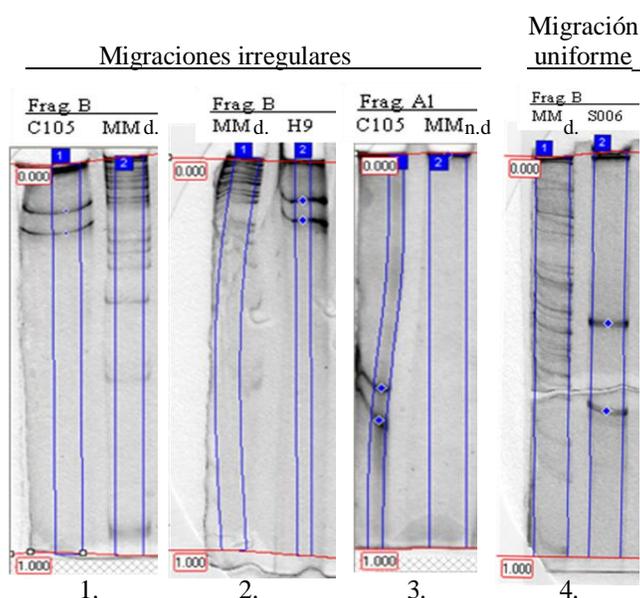
Solo la muestra H8 posee mutación en el Frag. B (W172X), no mostró patrón distinto al de las muestras sin mutaciones. Con puntos azules se identifican las bandas en cada carril.

Además de los cambios en la migración que pueden generar las mutaciones, debe tomarse en cuenta que el voltaje variable afecta sensiblemente la migración en los carriles. Se

encontró que los carriles de la orilla son más propensos a variar cuando no se tiene asegurado un voltaje constante (ver Figura 17).

El uso del marcador molecular es tentativo, ya que en la técnica de SSCP la migración es más dependiente de la secuencia de los fragmentos, que de la masa molecular de las hebras simples de ADN. Por ello, el uso que se le dio en este estudio fue como control de desnaturalización, ya que cuando no es sometido a 95°C, no se observan bandas en el gel (Figura 17). También puede ser una referencia de la separación adecuada de bandas en la migración, y hasta referencia para el paso de revelación durante la tinción con solución nitrato de plata.

Figura 17. Migración de muestras y del marcador molecular (MM) en los carriles de los extremos del gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 11% (SSCP).



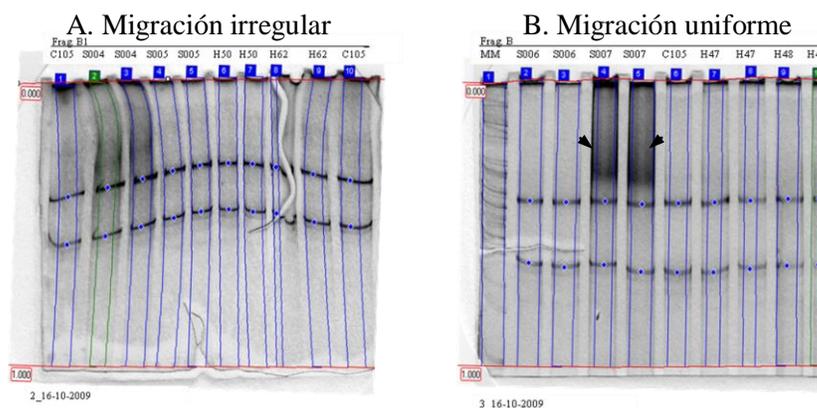
Visualización de MM desnaturalizado (d.) y sin desnaturalizar (n.d). Voltaje máx. 400 V, 25-30 mA, 2.5 – 3 h.

Otro factor de variación en la migración electroforética es la presencia de residuos de poliacrilamida en los pozos. Si los pozos no están debidamente limpos, se genera un tramo inicial extra que la muestra debe de recorrer. Esta interferencia es fácil de detectar al analizar las muestras en duplicado o triplicado en un mismo gel.

También se observó irregularidad en la migración a través de todo el gel (Figura 18). Esto es principalmente debido a variaciones en el voltaje. Si la potencia (vataje) durante la migración es muy variable se obtiene una migración como en la Figura 17A, o bandas desuniformes. Por ello se recomienda no utilizar el voltaje máximo (500V) sino que 150 o 180V.

Esto se debe adaptar, para obtener una potencia máxima de 8 W, ya que si el valor sube a más de 10-12 W los fragmentos se salen del gel.

Figura 18. Patrones de migración para el Fragmento B en todos los carriles del gel poliacrilamida no desnaturizante al 11% (SSCP).



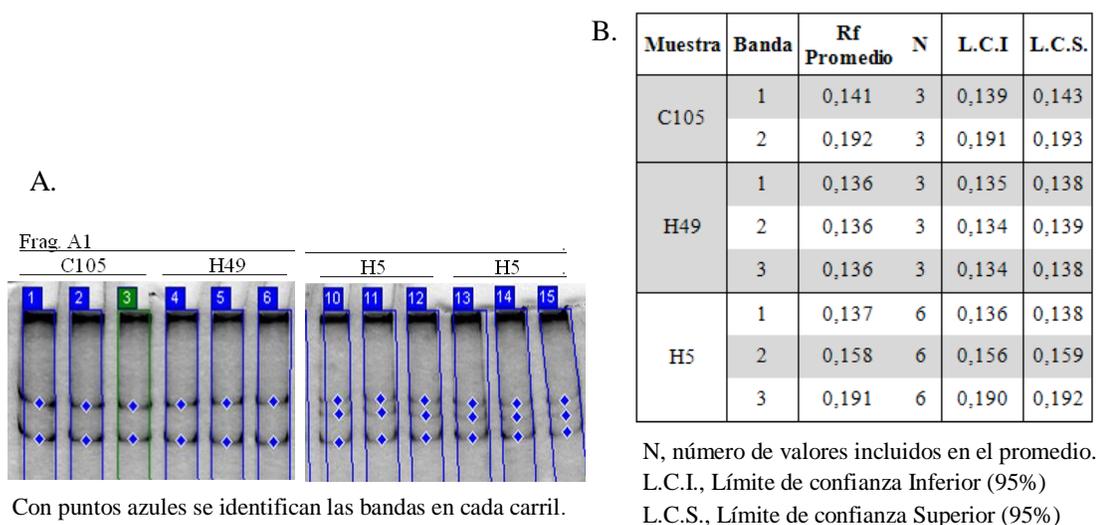
Con flechas se muestra el efecto de colocar exceso de ADN plantilla en la fase de amplificación por PCR.

Debe notarse que aun con geles con migración irregular, el programa computacional con el que se analizó las imágenes de los geles, es capaz de corregir los carriles. Por ello es importante dedicar especial cuidado a adecuar los carriles con el programa, para que sean lo más similares a la migración real.

El efecto de colocar exceso de ADN plantilla en el PCR se ve reflejado como manchas en el gel de SSCP, como se muestra en la Figura 18.B. Si se tiene muestras con exceso de plantilla (notado en el gel de agarosa), debe hacerse una dilución previo a la migración en geles de poliacrilamida para que se facilite la interpretación.

3. Validez y seguridad de la prueba PCR-SSCP. Se encontró que la variación de una muestra en un mismo gel es muy baja. Es decir, se obtuvo un adecuado resultado de repetibilidad para las muestras en SSCP (ver Figura 19).

Figura 19. Repetibilidad de muestras en un gel, para la técnica de PCR-SSCP.



La prueba de PCR-SSCP para la detección de mutaciones en el Fragmento A1 del exón 2 de GJB2, bajo las condiciones estudiadas tuvo una sensibilidad de 33%, con un intervalo de confianza de 8 - 59% (90%) ( $p > 0.05$ ) al ser ensayada para seis genotipos distintos. Debido a que el valor  $p$  asociado a la prueba exacta de Fisher fue de 0.087, la sensibilidad no es estadísticamente significativa para asociar el patrón de migración por PCR-SSCP con el resultado de secuenciación.

Es posible que la técnica tenga una mayor sensibilidad para detectar la presencia de otras mutaciones, pero esto solamente se puede saber hasta que se pruebe con más muestras que contengan mutaciones distintas.

Previamente se ha reportado que una segunda corrida con distintas condiciones es informativa (Spinardi *et al.* 1991), ya que estos factores externos afectan la migración, tanto como la conformación que la hebra simple adopta debido a su secuencia.

Para probar si la sensibilidad de la prueba podía mejorar a temperatura ambiente, se corrió una muestra con mutación V21I y otra con la M34T (ambas indetectables a 4°C), sin embargo no se observó un patrón distinto al de las muestras sin mutaciones (ver Figura 23 , p. 68 en Apéndice. 10).

Debido a la baja sensibilidad de los SSCP bajo las condiciones aquí analizadas, se propone la alternativa del uso de amplicones más pequeños para el mismo gen. Esto implica el uso y diseño de nuevos iniciadores que generarían fragmentos más pequeños que al ser

desnaturalizados y analizados por SSCP tendrían más probabilidad de presentar un cambio de conformación observable en caso de tener variaciones en la secuencia (Sunnuks *et al.* 2000). Esto debe ser explorado, y se debe tomar en cuenta que los costos no aumentarían tanto, ya que se estaría utilizando la misma técnica.

Otra propuesta para aumentar la sensibilidad de detección, es cambiar de metodología y aprovechar las ventajas de los microarreglos para analizar varias mutaciones conocidas a la vez (20 o más). Para aplicar esta metodología se debe continuar haciendo un tamizaje inicial, con el que se determinen las mutaciones presentes en nuestra población, para incluirlas en el microarreglo. De esta manera se ampliaría la información obtenida en una sola prueba ya que se pueden escoger varias mutaciones importantes en genes de distintos loci. Cabe mencionar con los microarreglos no se incrementa tanto los costos como al realizar la secuenciación de muchos fragmentos.

La especificidad de la prueba fue de 100% (el límite superior e inferior con confianza de 90% fue de 100%), esto es debido a que no se observó patrones distintos en muestras sin mutaciones confirmadas por secuenciación.

En conjunto, el valor de sensibilidad y especificidad son un indicador de la validez de la prueba. A pesar de que la especificidad fue del 100%, ésta no se considera una prueba válida debido al bajo valor de sensibilidad causado por la baja diversidad de las muestras con mutaciones.

El valor predictivo positivo de la prueba para la mutación W44X fue de 100%. El valor predictivo negativo fue de 70%. Esto indica que hay más probabilidad de que un resultado positivo lo sea, que la probabilidad de que un resultado negativo, sea en realidad negativo.

Se considera que en este primer acercamiento con los fragmentos diseñados para la detección de mutaciones en el exón 2 GJB2 por PCR-SSCP, se logró determinar con seguridad una mutación detectable, así como las condiciones en las que no se pueden detectar las otras mutaciones analizadas.

Además de la simpleza del método, el costo es del PCR-SSCP por muestra es entre 8 y 10 veces menor que el de la secuenciación (ver Cuadro 13, p. 76 en Apéndice. 15). En caso se logre probar la factibilidad del PCR-SSCP para otras mutaciones causantes de HANSAR, o incluso para las mismas ensayadas pero bajo distintas condiciones, se logrará considerar esta prueba como alternativa a la secuenciación.

