



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Estudio del DNA mitocondrial en familias  
mexicanas con un posible compromiso auditivo  
hereditario”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

**ANDREA SERRANO MARES**

ASESORA: DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CO-ASESORES: DRA. ANA ELVIA SÁNCHEZ MENDOZA

DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Estudio del DNA mitocondrial en familias mexicanas con un posible compromiso auditivo hereditario**

Que presenta la pasante: **Andrea Serrano Mares**  
Con número de cuenta: **417085906** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Estudio del DNA mitocondrial en familias mexicanas con un posible compromiso auditivo hereditario**

Que presenta la pasante: **Andrea Serrano Mares**  
Con número de cuenta: **417085906** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	<u></u>
<b>VOCAL</b>	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles</u>	<u></u>
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	<u></u>
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	<u></u>
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	<u></u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

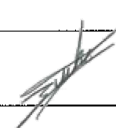
**Estudio del DNA mitocondrial en familias mexicanas con un posible compromiso auditivo hereditario**

Que presenta la pasante: **Andrea Serrano Mares**  
Con número de cuenta: **417085906** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**


**Estudio del DNA mitocondrial en familias mexicanas con un posible compromiso auditivo hereditario**

Que presenta la pasante: **Andrea Serrano Mares**  
Con número de cuenta: **417085906** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	_____
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles	_____
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Estudio del DNA mitocondrial en familias mexicanas con un posible compromiso auditivo hereditario**

Que presenta la pasante: **Andrea Serrano Mares**

Con número de cuenta: **417085906** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al proyecto PAPIIT-IN226419 por proporcionar materiales y equipo para la realización de este trabajo, al igual que al Dr. José Francisco Montiel por permitir que el trabajo se realizara en el laboratorio 18 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4. Asimismo, a la Dra. Ana Elvia Sánchez Mendoza por instruirme y apoyarme en el laboratorio durante el proyecto.



## **DEDICATORIAS**

Este trabajo se lo dedico a mis padres, a mis hermanos y demás familiares que me apoyaron para poder concluir una etapa más en mi vida. Gracias por todo.

También quiero agradecer a todas las personas increíbles que pude conocer en esta facultad, gracias por su amistad, las risas y los momentos que compartimos, ustedes saben quiénes son. Igual agradezco a mis amistades de la preparatoria y a aquellos que conocí por otras circunstancias, por su compañía estos últimos años.

Por último, pero no menos importante, gracias Dra. Maritere por su tiempo, apoyo y motivación durante estos años.

Gracias a todos por creer en mí.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
Capítulo 1: El oído	2
1.1 Anatomía	2
1.1.1 Oído externo	2
1.1.2 Oído medio	3
1.1.3 Oído interno	4
1.2 Fisiología	7
Capítulo 2: Hipoacusia	8
2.1 Definición	8
2.2 Clasificación	8
2.3 Causas	9
2.4 Diagnóstico	10
2.5 Tratamiento	11
Capítulo 3: Mutaciones asociadas a hipoacusia	12
3.1 Autosómico dominante	12
3.2 Autosómico recesivo	13
3.2.1 GJB2: 35delG	13
3.3 Ligado al cromosoma X	14
3.4 Mitocondrial	15
3.4.1 Genoma mitocondrial	15
3.4.2 MTRNR1 (A1555G)	17
3.4.3 G7444A	17
Capítulo 4: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
4.1 PCR-RFLP	19
4.2 AS-PCR	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 General	22

3.2	Particulares	22
4	METODOLOGÍA Y RESULTADOS	23
4.1	Población de estudio	23
4.2	Toma de muestra	23
4.3	Extracción y evaluación de DNA	23
4.4	PCR-RFLP de A1555G	24
4.4.1	PCR	24
4.4.2	Electroforesis	25
4.4.3	RFLP y electroforesis	26
4.5	PCR-RFLP de G7444A	30
4.5.1	PCR	30
4.5.2	RFLP y electroforesis	30
4.6	AS-PCR de 35delG en GJB2	34
4.6.1	AS-PCR	34
4.6.2	Electroforesis	38
5.	DISCUSIÓN	39
6.	CONCLUSIONES	45
7.	REFERENCIAS	46
8.	ANEXOS	53
8.1	Consentimiento informado y cuestionario	53

## ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AS-PCR	PCR alelo específica
ATP	Adenosín trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
GJB2	Proteína de unión gap beta-2
GJB6	Proteína de unión gap beta-6
ng	Nanogramos
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribosómico
RNAt	RNA de transferencia
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
Tm	Temperatura de fusión
μL	Microlitro
35delG	Delección de guanina en la posición 35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del oído.....	2
Figura 2. Estructura del oído medio.....	4
Figura 3. Laberinto óseo y laberinto membranoso del oído interno.....	5
Figura 4. Corte transversal de la cóclea con sus respectivos conductos e inervación.....	6
Figura 5. Componentes del órgano de Corti.....	7
Figura 6. Conformación de los conexones y de las uniones tipo gap.....	14
Figura 7. Genoma mitocondrial humano.....	16
Figura 8. DNA genómico aislado de las muestras en un gel de agarosa 0.8%.....	24
Figura 9. Electroforesis del amplicón en gel de agarosa 1.5% con cinco muestras.....	26
Figura 10. Amplicón sin la mutación A1555G.....	27
Figura 11. Amplicón con la mutación A1555G.....	28
Figura 12. Gel <i>in silico</i> de los fragmentos esperados con el SNP A1555G y sin el SNP.....	29
Figura 13. Amplicón sin la mutación G7444A.....	31
Figura 14. Amplicón con la mutación G7444A.....	32
Figura 15. Gel <i>in silico</i> de los fragmentos esperados con el SNP G7444A y sin el SNP.....	33
Figura 16. Amplificación con los primers externos para el gen GJB2.....	34
Figura 17. Información del primer forward interno y estructuras de hairpin que se forman.....	36
Figura 18. Homodímero y heterodímero del primer forward interno.....	36
Figura 19. Información del primer reverse interno y estructuras de hairpin que se forman.....	37
Figura 20. Homodímero con el valor más bajo de delta G del primer reverse interno.....	37
Figura 21. Gel <i>in silico</i> de los fragmentos esperados de individuos homocigotos y heterocigotos en GJB2.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de causas de la hipoacusia.....	9
Tabla 2. Principales genes causantes de hipoacusia con herencia autosómica dominante.....	12
Tabla 3. Principales genes causantes de hipoacusia con herencia autosómica recesiva.....	13
Tabla 4. Locus y genes causantes de hipoacusia con herencia ligada al cromosoma X.....	15
Tabla 5. Variantes de PCR más conocidas.....	19
Tabla 6. Preparación para un volumen de 25µL para la PCR.....	24
Tabla 7. Programa de PCR para el polimorfismo A1555G.....	25
Tabla 8. Programa de PCR para el polimorfismo A1555G.....	25
Tabla 9. Par de primers para la posición 7444 del genoma mitocondrial.....	30
Tabla 10. Primers externos para el gen GJB2.....	34
Tabla 11. Primers internos para la delección en la posición 35.....	35

## **RESUMEN**

La hipoacusia es una disminución en la capacidad auditiva que afecta a 3 de cada 1000 recién nacidos en México, tiene gran impacto a nivel social y económico, y es ocasionada por agentes ambientales o congénitos, dentro de estos últimos se encuentran diferentes patrones de herencia, entre los que destaca el autosómico recesivo y mitocondrial. A nivel mundial, una de las mutaciones que se ha registrado mayormente en asociación con la hipoacusia de tipo no sindrómica (que sólo afecta al oído) es una delección de guanina en la posición 35 del gen nuclear GJB2, que da lugar un tipo de proteína importante en el funcionamiento de las células ciliadas de la cóclea. Otra mutación de las que se tiene registro es la A1555G en el genoma mitocondrial que codifica para la subunidad 12S del RNAr, está asociada con la hipoacusia por ototoxicidad de aminoglucósidos; igualmente, en el genoma mitocondrial se ha registrado la mutación secundaria G7444A en el gen CO1 (de la cadena transportadora de electrones).

Con el propósito de detectar dichas mutaciones de forma rápida y eficiente sin recurrir a otras técnicas de biología molecular más costosas, se diseñaron los primers para trabajar con PCR-RFLP y AS-PCR con ayuda de las herramientas bioinformáticas, que además permitieron analizar y predecir los resultados que podrían esperarse experimentalmente de pacientes con o sin la mutación. Asimismo, se buscó aplicar una forma alternativa para tomar con mayor facilidad la muestra de epitelio de la mucosa oral que se utilizó, al igual que se buscó una forma de extraer el DNA sin comprometer la seguridad del investigador y con menor impacto en el medio ambiente, manteniendo concentración y pureza óptimos para estudiarse posteriormente con las técnicas de biología molecular ya mencionadas.

Estas metodologías propuestas buscan exhortar al estudio a profundidad de la hipoacusia no sindrómica en México para plantear un diagnóstico integral y oportuno que contribuya a mejorar la calidad de vida de la población afectada.

# 1. INTRODUCCIÓN