## IV. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo muestras sanguíneas de 9 sujetos con hipoacusia HANSAR, que presentaban al menos una mutación en el exón 2 de GJB2. En estas muestras se encontraron seis genotipos.
2. Se obtuvo 10 muestras sanguíneas sin mutaciones en el exón 2 de GJB2, confirmado por secuenciación.
3. Se extrajo ADN de las 19 muestras del estudio, con concentración y pureza adecuada para la amplificación por PCR del exón 2 en dos fragmentos.
4. La amplificación por PCR del exón 2 de GJB2 de todas las muestras en estudio, se logró en dos fragmentos: uno de 444 pb (denominado Fragmento A1) y otro de 490 pb (denominado Fragmento B).
5. Se determinó que la temperatura de anillamiento adecuada para ambos pares de iniciadores es de 62°C, haciendo uso de BSA y DMSO en la reacción de PCR.
6. Fue posible visualizar el patrón sin mutaciones de cada fragmento por SSCP, en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 11% sin glicerol, realizando la migración a 4°C por 2.5 – 3 h a 28-30 mA, con voltaje máximo de 300V.
7. La migración por SSCP del fragmento A1 y del B, mostró dos bandas con distinto patrón. El promedio de la razón del Rf para las muestras sin mutaciones confirmadas fue de 1.11 (I.C. 95% 1.10-1.11) para Frag. A1, y de 1.47 (I.C. al 95% 1.47 – 1.48).
8. El fragmento completo del exón 2 GJB2 (837pb) no fue adecuado para la migración en SSCP con las condiciones experimentales descritas.
9. Las mutaciones E147K, R32C, R127L y W172X, así como los polimorfismos V27I y M34T no fueron detectados por la prueba de PCR-SSCP, con las condiciones estudiadas.
10. De siete mutaciones analizadas, sólo las muestras que contenían la mutación W44X fueron detectable detectable por un patrón de migración distinto en los geles de SSCP. Habiéndose detectado en tres muestras (H8 [W44X, W172X], H18 [W44X, V27I] y H54 [W44X, V27I y R32C]) tanto en homocigosis, como en heterocigosis.
11. Bajo las condiciones estudiadas se obtuvo una sensibilidad de 33% y especificidad de 100% asociadas a un valor  $p = 0.087$  (prueba exacta de Fisher), para detectar las siete mutaciones antes descritas en el exón 2 de GJB2 con la prueba PCR-SSCP.
12. El valor predictivo positivo de la prueba para los genotipos que incluyen la mutación W44X fue de 100% y el valor predictivo negativo fue de 70%.

## V. RECOMENDACIONES

1. Utilizar concentraciones de ADN plantilla menores a 12 ng/ul en las reacciones de PCR para evitar interferencia en la visualización de los geles de SSCP.
2. Utilizar voltaje máximo de 150 – 200 V para la migración de muestras en los geles de SSCP, para evitar migraciones irregulares.
3. Evitar que la potencia (vataje) supere los 10 W, ya que se observó que las bandas salen del gel, corriendo por 3 h.
4. Tratar de utilizar las mismas cámaras electroforéticas y fuentes de poder, para que los resultados sean reproducibles.
5. Conseguir muestras de tres sujetos (como mínimo) con distintas mutaciones aisladas, causantes de hipoacusia HANSAR en el exón 2 GJB2, para analizar si las condiciones del experimento son adecuadas para detectar otras mutaciones. Con ello se determinaría si se puede aumentar la sensibilidad de la técnica a un rango más amplio de mutaciones.
6. Como propuesta para mejorar la sensibilidad de la prueba PCR-SSCP, se puede diseñar nuevos iniciadores para generar amplicones más pequeños, y con ello aumentar las posibilidades de observar el cambio conformacional que generan las mutaciones en el gel de poliacrilamida.
7. A futuro, cuando se conozcan las mutaciones causantes de sordera presentes en nuestra población, se podría estudiar el uso de microarreglo de ADN para incluir las mutaciones más importantes y así analizar la presencia de múltiples variaciones de ADN en una sola prueba.

## VI. LITERATURA CITADA

- Araujo, Z. *et al.* 2008. *Estadísticas mensuales Unidad de Emisiones Otoacústicas Clínica de Niño Sano Hospital Roosevelt*, 2006, 2007 y enero a marzo del 2008.
- Ballana E. *et al.* 2009. *Connexins and deafness Homepage*. (consultado 22/10/2009) [http://davinci.crg.es/deafness/index.php?seccion=mut\\_db&db=nonsynd&nonsynd=cx26mut](http://davinci.crg.es/deafness/index.php?seccion=mut_db&db=nonsynd&nonsynd=cx26mut)
- Batissoco A. C. *et al.* 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 and Hearing* 30 (1): 1 – 7
- Baris, I. y B. Köksal. 2003. *Multiplex Detection of Common Mutations in the Connexin-26 Gene*. *Genetic Testing* 7 (1): 63-65
- Bayazit, Y. A. *et al.* 2003. *GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 67(12):1331-5
- den Dunnen J. T. y S. E. Antonarakis. 2000. *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion*. *Hum. Mutat.* 15 (1):7-12
- Gerido, D. A. *et al.* 2007. *Aberrant hemichannel properties of Cx26 mutations causing skin disease and deafness*. *Am J Physiol Cell Physiol* 293 (1):337-345
- Green, G. E. *et al.* 1999. *Carrier Rates in the Midwestern United States for GJB2 Mutations Causing Inherited Deafness*. *JAMA* 281 (23): 2211-2216
- Hashemzadeh, M. *et al.* 2008. *Molecular Pathology of 6 Novel GJB2 Allelic Variants Detected in Familial and Sporadic Iranian Non Syndromic Hearing Loss Cases*. *Iranian Journal of Public Health* 37 (3): 9-18
- Hayashi K. 1991. *PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA*. *Genome Res.* 1 (1):34-38
- Hennessy, L. K.; J. Teare y C. Ko. 1998. *PCR conditions and DNA denaturants effects on reproducibility of SSCP patterns for BRCA1 mutations*. *Clin Chem.* 44 (4): 879-82
- Kelsell, D. P. *et al.* 1997. *Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness*. *Nature* 387 (6628): 80-83
- Kenneson, A. y C. Boyle. 2004. *From Epidemiology to Clinical Practice: The Connexin Connection*. En: Khoury, M. J., Little, J., Burke, W. eds. *Human Genome Epidemiology: a scientific foundation for using genetic information to improve health and prevent disease*.

<http://www.cdc.gov/genomics/training/books/HuGE/chap24.htm#tables> (consultado 10/02/2009)

- Kenneson, A. *et al.* 2002. *GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. Genet Med* 4 (4): 258-274
- Ko, K. *et al.* 2000. *Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol* 279 (1): 147-157
- Kukita, Y. *et al.* 1997. *SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. Hum Mutat* 10 : 400 – 407
- Hernández, R.; C. Fernández y P. Baptista. 2003. *Metodología de la Investigación*. 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana, México. 785 pp.
- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2006. *Proyecciones de Población y Lugares Poblados con base al XI Censo de Población y VI de Habitación 2002, Periodo 2000-2020*. En: Demografía y Población. <http://www.ine.gob.gt/index.php/demografia-y-poblacion/42-demografiaypoblacion/86-proyeccionesylugarespoblados> (consultado 10/08/2009)
- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2006. *Estadísticas Vitales*. En: Demografía y Población. <http://www.ine.gob.gt/index.php/demografia-y-poblacion/42-demografiaypoblacion/88-estadisticas-vitales> [en PDF] (consultado 10/08/2009)
- Lahiri, D. K. y B. Schnabel. 1993. *DNA Isolation by a Rapid Method from Human Blood Samples: Effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, Storage Time, and Temperature on DNA Yield and Quality. Biochemical Genetics* 31 (7-8): 321-328
- Lancet, D. 2009. *GENECARDS: gap junction protein, beta 2, 26kDa* En: Weizmann Institute of Science. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GJB2>
- Lang, F. *et al.* 2007. *Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. Am J Physiol Cell Physiol* 293 (4): 1187-1208
- Lezirovitz, K. *et al.* 2008. *Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. European Journal of Human Genetics*. 16: 89 – 96
- Maniatis, T.; E. F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Maw, M. *et al.* 1995. *The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. Am. J. Hum. Genet.* 57: 629 – 635
- Mese, G. *et al.* 2008. *Connexin26 deafness associated mutations show altered permeability to large cationic molecules Am J Physiol Cell Physiol* 295 (4): C966–C974

NCBI - National Center for Biotechnology Information  
 gi|51511729|ref|NC\_000013.9|NC\_000013  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/?id=NC\\_000013.9&v=19659330..19665389](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/?id=NC_000013.9&v=19659330..19665389)

------. 2009. *What is a Genetic Testing?* En: GeneTests, About Genetic Services (última revisión 24/02/2009)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/GeneTests/static/concepts/primer/primerwhatistest.shtml> (consultado 03/10/2009)

------. 2004. *What is a Genetics Consultation?* En: GeneTests, About Genetic Services (última revisión 19/03/2004)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/GeneTests/static/concepts/primer/primerwhatisc ons.shtml> (consultado 03/10/2009)

Nussbaum, R.; R. R. McInnes y H. F. Willard. 2001. *Genetics in medicine*. 6a ed. Thompson & Thompson, Pennsylvania. 444 pp.

Orita M. *et al.* 1989. *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-70

Pita, S. y S. Pértegas. 2003. *Pruebas diagnósticas*. Cad Aten Primaria 10: 120-124. Obtenido de:  
[http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas\\_diagnosticas/pruebas\\_diagnosticas.asp](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp)  
 (Consultado 25/08/2009)

Primer-BLAST *Primer designing tool*. En: NCBI - National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Resendes, B. L. *et al.* 2001. *At the Speed of Sound: Gene Discovery in the Auditory System. Am J Hum Genet* 69 (5): 923–935

Sahin-Calapoglu, N. *et.al.* 2005. *Non-syndromic recessive hearing loss Linked TMPRSS3 gene in the Turkish population. S.D.U.Tip Fak, Derg.* 12 (3): 31-35

Scott, D.A. *et al.* 1998. *Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Human Mutation* 11: 387 - 394

Sheffield, V. C. *et al.* 1993. *The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics* 16 :325 - 332

Siemering, K. *et al.* 2006. *Detection of Mutations in Genes Associated with Hearing Loss Using a Microarray-Based Approach. J Mol Diagn* 8 (4): 483–489

Smith, R. J. y G. Van Camp. 2007. *Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview*.  
<http://www.geneclinics.org/profiles/deafness-overview/details.html> (consultado 10/02/2009)

- Spinardi, L.; R. Mazars y C. Theillet. 1991. *Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. Nucleic Ac. Res.* 19 (14) : 4009
- Sunnucks, P. *et al.* 2000. *SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Molecular Ecology* 9: 1699 – 1710
- Sweetow, R. W. 2008. *Hearing Loss Diagnosis*. University of California, San Francisco Medical Center.  
[http://www.ucsfhealth.org/adult/medical\\_services/audio/hearingloss/conditions/hearingloss/diagnosis.html](http://www.ucsfhealth.org/adult/medical_services/audio/hearingloss/conditions/hearingloss/diagnosis.html) (consultado 14/02/2009)
- Walker, J. y R. Rapley. 1998. *Molecular biomethods handbook*, No. 1646. 725 pp. En línea:  
<http://books.google.com.gt/books?id=RaazuJh2jwcC&pg=PA129&dq=dovam+sscp&client=firefox-a#v=onepage&q=sscp&f=false> (consultado 22/10/2009)
- Wang, Y.C. *et al.* 2002. *Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. Eur J Hum Genet* 10 (8): 495-498

## VII. APÉNDICES

Apéndice. 1      Constancia de aprobación del protocolo de toma de muestras, por la Universidad de San Carlos (Página 1 de 2)



DEPARTAMENTO DE DOCENCIA E INVESTIGACION  
HOSPITAL ROOSEVELT, GUATEMALA      FORMULARIO H-R 2

### SOLICITUD PARA AUTORIZACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE POSTGRADO

**INVESTIGADORES:**  
 NOMBRE DEL RESIDENTE: Yamara Yarden Bustamante Rivera  
 DIRECCIÓN Domicilio: 8ª Avenida #2-45 zona 11 del Angelandia  
 Teléfonos: 24744101 53829146  
 Correo electrónico: bustamante12@hotmail.com

**NOMBRE DEL TUTOR:** Gabriel de Jesús Silva  
 DIRECCIÓN Domicilio: Aldas Santa Ana lote #5 Entrada Principal  
 Oficina o clínica: Laboratorio GENLAB - UNICAR  
 Teléfonos: 53854403, 24755905 ext. 279  
 Fax: 24724003  
 Correo electrónico: gabdoctor@yahoo.com

---

DEPARTAMENTO DONDE REALIZARÁ EL ESTUDIO: Pediatría  
 Teléfonos: 24716383 Fax: 24716383 correo electrónico: \_\_\_\_\_

TEMA DE INVESTIGACION: *Escribir claro y letra de molde y legible*  
Mutaciones de conexina 26 en niños con hipocusia no sindrómica de moderada a profunda y de tipo recesivo

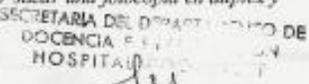
PERIODO DE DURACIÓN: enero 2008 - octubre 2010

FIRMAS DE INVESTIGADORES: [Firma] 2009

  
 Dr. Juan Solís de Dios  
Médico y Cirujano  
Céd. 11629  
Residente

  
 Dr. Gabriel de Jesús Silva  
Tutor

**NOTA:**  
 Al finalizar todo el trámite de autorización, favor sacar una fotocopia en duplex y dejarla en el Departamento de Docencia e Investigación.

  
 RECIBIDO [Firma]  
 A LAS 12:08  
 DE 17/10/08



**Apéndice. 2 Incisos relacionados con la obtención de información de sujetos y muestras de sangre planteados por la Dra. Yomara Bustamante.**

Los incisos presentados a continuación fueron tomados del Protocolo de trabajo de Posgrado en Pediatría, titulado “Mutaciones de conexina 26 en niños con hipoacusia no sindrómica de moderada a profunda y de tipo recesivo.” Este protocolo de trabajo fue aprobado en el 2008 (Anexo A), y se presentan los incisos B1 al B4 para mostrar el planteamiento de trabajo para las muestras de los sujetos.

**B.1 Objetivo:**

Identificar las mutaciones más comunes de conexina 26 (Cx26) en los pacientes con hipoacusia no sindrómica, de moderada a profunda y de tipo recesivo.

**B.2. Instrumentos a utilizar para recolección de información**

Se utilizará una hoja para recolección de datos sobre la historia médica del paciente, historia familiar, así como examen físico completo para descartar anomalías asociadas y el grado de hipoacusia que presenta el paciente. (ver Anexo E, de este documento)

**B.3. Aspectos éticos**

Se utilizará una hoja de consentimiento informado (ver Anexo D, de este documento).

La información de los pacientes será manejada únicamente por la investigadora y el asesor. En el laboratorio sólo se trabajará la muestra identificada con un número.

Las muestras obtenidas serán únicamente utilizadas para fines de este estudio y luego se descartarán, por lo tanto se respetará la confidencialidad de los resultados.

#### B.4. Procedimientos para la recolección de la información

A todo paciente pediátrico del Hospital Roosevelt identificado con hipoacusia moderada a profunda por medio de la audiometría o emisiones otoacústicas realizadas en Niño Sano o referido de cualquier otro centro público o privado con esos estudios ya realizados, se le solicitará su participación en el estudio. Se le explicará al paciente y familia en qué consiste el estudio, cuál es el objetivo y qué procedimiento se llevará a cabo, así como también los beneficios que éste conlleva. Si el paciente desea formar parte del estudio se le solicitará que firme el consentimiento informado y se resolverán dudas en caso de existir. Se procederá después a llenar un formulario con los datos principales como nombre, edad, historia médica, historia familiar; con el objetivo de descartar antecedentes de sordera en la familia, síndromes asociados, sordera adquirida; además se realizará un examen físico en el cual se deberá descartar anomalías menores o mayores que podrían estar asociadas a sordera. Se le citará para tomar la muestra de sangre que servirá para el análisis genético en la Clínica de Cardiogenética y Consejo Genético UNICAR Departamento de Pediatría Fundación Aldo Castañeda. Las citas se darán por la mañana. Al paciente se le recostará en una camilla y se le explicará el procedimiento de la toma de sangre. La muestra se tomará con la técnica vacutainer en los niños mayores puncionando la vena mediana basilar o mediana cefálica; si el niño es menor de 6 años se puncionarán las venas de la mano. La muestra se colocará en un tubo con anticoagulante, heparina sódica. Luego será cultivada por 72 horas en un medio con RPMI 1640, penicilina, estreptomycinina, L-glutamina y citohematoglutinina para tener un medio de cultivo de 10cc. Posteriormente será analizada con la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa para la identificación de mutaciones en el cromosoma 13q12, gen GJB2, Connexina26. Al finalizar el estudio se les informará a los participantes sobre los resultados obtenidos. Las muestras serán procesadas en el Laboratorio GENLAB de UNICAR junto con el equipo del Dr. Silva y del Dr. Daryl Scott.

**Apéndice. 3      Certificado del curso en línea “Protecting Human Research Participants”**



**Apéndice. 4      Formulario CE-LVI1: Lista de verificación del investigador**

Ver en archivos adjuntos.

**Apéndice. 5      Formulario CE-ARP1: Solicitud de aprobación rápida de protocolo**

Ver en archivos adjuntos.



## COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

### LISTA DE VERIFICACIÓN DEL INVESTIGADOR

FORMULARIO CE-LV11

Fecha de Recibido:

**Instrucciones:** Utilice este formulario de verificación antes de enviar protocolos nuevos al Comité de Ética – CE y al completarlo, adjuntarlo a la información enviada.

Fecha de entrega por el Investigador (dd/mm/aa): 5/10/2009

Protocolo No.:

Título del protocolo: **Detección de genes GJB2 (Conexina 26) con mutaciones en el exón 2 por medio de PCR-SSCP**

Tipo de revisión solicitada al CE:

- Normal\* (utilizar formulario CE-APN1)  
 Expedita – de bajo riesgo para los participantes\*\* (utilizar formulario CE-ARP1)  
 Exención – No es de investigación (ver 45CFR & CFR 46.101)\*\*\* (utilizar formulario CE-DEP1)

**Miembro del Comité de Ética – CE designado para la evaluación:**

Nombre(s):

Apellido(s):

Chequear si el proyecto incluye, no incluye o no aplica, las siguientes características:

No.	Descripción	Si	No	NA	Observaciones
1	Fecha de entrega	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
2	Título del protocolo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3	Fechas propuestas	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
4	Datos generales del investigador principal y co-investigadores	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
5	Datos de población a estudiar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Datos de prevalencia
6	Preguntas sobre el diseño del estudio	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
7	Datos sobre fuentes de financiamientos para la ejecución del estudio	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	INVEGEM
8	Datos sobre la localización de la investigación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ciudad de Guatemala
9	Listado de instituciones colaboradoras	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
10	Datos sobre la confidencialidad del estudio	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se recodificará o eliminará el nombre del sujeto.
11	Firmas de aprobación	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
12	Protocolo con antecedentes, literatura revisada y metodología	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
13	Resumen del protocolo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
14	Formatos de reporte de casos	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
15	Copia del consentimiento informado y anexos en español y otros idiomas (si fuera necesario)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
16	Original y cinco copias para los miembros del CE, si no fue enviado electrónicamente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
17	Currículom vitae actualizado de los investigadores (si es primera vez que envían un protocolo nuevo o no pertenece a la UVG)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
18	Material a utilizar para el reclutamiento de los participantes	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
19	Material informativo para participantes en español y otros idiomas (si fuera	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	



# COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

## LISTA DE VERIFICACIÓN DEL INVESTIGADOR

FORMULARIO CE-LVI1

*Excelencia que trasciende*

- necesario)
- |    |  |                                     |                          |                                     |                                 |
|----|--|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 20 | Descripción del acuerdo de indemnización | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |                                 |
| 21 | Descripción de acuerdos de seguro        | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |                                 |
| 22 | Descripción de decisiones significativas | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | Consejo genético por experto/a. |

Nota: No olvide guardar una copia del protocolo con firma y sello de recibido por el CE, para el archivo.

### Aprobaciones/Firmas

Como miembro del CE, acepto la responsabilidad de revisar este proyecto de manera ética y consistente con las políticas y procedimientos contenidos en el "Manual de Ética" de la UVG. Así mismo me comprometo a respetar el principio básico de "Protección de Sujetos Humanos".

Firma:

Investigador Principal

Nombre(s): Karen Sofía

Apellido(s): Hernández Vega

Fecha (dd/mm/aa): 05/10/2009

Notas:

\* **Protocolo Normal:** Utiliza procedimientos invasivos; sí hay recolección de información sensible (estatus HIV), sí implica prueba de HIV/genéticos; se realiza con poblaciones vulnerables: Personas de baja educación, de escasos recursos económicos, niños, mujeres, enfermos mentales, prisioneros, soldados o aquellas personas que tengan dificultad para obtener acceso a los servicios de salud.

\*\* **Protocolo de Bajo riesgo:** No utiliza procedimientos invasivos; no hay recolección de información sensible (estatus HIV), No implica prueba de HIV/genéticos; no se realiza con poblaciones vulnerables: Personas de baja educación, de escasos recursos económicos, niños, mujeres, enfermos mentales, prisioneros, soldados o aquellas personas que tengan dificultad para obtener acceso a los servicios de salud.

\*\*\* **45 CFR 46 & CFR 46.101:** Código de Reglamentos Federales, Título 45 Bienestar Social, Departamento de Salubridad y Servicios Humanos Institutos Nacionales de Salud, Oficina para la Protección de Riesgos De Investigación, Sección 46—Protección de Sujetos Humanos.



## COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

### SOLICITUD DE APROBACIÓN RÁPIDA DE PROTOCOLO

FORMULARIO CE-ARP1

Fecha de recibido (dd/mm/aaaa):

**Instrucciones:** Utilice este formulario cuando envíe protocolos de **bajo riesgo**, (**no utiliza procedimientos invasivos, no hay recolección de información sensible, no implica prueba de HIV / genéticas, no se realiza en poblaciones vulnerables**) , al Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala Envíe este formulario electrónicamente junto con el consentimiento de participación voluntaria y una copia del protocolo y cualquier documento de apoyo Sin embargo, si utiliza otra vía, favor enviar el original y cinco copias de todos los documentos al Presidente del CE. Enumere consecutivamente **TODAS** las páginas, comenzando con la carátula del protocolo, seguido del formulario(s) de consentimiento y otro(s) documento(s) de apoyo. Llene todos los campos requeridos o el formulario será devuelto.

Fecha de entrega por el Investigador (dd/mm/aaaa):

05/10/2009

Protocolo No.

(para uso interno del CE)

Título del  
Protocolo:

Detección de genes GJB2 (Conexina 26) con mutaciones en el exón 2 por medio de PCR-SSCP

Investigador Principal (IP)

Nombre: Karen Sofía

Apellido: Hernández Vega

Grado Académico:

No. Verificación Curso de Ética: 64468

Fecha en que se obtuvo (dd/mm/aa): 30/07/2008

Teléfono: 4007-0615. 78303140 Fax: -

Pais: Guatemala

e-mail: karsohv@yahoo.com

Página Web: -

Co-investigador Principal o Supervisor

Nombre: Andrés

Apellido: Ávalos

Grado Académico: Licenciatura

No. Verificación Curso de Ética:

Fecha en que se obtuvo (dd/mm/aa):

Teléfono: 4618-1866 Fax: -

Pais: Guatemala

e-mail: andrevalos@hotmail.com

Página Web: -

Población:

# Estimado de personas: 20

Distribución por género: 50.00 % femenino 50.00 % masculino

Distribución de raza / etnicidad de las personas incluidas en el estudio:

40.00 % indígenas 60.00 % ladinos % otros: especifique:

Poblaciones Vulnerables

¿Alguna población vulnerable se incluirá en el estudio? Si (si la respuesta es Si, marcar todas las que se aplican):

Mujeres embarazadas (como un grupo clave)

Niños de 17 años de edad o menores

Fetos

Personas con incapacidad mental

Poblaciones cautivas

Personas con desventajas educacionales o económicas

Preguntas sobre el diseño del estudio?

1. ¿Tendrán los investigadores acceso a los identificadores personales?

No

2. ¿Se ha requerido reemplazo, modificación o alguna renuncia de consentimiento informado (escrito u oral) en este proyecto?

No

3. ¿Se solicita un desistimiento de la documentación del consentimiento para este proyecto?

No

4. Si se recolectan especímenes, ¿serán éstos almacenados para su futura utilización?

No



**COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**SOLICITUD DE APROBACIÓN RÁPIDA DE PROTOCOLO**

FORMULARIO CE-ARP1

- 5. ¿Se están realizando pruebas de HIV/SIDA como parte del estudio? No
- 6. ¿Se ha planeado realizar pruebas genéticas? Si
- 7. ¿Se planea, la utilización de alguna droga o equipo médico de laboratorio? (ver regulaciones del FDA) No

Si la respuesta es afirmativa, ver regulaciones del Ministerio de Salud de Guatemala  
Provea información adicional:

Fechas propuestas para la realización del proyecto

Inicio (dd/mm/aa): **15/05/2009** Fin (dd/mm/aa): **31/12/2009**

Fondos

Indicar la fuente de financiamiento: **INVEGEM - Fundación Rozas-Bostrán**

Número de contrato proporcionado por la fuente de financiamiento:

Período de financiamiento: Del (dd/mm/aa): **01/04/2009** al (dd/mm/aa): **31/12/2010**

Área geográfica donde se realizará la investigación: **Ciudad de Guatemala**

Instituciones que colaboran en el estudio

Nombre	Localización	No. de CE	NA
<b>INVEGEM</b>	<b>Guatemala</b>		<input checked="" type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>

Resumen del problema de salud pública que el proyecto estudiará: **La hipoacusia (sordera) no sindrómica, autosómica.**

Objetivos de la investigación: **Detectar mutaciones por PCR-SSCP en el exón2 GJB2**

Métodos para el reclutamiento de participantes: **Por medio de la médica Yomara Bustamante.**

Resumen de los procedimientos a utilizar en los participantes de esta investigación y su grado de riesgo: **Venopunción, muestra de sangre periférica: max 5ml**

Riesgo de la investigación: física, psicológica, social (si hubiere alguno): **Dolor leve de la venopunción.**

Beneficios para los participantes en el estudio (si hubiera alguno): **Conocimiento de su genotipo respecto exón 2, GJB2.**

Manejo de información (seguridad y confidencialidad de la información colectada) y manejo de muestras clínicas: **Muestras re-codificadas, cadena de frío.**

Razones y detalles, si se necesita reemplazar o modificar el consentimiento (de lo contrario, escriba "No aplica: en el espacio en blanco): **No aplica.**

Describa los detalles sobre la forma de asociar los resultados con la información personal del participante. Si las muestras serán almacenadas, de lo contrario escriba "No aplica" en el espacio en blanco: **No aplica.**

Aprobaciones/Firmas

Como investigador principal, acepto la responsabilidad de conducir este proyecto de manera ética y consistente con las políticas y procedimientos contenidos en el "Manual de ética" de la UVG. Así mismo me comprometo a respetar el principio básico de "Protección de sujetos humanos".

Firma:

Investigador Principal



**COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**SOLICITUD DE APROBACIÓN RÁPIDA DE PROTOCOLO**

FORMULARIO CE-ARP1

*Excelencia que trasciende*

Nombre (s): **Karen Sofía**

Apellido (s): **Hernández Vega**

Fecha (dd/mm/aa): **05/10/2009**

Notas:

Firma:

Jefe Inmediato Superior

Nombre (s): **Andrés**

Apellidos (s): **Ávalos**

Fecha (dd/mm/aa): **05/10/2009**

Notas:

**Apéndice. 6      Formulario de consentimiento informado**

---

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Hospital Roosevelt  
Departamento de Pediatría  
Área de Investigación

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Usted está siendo invitado a formar parte del estudio de investigación: “Mutaciones en conexina 26 en pacientes con hipoacusia no sindrómica de moderada a profunda y de tipo recesivo.”

El presente formulario tiene como finalidad proporcionar la información necesaria acerca del estudio de investigación, las finalidades, el procedimiento, beneficios, riesgos, molestias y precauciones. Usted puede negarse a participar o retirarse del estudio cuando lo desee. Solicite al personal del estudio que le explique cualquier palabra que no comprenda, no debe firmar el formulario si tiene dudas que no hayan sido resueltas satisfactoriamente.

Usted o su hijo(a) tiene hipoacusia (sordera) clasificada de grado moderada, severa o profunda y ésta no se asocia a ningún otro síntoma o enfermedad. Se ha descubierto que este tipo de casos de sordera son causados por un cambio en las órdenes intrínsecas del organismo para producir una proteína, necesaria para la audición. La proteína se llama conexina 26 y algunas mutaciones (cambios) en ella son las causantes de la hipoacusia (sordera).

El estudio pretende identificar cuáles son las mutaciones en dicha proteína en la población guatemalteca con hipoacusia. Esto se llevará a cabo durante tres años y para ello se tomarán a 100 pacientes. Se incluirán en el estudio a todos los que cumplan con los requisitos de clasificación de hipoacusia (sordera) moderada, severa o profunda, no sindrómica y recesiva. A estos pacientes que deseen pertenecer al estudio se les tomará una muestra de sangre de la cual se analizará el ácido desoxirribonucleico (ADN) en busca de las alteraciones de los genes de la conexina 26.

---

Las muestras serán analizadas por el grupo de investigación del Laboratorio GENLAB de las instalaciones de UNICAR (Unidad Nacional de Cardiología).

Este tipo de estudio no representa riesgos, molestias o complicaciones para usted. La toma de muestra le causará un leve dolor en el lugar de punción. Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede decidir retirarse del estudio cuando lo desee sin ninguna penalidad ni pérdida de beneficios. Se le informa que su nombre no se divulgará y que su registro solamente podrá ser revisado por el personal médico y del cuerpo regulador (Comité de Ética).

No existe ninguna compensación de cualquier tipo por participar en este estudio y no se le cobrará absolutamente nada a usted por su participación.

Si desea formular preguntas respecto a su participación en este estudio, comuníquese con la Dra. Yomara Bustamante. Tel: 46568160 o con el Dr. Gabriel Silva. Tel: 53854403.

“He podido leer este formulario, y hacer preguntas. Mi participación en este estudio es totalmente voluntaria. Al firmar este consentimiento, reconozco que he sido informado de la naturaleza y propósito del estudio. Puedo negarme a participar en el estudio sin prejuicio alguno a mi persona.”

Consiento en participar en este estudio.

**Firma del consentimiento**

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_  
Identificación: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Testigo**

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_  
Identificación: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Persona que obtuvo el consentimiento**

Nombre y apellidos \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Apéndice. 7      Cuestionario del sujeto para toma de muestra**

---

Hospital Roosevelt  
Departamento de Pediatría  
Investigación de Postgrado

**Boleta de recolección de datos****Mutaciones de Conexina 26 en niños con hipoacusia no sindrómicas de moderada a profunda y de tipo recesivo.**

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Número de teléfono: \_\_\_\_\_

Tipo de hipoacusia: \_\_\_\_\_

Examen físico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Árbol genealógico:

---

La médica encargada de tomar las muestras, cuenta con el audiograma de los sujetos con hipoacusia.

**Apéndice. 8      Secuencia consenso de la región codificante del exón 2 del gen GJB2, con nucleótidos adyacentes.**

Región codificante del exón 2 del gen GJB2 (en negrilla) con nucleótidos adyacentes para mostrar el posicionamiento de los primers y los fragmentos que se generan.

Referencia de NCBI: >ref[NG\_008358.1]:7500-11000 Homo sapiens gap junction protein, beta 2, 26kDa (GJB2) on chromosome 13

AGAGGGTTTGGGAAC TATACATTTAATCCTATGACAACTAAGTTGGTTCTGTCTTCACCTGTTTTGG  
 TGAGGTTGTGTAAGAGTTGGTGGTTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCA **TGCTTGCTTACCCAGACTCA**  
 GAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCTAGCTAGTGATT **CCTGTGTTGTGTGCATTTCGTTCTTTCCAGAGCA**  
**AACCGT** CCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGTGTGAACAAC  
 ACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGT  
 GGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGC  
 TGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTG  
 ATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTG **GCCTACCGGAGACATGAGAA** GAA  
 GAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAACCCAGAA  
 GGTCCGCATCGAAGGCTC **CCTGTGGTGGACCTACACAA** GCAGCATCTTCTCCGGGTCATCTTCG  
 AAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGT  
 GCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTC  
 TTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTT  
 GCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAGCCAGTTTAA CGCATTGCCAGTTGTTAGATTAAG  
 AAATAG **ACAGCATGAGAGGGATGAGG** CAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGG **CTCAGTCGCTAGCATT**  
**TCCC** AACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTC  
 CAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTT  
 AATTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAGGTA

Fragmento	Tamaño (pb)	Iniciador hacia adelante ( <i>Forward</i> )	Iniciador hacia atrás ( <i>Reverse</i> )
A	463	<b>CCTGTGTTGTGTGCATTTCGTT</b> →	
A1	444	<b>TCTTTCCAGAGCAAACCGC</b> →	← <b>CCTGTGGTGGACCTACACAA</b>
A2	517	<b>TGCTTGCTTACCCAGACTCA</b> →	
B	490		← <b>CTCAGTCGCTAGCATTCCC</b>
B1	447	<b>GCCTACCGGAGACATGAGAA</b> →	← <b>ACAGCATGAGAGGGATGAGG</b>

**Apéndice. 9 Cuantificación y pureza de extracciones de ADN de las muestras**

Cuadro 12. Datos de cuantificación y pureza de la extracción de ADN de las muestras.

No.	Muestra Código		Concentración (ng/ul)					Pureza (Razón A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )					Concentración			Pureza		
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	Media (n)	L.C.I.	L.C.S.	Media (n)	L.C.I.	L.C.S.
1	H8	C	80,0	80,0	80,0			1,8	1,8	1,8			80,0 (3)	80,0	80,0	1,8 (3)	1,8	1,8
2	H9	A	79,4	77,1	69,8	107,0	88,0	1,9	1,9	2,4	1,6	1,9	84,3 (5)	77,3	91,3	2,0 (5)	1,8	2,1
3	H9	B	72,2	131,2	82,7	105,5		2,5	1,2	2,5	1,9		97,9 (4)	80,8	115,0	2,0 (4)	1,6	2,4
4	H10	A	85,0	100,0	100,0			2,1	2,0	2,0			95,0 (3)	86,5	103,5	2,0 (3)	2,0	2,1
5	H15	A	40,0	45,0	50,0			2,0	1,8	2,0			45,0 (3)	40,1	49,9	1,9 (3)	1,8	2,0
6	H17	A	40,0	45,0	45,0			1,6	1,8	1,8			43,3 (3)	40,5	46,2	1,7 (3)	1,6	1,8
7	H21	A	20,0	25,0	40,0	25,0		1,3	1,3	1,6	1,7		27,5 (4)**	21,8	33,2	1,5 (4)	1,3	1,6
8	H21	B	42,0	63,5	69,5	67,7		1,0	1,1	1,3	1,2		60,7 (4)	52,4	69,0	1,1 (4)**	1,1	1,2
9	H22	A	96,8	65,0	81,4	58,6	54,9	1,0	1,8	1,3	1,8	2,1	71,3 (5)	62,8	79,9	1,6 (5)	1,4	1,8
10	H22	A	65,0	65,0	65,0	65,0		1,9	1,9	1,9	1,9		65,0 (4)	65,0	65,0	1,9 (4)	1,9	1,9
11	H47	A	70,0	60,0	35,5	70,0		2,0	2,0	2,0			58,9 (4)	48,2	69,5	2,0 (3)	2,0	2,0
12	H47	B	55,0	55,0	55,0	65,0		1,6	1,8	1,8			57,5 (4)	54,2	60,8	1,7 (3)	1,6	1,8
13	H48	A	215,0	220,0	220,0	220,0		2,0	1,9	1,9			218,8 (4)*	217,1	220,4	1,9 (3)	1,9	2,0
14	H48	B	220,0	215,0	215,0			2,0	2,0	2,0			216,7 (3)	213,8	219,5	2,0 (3)	2,0	2,0
15	H49	A	30,0	30,0	25,0			3,0	6,0	5,0			28,3 (3)	25,5	31,2	4,7 (3)*	3,2	6,2
16	H49	B	75,0	85,0	80,0			3,0	2,4	3,2			80,0 (3)	75,1	84,9	2,9 (3)	2,5	3,3
17	H50	A	30,0	25,0	35,0			2,0	2,5	2,0			30,0 (3)	25,1	34,9	2,2 (3)	1,9	2,4
18	H50	B	30,0	40,0	35,0			2,0	2,0	1,8			35,0 (3)	30,1	39,9	1,9 (3)	1,8	2,0
19	H55	A	100,0	95,0	100,0			2,0	1,9	2,0			98,3 (3)	95,5	101,2	2,0 (3)	1,9	2,0
20	H62	A	125,0	130,0	130,0			1,9	2,0	2,0			128,3 (3)	125,5	131,2	2,0 (3)	1,9	2,0
21	H64	A	100,0	115,0	105,0			1,7	1,8	1,8			106,7 (3)	99,2	114,2	1,7 (3)	1,7	1,8
22	C105	A	170,6	222,4	173,1	154,7		1,3	1,1	1,4	1,4		180,2 (4)	161,1	199,3	1,3 (4)	1,2	1,4
23	C105	C	165,4	202,7	205,6	171,3		1,7	1,8	2,0			186,3 (4)	172,6	199,9	1,8 (3)	1,7	2,0
24	C105	D	140,0	150,0	150,0			1,9	1,9	1,9			146,7 (3)	141,0	152,3	1,9 (3)	1,9	1,9
* Valor máximo. ** Valor mínimo								Promedio global					99,3 (24)	88,9	97,9	1,9 (24)	1,7	2,0

n: número de valores para el análisis. L.C.I, Límite de confianza Inferior (95%). L.C.S., Límite de confianza Superior (95%)

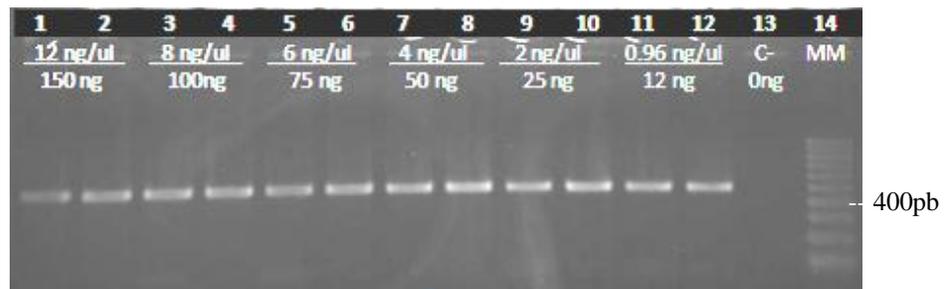
**Apéndice. 10 Figuras obtenidas de la optimización del PCR para los fragmentos del exón 2 GJB2.**

Figura 20. Curva de concentraciones de ADN plantilla para la amplificación de los fragmentos A y B en volúmenes de reacción de 12.5 ul.

A. Fragmento A



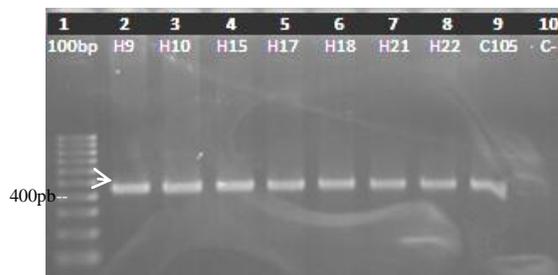
B. Fragmento B



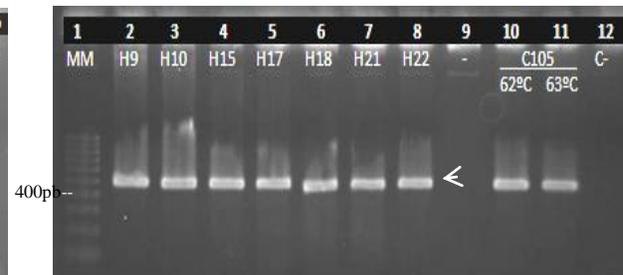
Realizado con la muestra C105. El control negativo (C-) consiste en agua en vez de ADN.  
El marcador molecular (MM) es de 100 pb.

Figura 21. Productos de amplificación por PCR de los Fragmentos A1 y B de muestras.

A. Fragmento A1

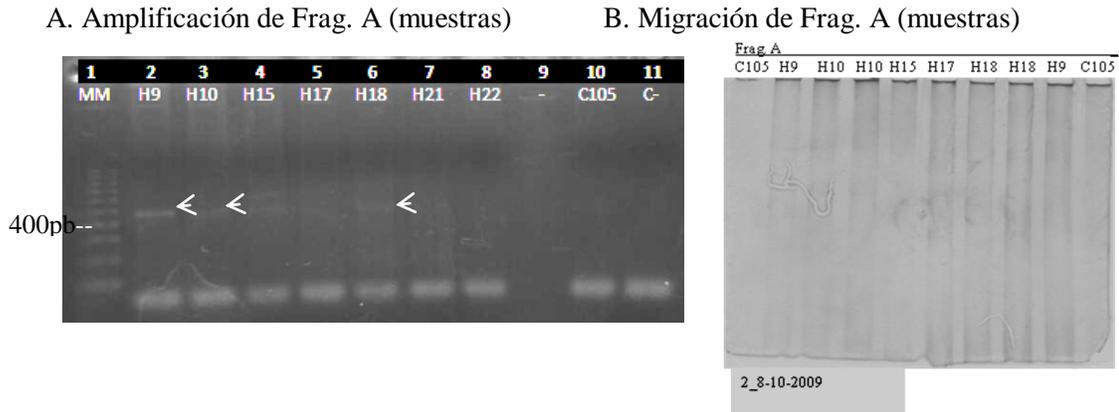


B. Fragmento B



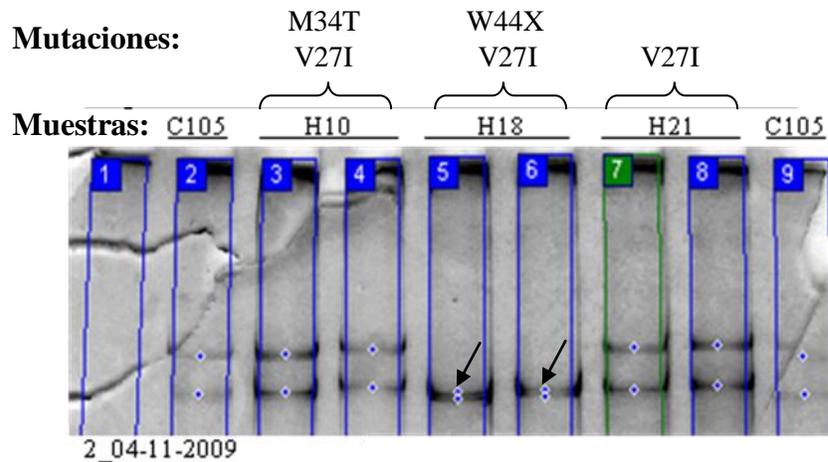
Marcador molecular (MM) de 100 pb. Las flechas indican la banda esperada del producto de amplificación.

Figura 22. Análisis por PCR-SSCP del Fragmento A de muestras.



(A) Amplificación deficiente del fragmento A. Marcador molecular (MM) de 100 pb. Las flechas indican la banda esperada del producto de amplificación. (B) Migración en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 10.5% (SSCP). Condiciones: 500V máx., 25 mA constante, 150 min. Tinción con solución de nitrato de plata. No es posible la obtención de información en el gel de SSCP si la muestra no tuvo una amplificación por PCR adecuada.

Figura 23. Migración en gel de SSCP, de muestras con mutaciones en Fragmento A1.



Las flechas indican un patrón distinto al de la muestra control sin mutaciones (C105).

**Apéndice. 11 Cálculo de los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para la detección de mutaciones en Fragmento A1, por método PCR-SSCP.**

Cambio en patrón PCR-SSCP	Prueba de referencia (secuenciación)		TOTAL
	Presencia de mutaciones	Ausencia de mutaciones	
<b>Positivo</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	2
Fila %	100.0	0.0	100.0
Columna %	33.3	0.0	12.5
<b>Negativo</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	14
Fila %	28.6	71.4	100.0
Columna %	66.7	100.0	87.5
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	16
Fila %	37.5	62.5	100.0
Columna %	100.0	100.0	100.0

Criterio Estadístico	Valor (I.C. al 90%)
1. Sensibilidad	33 % (8 - 59%)
2. Especificidad	100% (100%)
3. Valor Predictivo Positivo (VPP)	100%
4. Valor Predictivo Negativo (VPN)	70 %
5. Valor P, exacto de Fisher (2 colas)	0.087

**Apéndice. 12 Diez productos inespecíficos obtenidos por análisis Primer-BLAST para el par de iniciadores para el Fragmento A del exón 2 GJB2 (Fragmentos menores de 1000 pb)**

>[NT\\_029419.12](#) Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

1. product length = 418  
Features flanking this product:  
[84381 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[532243 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 166072 TT..A.A.....A. 166091  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20
2. product length = 1100  
Features flanking this product:  
[84041 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[531901 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 165732 T.....A.....A. 165751  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 166831 T..C..A.....A. 166812
3. product length = 758  
Features flanking this product:  
[84041 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[532243 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 165732 T.....A.....A. 165751  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 166489 TT....A.....A. 166470
4. product length = 225  
Features flanking this product:  
[296474 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[320343 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 378165 TT....A.....A. 378184  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 378389 TT....A.....A. 378370
5. product length = 732  
Features flanking this product:  
[296474 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[319836 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 378165 TT....A.....A. 378184  
  
Forward primer 1 CCTGTGTTGTGTCATTCGT 20  
Template 378896 TT..A.A.....A. 378877

6. product length = 397  
 Features flanking this product:  
[296474 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[320171 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)
- |                |        |                      |        |
|----------------|--------|----------------------|--------|
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT | 20     |
| Template       | 378165 | TT....A.....A.....A. | 378184 |
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT | 20     |
| Template       | 378561 | TT.C..A.....A.....A. | 378542 |
7. product length = 642  
 Features flanking this product:  
[420994 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[195406 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)
- |                |        |                      |        |
|----------------|--------|----------------------|--------|
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT | 20     |
| Template       | 502685 | TT....A.....A.....A. | 502704 |
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT | 20     |
| Template       | 503326 | TT....A.....A.....A. | 503307 |
8. product length = 929  
 Features flanking this product:  
[84212 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[531901 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)
- |                |        |                          |        |
|----------------|--------|--------------------------|--------|
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT     | 20     |
| Template       | 165903 | TT....A...A.....A.....A. | 165922 |
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT     | 20     |
| Template       | 166831 | T..C..A.....A.....A.     | 166812 |
9. product length = 587  
 Features flanking this product:  
[84212 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[532243 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)
- |                |        |                            |        |
|----------------|--------|----------------------------|--------|
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT       | 20     |
| Template       | 165903 | TT....A...A.....A.....A.   | 165922 |
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT       | 20     |
| Template       | 166489 | TT....A.....A.....A.....A. | 166470 |
10. product length = 760  
 Features flanking this product:  
[84381 bp at 5' side: similar to Protein FAM27E2](#)  
[531901 bp at 3' side: similar to hCG1984643](#)
- |                |        |                            |        |
|----------------|--------|----------------------------|--------|
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT       | 20     |
| Template       | 166072 | TT..A.A.....A.....A.....A. | 166091 |
| Forward primer | 1      | CCTGTGTTGTGTGCATTCGT       | 20     |
| Template       | 166831 | T..C..A.....A.....A.....A. | 166812 |

**Apéndice. 13 Alineamiento de secuencias del ADN de muestras con mutaciones en el exón 2 del gen GJB2.**

		20		40		60		80	
Sin mut	ATGGATTGGG	GCACGCTGCA	GACGATCCTG	GGGGTGTGA	ACAAACACTC	CACCAGCATT	GGAAAGATCT	GGCTCACCGT	80
H8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	80
H10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	80
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	80
H49	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	80
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	80
H55	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	80
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	80
		100		120		140		160	
Sin mut	CCTCTTCATT	TTTCGCATTA	TGATCCTCGT	TGTGGCTGCA	AAGGAGGTGT	GGGGAGATGA	GCAGGCCGAC	TTTGTCTGCA	180
H8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	180
H10	.....	.....	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	180
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	180
H49	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	180
H54	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	180
H55	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	180
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	180
		180		200		220		240	
Sin mut	ACACCCTGCA	GCCAGGCTGC	AAGAACGTGT	GCTACGATCA	CTACTTCCCC	ATCTCCCACA	TCCGGCTATG	GGCCCTGCAG	240
H8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	240
H10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	240
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	240
H49	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	240
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	240
H55	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	240
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	240

Leyenda: Muestras y descripción mutaciones

Punto (·), nucleótidos iguales al de la secuencia “Sin mut”.

**H8:** W44X (nucleótido 131), V27I (nucleótido 79)

**H18:** V27I (nucleótido 79), W44X (nucleótido 131)

**H49:** R127L (nucleótido 380)

**H55:** E147K (nucleótido 439)

**Sin mut:** secuencia de muestra sin mutaciones (coincide con NG\_008358.1)

**H10:** V27I (nucleótido 79), M34T (nucleótido 101)

**H21, H50, H64:** V27I (nucleótido 79)

**H54:** W44X (nucleótido 131), R32C (nucleótido 94), V27I (nucleótido 79)

**Continuación Alineamiento de secuencias del ADN de muestras con mutaciones en el exón 2 del gen GJB2.**

		260		280		300		320	
Sin mut	CTGATCTTCG	TGTCCA CGCC	AGCGCTCCTA	GTGGCCATGC	ACGTGGCCTA	CCGGAGACAT	GAGAAGAAGA	GGAA GTTCAT	320
H8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	320
H10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	320
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	320
H49	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	320
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	320
H55	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	320
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	320
		340		360		380		400	
Sin mut	CAAGGGGGA G	ATAAAGAGTG	AATTTAAGGA	CATCGAGGAG	ATCAAAA CCC	AGAAGGTCCG	CATCGAAGGC	TCCCTGTGGT	400
H8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	400
H10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	400
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	400
H49	.....	.....	.....	.....	.....	..... T	.....	.....	400
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	400
H55	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	400
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	400
		420		440		460		480	
Sin mut	GGACCTACA C	AAGCAGCATC	TTCTTCGGG	TCACTTCGA	AGCCGCCTTC	ATGTACGTCT	TCTATGTCAT	GTACGACGGC	480
H8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480
H10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480
H49	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480
H55	.....	.....	.....	..... A	.....	.....	.....	.....	480
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	480

Punto (·), nucleótidos iguales al de la secuencia “Sin mut”.

**Continuación Alineamiento de secuencias del ADN de muestras con mutaciones en el exón 2 del gen GJB2.**

		500		520		540		560	
Sin mut	TTCTCCATGC	AGCGGCTGGT	GAAGTGCAAC	GCCTGGCCTT	GTCCCAACAC	TGTGGACTGC	TTTGTGTCCC	GGCCCA CGGA	560
H8	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....	560
H10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	560
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	560
H49	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	560
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	560
H55	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	560
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	560
		580		600		620		640	
Sin mut	GAAGACTGTC	TTCA CAGTGT	T CATGATTGC	AGTGTCTGGA	ATTTGCATCC	TGCTGAATGT	CA CTGAATTG	TGTTATTTGC	640
H8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	640
H10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	640
H18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	640
H49	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	640
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	640
H55	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	640
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	640
		660		680					
Sin mut	TAATTAGATA	TTGTTCTGGG	AAGTCAAAA	AGCCAGTTTA	A	681			
H8	.....	.....	.....	.....	.....	681			
H10	.....	.....	.....	.....	.....	681			
H18	.....	.....	.....	.....	.....	681			
H49	.....	.....	.....	.....	.....	681			
H54	.....	.....	.....	.....	.....	681			
H55	.....	.....	.....	.....	.....	681			
H21, H50, H64	.....	.....	.....	.....	.....	681			

Punto (·), nucleótidos iguales al de la secuencia “Sin mut”.

*Alineaciones generada con el programa computacional CLC Sequence Viewer 6.*

**Apéndice. 14 Alineamiento de secuencias de aminoácidos obtenidas por la traducción del ADN de muestras con mutaciones en el exón 2 del gen GJB2.**

		20		40		60		80	
Sin mut T	<b>MDW</b> GT <b>LQ</b> T <b>I</b> L	<b>GGV</b> N <b>KH</b> S <b>T</b> S <b>I</b>	<b>GK</b> I <b>W</b> L <b>T</b> V <b>L</b> F <b>I</b>	<b>FR</b> I <b>M</b> I <b>L</b> V <b>V</b> A <b>A</b>	<b>KE</b> V <b>W</b> G <b>D</b> E <b>Q</b> A <b>D</b>	<b>FV</b> C <b>N</b> T <b>L</b> Q <b>P</b> G <b>C</b>	<b>KN</b> V <b>C</b> Y <b>D</b> H <b>Y</b> F <b>P</b>	<b>I</b> S <b>H</b> I <b>R</b> L <b>W</b> A <b>L</b> Q	80
H8 T	.....	.....	..... .....	.....*	.....	.....	.....	.....	80
H10 T	.....	.....	..... .....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	80
H18 T	.....	.....	..... .....	.....	.....*	.....	.....	.....	80
H49 T	.....	.....	..... .....	.....	.....	.....	.....	.....	80
H54 T	.....	.....	..... .....	.....C.....	.....*	.....	.....	.....	80
H55 T	.....	.....	..... .....	.....	.....	.....	.....	.....	80
H21, H50, H64 T	.....	.....	..... .....	.....	.....	.....	.....	.....	80
		100		120		140		160	
Sin mut T	<b>L</b> I <b>F</b> V <b>S</b> T <b>P</b> A <b>L</b> L	<b>V</b> A <b>M</b> H <b>V</b> A <b>Y</b> R <b>R</b> H	<b>E</b> K <b>R</b> K <b>R</b> F <b>I</b> K <b>G</b> E	<b>I</b> K <b>S</b> E <b>F</b> K <b>D</b> I <b>E</b> E	<b>I</b> K <b>T</b> Q <b>K</b> V <b>R</b> I <b>E</b> G	<b>S</b> L <b>W</b> W <b>T</b> Y <b>T</b> S <b>S</b> I	<b>F</b> F <b>R</b> V <b>I</b> F <b>E</b> A <b>A</b> F	<b>M</b> Y <b>V</b> F <b>Y</b> V <b>M</b> Y <b>D</b> G	160
H8 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	160
H10 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	160
H18 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	160
H49 T	.....	.....	.....	.....	.....L.....	.....	.....	.....	160
H54 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	160
H55 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	160
H21, H50, H64 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	160
		180		200		220			
Sin mut T	<b>F</b> S <b>M</b> Q <b>R</b> L <b>V</b> K <b>C</b> N	<b>A</b> W <b>P</b> C <b>N</b> T <b>V</b> D <b>C</b>	<b>F</b> V <b>S</b> R <b>P</b> T <b>E</b> K <b>T</b> V	<b>F</b> T <b>V</b> F <b>M</b> I <b>A</b> V <b>S</b> G	<b>I</b> C <b>I</b> L <b>L</b> N <b>V</b> T <b>E</b> L	<b>C</b> Y <b>L</b> L <b>I</b> R <b>Y</b> C <b>S</b> G	<b>K</b> S <b>K</b> K <b>P</b> V* 227		
H8 T	.....	.....*	.....	.....	.....	.....	..... 227		
H10 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... 227		
H18 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... 227		
H49 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... 227		
H54 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... 227		
H55 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... 227		
H21, H50, H64 T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... 227		

**Leyenda** (muestras y mutaciones)

Punto ( · ), aminoácidos iguales al de la secuencia “Sin mut”.

Asterisco ( \* ), señal de detención (“Stop”)

**Sin mut:** secuencia de muestra sin mutaciones (coincide con NG\_008358.1)

**H8:** W44X (nucleótido 131), V27I (nucleótido 79)

**H10:** V27I (nucleótido 79), M34T (nucleótido 101)

**H18:** V27I (nucleótido 79), W44X (nucleótido 131)

**H21, H50, H64:** V27I (nucleótido 79)

**H49:** R127L (nucleótido 380)

**H54:** W44X (nucleótido 131), R32C (nucleótido 94), V27I (nucleótido 79)

**H55:** E147K (nucleótido 4399)

**Apéndice. 15 Comparación de costos de detección de presencia de mutaciones por PCR-SSCP y por secuenciación.**

Cuadro 13. Comparación del costo de detección de mutaciones por muestra, por la prueba PCR-SSCP y por secuenciación.

Etapa	PCR-SSCP		PCR-Secuenciación	
	costo mínimo (8 muestras/corrída)	costo máximo (1 muestra/corrída)	costo mínimo (40 muestras)	costo máximo (1 muestra)
<b>1. PCR</b>	\$ 1.50	\$ 1.50	\$ 4.84	\$ 4.84
	2 reacciones, 15 ul c/u		2 reacciones de 55 ul c/u	
<b>2. Electroforesis</b>	\$ 0.13	\$ 1.31	\$ 0.13	\$ 1.31
<b>3. Envío a empresa de secuenciación</b>	n.a.	n.a.	\$ 0.59	\$ 11.76
<b>4. Secuenciación y Purificación</b>	n.a.	n.a.	\$ 14,00	\$ 18,00
<b>5. SSCP</b>	\$ 0.22	\$ 1.33	n.a.	n.a.
<b>TOTAL (\$)</b>	\$ 1.85	\$ 4.14	\$ 19,56	\$ 35,92
Total (Q)	Q15.70	Q35.20	Q166,26	Q305,30

n.a. : no aplica para el análisis.

**Apéndice. 16      Valores obtenidos de los geles de SSCP analizados con el programa computacional TotalLab 120 v.9.**

(Ver páginas siguientes)

Apéndice 16. Valores obtenidos de los geles de SSCP analizados con el programa computacional TotalLab 120 v.9.

Gel	Carril	Muestra	Frag.	Banda	Rf	Razón Rf*	Media de Bandas	Distancia de Rf (D.Rf) entre bandas			
								D.Rf	Media/muestra	N	Dev. Std.
200910062	1	C105	B1	2	0.126	1.5	0.16	0.069	0.069	2	0.001
				3	0.195						
	2	C105	B1	2	0.127	1.5	0.16	0.068			
				3	0.195						
	3	C105	B	1	0.110	1.4	0.13	0.048	0.048	2	0.000
				2	0.158						
	4	C105	B	1	0.114	1.4	0.14	0.048			
			2	0.162							
5	C105	A	1	0.114	1.4	0.14	0.049	0.048	3	0.001	
			2	0.163							
6	C105	A	1	0.115	1.4	0.14	0.048				
			2	0.163							
7	C105	A	1	0.117	1.4	0.14	0.047				
			2	0.164							
200910081	1	C105	B	1	0.261	1.3	0.30	0.078	0.081	2	0.004
				2	0.339						
	2	H9	B	1	0.259	1.3	0.30	0.078			
				2	0.337						
	3	H10	B	1	0.257	1.3	0.30	0.076			
				2	0.333						
	4	H15	B	1	0.258	1.3	0.30	0.076			
				2	0.334						
	5	H17	B	1	0.257	1.3	0.30	0.077			
				2	0.334						
6	H18	B	1	0.255	1.3	0.29	0.078				
			2	0.333							
7	H21	B	1	0.255	1.3	0.30	0.080				
			2	0.335							
8	H22	B	1	0.264	1.3	0.30	0.077				
			2	0.341							
9	H9	B	1	0.262	1.3	0.30	0.079				
			2	0.341							
10	C105	B	1	0.269	1.3	0.31	0.083				
			2	0.352							
20091012_1	1	C105	A1	1	0.287	1.1	0.44	0.026	0.026	1	-
				2	0.313						
	2	H22	A1	1	0.281	1.1	0.44	0.028	0.034	2	0.008
				2	0.309						
	3	H22	A1	1	0.268	1.1	0.42	0.040			
				2	0.308						
	4	H21	A1	1	0.264	1.2	0.42	0.041	0.040	2	0.001
				2	0.305						
	5	H21	A1	1	0.270	1.1	0.42	0.039			
				2	0.309						
6	H18	A1	1	0.308	1.2	0.49	0.060	0.060	2	0.001	
			2	0.368							
7	H18	A1	1	0.285	1.2	0.46	0.059				
			2	0.344							
8	MM	-	-	-	-	-	-				
9	H17	A1	2	0.292	1.1	0.45	0.017	0.018	2	0.001	
			3	0.309							
10	H17	A1	2	0.282	1.1	0.43	0.019				
			3	0.301							

Gel	Carril	Muestra	Frag.	Banda	Rf	Razón Rf*	Media de Bandas	Distancia de Rf (D.Rf) entre bandas				
								D.Rf	Media/muestra	N	Dev. Std.	
200910141	1	C105, 62°C	A1	1	0.622	1.2	0.67	0.094				
				2	0.716							
	2	C105, 59°C	A1	2	0.648	1.1	0.69	0.081	0.084	4	0.002	
				3	0.729							
	3	C105, 62°C	A1	2	0.651	1.1	0.69	0.086				
				3	0.737							
	4	C105, 64.5°C	A1	2	0.652	1.1	0.69	0.082				
				3	0.734							
	5	C105, 67°C	A1	1	0.652	1.1	0.69	0.085				
				2	0.737							
6	C105, 59°C	A2	1	0.593	1.1	0.64	0.086	0.086	3	0.001		
			2	0.679								
7	C105, 62°C	A2	1	0.596	1.1	0.64	0.085					
			2	0.681								
8	C105, 64.5°C	A2	1	0.592	1.1	0.64	0.086					
			2	0.678								
9	C105, 62°C	B	1	0.359	1.7	0.48	0.239	0.239	1	-		
			2	0.598								
10	MM desnat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
200910142	1	C105	A1	1	0.594	1.1	0.63	0.080	0.080	1	-	
				2	0.674							
	2	MM normal	-	SB	-	-	-	-	-	-	-	
	3	H15	A1	1	0.619	1.2	0.67	0.100	0.098	2	0.003	
				2	0.719							
	4	H15	A1	1	0.598	1.2	0.65	0.096				
				2	0.694							
	5	H17	A1	1	0.616	1.2	0.67	0.100	0.096	2	0.006	
				2	0.716							
	6	H17	A1	1	0.615	1.1	0.66	0.092				
2				0.707								
7	H18	A1	1	0.715	1.0	0.73	0.023	0.024	2	0.001		
			2	0.738								
8	H18	A1	1	0.719	1.0	0.73	0.025					
			2	0.744								
9	C105	completo	1	0.016	-	-	-	-	-	-		
10	C105	completo	1	0.017	-	-	-	-	-	-		
20091015_1	1	MM	-	SB	-	-	-	-				
												2
	2	H9	B	1	0.107	1.5	0.13	0.049	0.050	2	0.001	
				2	0.156							
	3	H9	B	1	0.110	1.5	0.14	0.050				
				2	0.160							
	4	H15	B	1	0.110	1.5	0.14	0.050	0.051	2	0.001	
				2	0.160							
	5	H15	B	1	0.103	1.5	0.13	0.051				
				2	0.154							
6	H10	B	1	0.097	1.5	0.12	0.050	0.053	2	0.004		
			2	0.147								
7	H10	B	1	0.102	1.5	0.13	0.056					
			2	0.158								
8	H18	B	1	0.084	1.7	0.11	0.059	0.054	2	0.007		
			2	0.143								
9	H18	B	1	0.088	1.6	0.11	0.049					
			2	0.137								
10	C105	B	1	0.096	1.5	0.12	0.045	0.045	1	-		
			2	0.141								

Gel	Carril	Muestra	Frag.	Banda	Rf	Razón Rf*	Media de Bandas	Distancia de Rf (D.Rf) entre bandas			
								D.Rf	Media/muestra	N	Dev. Std.
200910152	1	C105	B	1	0.122	1.5	0.15	0.056			
				2	0.178						
	2	MM	-	-	-	-	-	-			
	3	H17	B	1	0.113	1.5	0.14	0.052		2	0.000
				2	0.165						
	4	H17	B	1	0.102	1.5	0.13	0.052			
				2	0.154						
	5	H22	B	1	0.100	1.5	0.13	0.051		2	0.000
				2	0.151						
	6	H22	B	1	0.099	1.5	0.12	0.051			
			2	0.150							
7	H21	B	1	0.097	1.5	0.12	0.051		2	0.000	
			2	0.148							
8	H21	B	1	0.094	1.5	0.12	0.051				
			2	0.145							
9	H2	B	1	0.096	1.5	0.12	0.052		2	0.001	
			2	0.148							
10	H2	B	1	0.093	1.5	0.12	0.050				
			2	0.143							
20091015_4	1	-	-	-	-	-	-	-			
	2	C105	B	1	0.315	1.3	0.36	0.092		2	0.006
				2	0.407						
	3	C105	B	1	0.313	1.3	0.35	0.083			
				2	0.396						
	4	H63	B	1	0.312	1.3	0.35	0.084		2	0.001
				2	0.396						
	5	H63	B	1	0.313	1.3	0.36	0.086			
				2	0.399						
	6	H64	B	1	0.312	1.3	0.35	0.084		2	0.001
			2	0.396							
7	H64	B	1	0.306	1.3	0.35	0.086				
			2	0.392							
8	H65	B	1	0.309	1.3	0.35	0.086		2	0.001	
			2	0.395							
9	H65	B	1	0.308	1.3	0.35	0.085				
			2	0.393							
10	-	-	-	-	-	-	-	-			
20091016_1	1	MM	-	-	-	-	-	-			
	2	C105	A1	1	0.553	1.1	0.58	0.048			
				2	0.601						
	3	S004	A1	1	0.526	1.1	0.55	0.042		2	0.000
				2	0.568						
	4	S004	A1	1	0.504	1.1	0.53	0.042			
				2	0.546						
	5	S005	A1	1	0.493	1.1	0.51	0.043		2	0.001
				2	0.536						
	6	S005	A1	1	0.493	1.1	0.51	0.041			
			2	0.534							
7	H50	A1	1	0.499	1.1	0.52	0.040		2	0.002	
			2	0.539							
8	H50	A1	1	0.526	1.1	0.54	0.037				
			2	0.563							
9	H62	A1	1	0.527	1.1	0.55	0.047		2	0.002	
			2	0.574							
10	H62	A1	1	0.545	1.1	0.57	0.050				
			2	0.595							

Gel	Carril	Muestra	Frag.	Banda	Rf	Razón Rf*	Media de Bandas	Distancia de Rf (D.Rf) entre bandas			
								D.Rf	Media/muestra	N	Dev. Std.
20091016_2	1	C105	B	1	0.396	1.4	0.48	0.170	0.166	2	0.006
				2	0.566						
	2	S004	B	1	0.370	1.5	0.46	0.171	0.170	2	0.002
				2	0.541						
	3	S004	B	1	0.343	1.5	0.43	0.168			
				2	0.511						
	4	S005	B	1	0.317	1.5	0.40	0.163	0.163	2	0.000
				2	0.480						
	5	S005	B	1	0.297	1.5	0.38	0.163			
				2	0.460						
6	H50	B	1	0.291	1.6	0.37	0.162	0.164	2	0.003	
			2	0.453							
7	H50	B	1	0.294	1.6	0.38	0.166				
			2	0.460							
8	H62	B	1	0.305	1.5	0.39	0.161	0.164	2	0.004	
			2	0.466							
9	H62	B	1	0.330	1.5	0.41	0.167				
			2	0.497							
10	C105	B	1	0.352	1.5	0.43	0.161				
			2	0.513							
20091016_3	1	MM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	S006	B	1	0.423	1.5	0.53	0.218	0.223	2	0.006
				2	0.641						
	3	S006	B	1	0.424	1.5	0.54	0.227			
				2	0.651						
	4	S007	B	1	0.428	1.5	0.54	0.220	0.228	2	0.011
				2	0.648						
	5	S007	B	1	0.433	1.5	0.55	0.235			
				2	0.668						
	6	C105	B	1	0.430	1.6	0.55	0.243	0.243	1	-
2				0.673							
7	H47	B	1	0.427	1.6	0.55	0.244	0.241	2	0.004	
			2	0.671							
8	H47	B	1	0.426	1.6	0.55	0.238				
			2	0.664							
9	H48	B	1	0.420	1.5	0.54	0.230	0.231	2	0.001	
			2	0.650							
10	H48	B	1	0.417	1.6	0.53	0.232				
			2	0.649							
20091016_4	1	C105	A1	1	0.697	1.1	0.73	0.064	0.054	2	0.015
				2	0.761						
	2	S006	A1	1	0.715	1.1	0.74	0.054	0.056	2	0.003
				2	0.769						
	3	S006	A1	1	0.709	1.1	0.74	0.058			
				2	0.767						
	4	S007	A1	1	0.713	1.1	0.74	0.059	0.059	2	0.000
				2	0.772						
	5	S007	A1	1	0.717	1.1	0.75	0.059			
				2	0.776						
6	H47	A1	1	0.718	1.1	0.75	0.060	0.059	2	0.001	
			2	0.778							
7	H47	A1	1	0.711	1.1	0.74	0.058				
			2	0.769							
8	H48	A1	1	0.709	1.1	0.74	0.057	0.052	2	0.007	
			2	0.766							
9	H48	A1	1	0.718	1.1	0.74	0.047				
			2	0.765							
10	C105	A1	1	0.697	1.1	0.72	0.043				
			2	0.740							

Gel	Carril	Muestra	Frag.	Banda	Rf	Razón Rf*	Media de Bandas	Distancia de Rf (D.Rf) entre bandas			
								D.Rf	Media/muestra	N	Dev. Std.
20091017_2	1	C105	B	1	0.919	1.1	0.059	0.057	2	0.002	
				2	0.978						
	2	C105	B	1	0.925	1.1	0.056				
				2	0.981						
	3	S009	B	1	0.922	1.1	0.053	0.052	2	0.001	
				2	0.975						
	4	S009	B	1	0.922	1.1	0.052				
				2	0.974						
	5	C101	B	1	0.921	1.1	0.052	0.052	2	0.001	
				2	0.973						
6	C101	B	1	0.919	1.1	0.053					
			2	0.972							
7	H41	B	1	0.915	1.1	0.052	0.052	2	0.001		
			2	0.967							
8	H41	B	1	0.925	1.1	0.053					
			2	0.978							
9	H46	B	1	0.923	1.1	0.055	0.057	2	0.004		
			2	0.978							
10	H46	B	1	0.908	1.1	0.060					
			2	0.968							
20091019_1	1	MM	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	C105	A1	1	0.567	1.1	0.064	0.064	1	-	
				2	0.631						
	3	H2	A1	1	0.557	1.1	0.059	0.060	2	0.001	
				2	0.616						
	4	H2	A1	1	0.569	1.1	0.061				
				2	0.630						
	5	H3	A1	1	0.560	1.1	0.062	0.055	2	0.010	
				2	0.622						
	6	H3	A1	1	0.535	1.1	0.048				
			2	0.583							
7	H10	A1	1	0.530	1.1	0.051	0.045	2	0.008		
			2	0.581							
8	H10	A1	1	0.522	1.1	0.039					
			2	0.561							
9	H21	A1	1	0.533	1.1	0.052	0.047	2	0.006		
			2	0.585							
10	H21	A1	1	0.524	1.1	0.043					
			2	0.567							
20091019_2	1	C105	A1	1	0.564	1.12	0.067	0.067	1	-	
				2	0.631						
	2	H62	A1	1	0.570	1.10	0.059	0.059	2	0.000	
				2	0.629						
	3	H62	A1	1	0.578	1.10	0.059				
				2	0.637						
	4	H63	A1	1	0.575	1.11	0.061	0.063	2	0.002	
				2	0.636						
	5	H63	A1	1	0.574	1.11	0.064				
			2	0.638							
6	H64	A1	1	0.575	1.09	0.052	0.059	2	0.009		
			2	0.627							
7	H64	A1	1	0.570	1.11	0.065					
			2	0.635							
8	H65	A1	1	0.579	1.10	0.056	0.028	2	0.040		
			2	0.635							
9	H65	A1				0.000					



Gel	Carril	Muestra	Frag.	Banda	Rf	Razón Rf*	Media de Bandas	Distancia de Rf (D.Rf) entre bandas			
								D.Rf	Media/muestra	N	Dev. Std.
20091123_1	1	C105	A1	1	0.138	1.4	0.23	0.052	0.051	3	0.002
				2	0.19						
	2	C105	A1	1	0.142	1.4	0.24	0.051			
				2	0.193						
	3	C105	A1	1	0.143	1.3	0.24	0.049			
				2	0.192						
4	H49	A1	1	0.141	1.4	0.24	0.055	0.058	3	0.003	
			2	0.196							
5	H49	A1	1	0.139	1.4	0.24	0.058				
			2	0.197							
6	H49	A1	1	0.138	1.4	0.24	0.061				
			2	0.199							
20091123_2	1	C105	A1	1	0.137	1.4	0.23	0.056	0.055	2	0.002
				2	0.193						
	2	C105	A1	1	0.142	1.4	0.24	0.053			
				2	0.195						
	3	-	-	-	-	-	-	-			
	4	H8	A1	1	0.134	n.a.	n.a.				
				2	0.150						
				3	0.191						
				4	0.210						
	5	H8	A1	1	0.131	n.a.	n.a.				
				2	0.147						
				3	0.189						
				4	0.208						
	6	H8	A1	1	0.131	n.a.	n.a.				
				2	0.145						
			3	0.189							
			4	0.207							
10	H55	A1	1	0.137	1.4	0.23	0.055	0.057	3	0.003	
			2	0.192							
11	H55	A1	1	0.134	1.4	0.23	0.060				
			2	0.194							
12	H55	A1	1	0.136	1.4	0.23	0.055				
			2	0.191							
13	H54	A1	1	0.142	n.a.	n.a.					
			2	0.159							
			3	0.194							
			4	0.216							
14	H54	A1	1	0.138	n.a.	n.a.					
			2	0.155							
			3	0.194							
			4	0.212							
15	H54	A1	1	0.133	n.a.	n.a.					
			2	0.147							
			3	0.195							
			4	0.212							
20091123_3	1	-	-	-	-	-	-	-			
	2	C105	B	1	0.093	1.5	0.16	0.046	0.043	3	0.003
				2	0.139						
	3	C105	B	1	0.083	1.5	0.15	0.042			
				2	0.125						
	4	C105	B	1	0.082	1.5	0.14	0.041			
				2	0.123						
	13	H49	B	1	0.096	1.4	0.16	0.040	0.043	3	0.003
				2	0.136						
	14	H49	B	1	0.105	1.4	0.18	0.044			
			2	0.149							
15	H49	B	1	0.111	1.4	0.19	0.046				
			2	0.157							

Gel	Carril	Muestra	Frag.	Banda	Rf	Razón Rf*	Media de Bandas	Distancia de Rf (D.Rf) entre bandas			
								D.Rf	Media/muestra	N	Dev. Std.
20091123_4	1	C105	B	1	0.105	1.5	0.18	0.049	0.045	2	0.006
				2	0.154	-					
	2	-	-								
	3	C105	B	1	0.089	1.4	0.15	0.040			
				2	0.129						
	4	H8	B	1	0.078	1.6	0.14	0.043	0.041	3	0.004
				2	0.121						
	5	H8	B	1	0.077	1.6	0.14	0.044			
				2	0.121						
	6	H8	B	1	0.085	1.4	0.15	0.037			
				2	0.122						
	10	H55	B	1	0.086	1.5	0.15	0.041	0.034	3	0.006
				2	0.127						
	11	H55	B	1	0.083	1.4	0.14	0.033			
				2	0.116						
12	H55	B	1	0.087	1.3	0.15	0.029				
			2	0.116							
13	H54	B	1	0.089	1.5	0.15	0.041	0.042	3	0.001	
			2	0.13							
14	H54	B	1	0.1	1.4	0.17	0.042				
			2	0.142							
15	H54	B	1	0.103	1.4	0.18	0.042				
			2	0.145							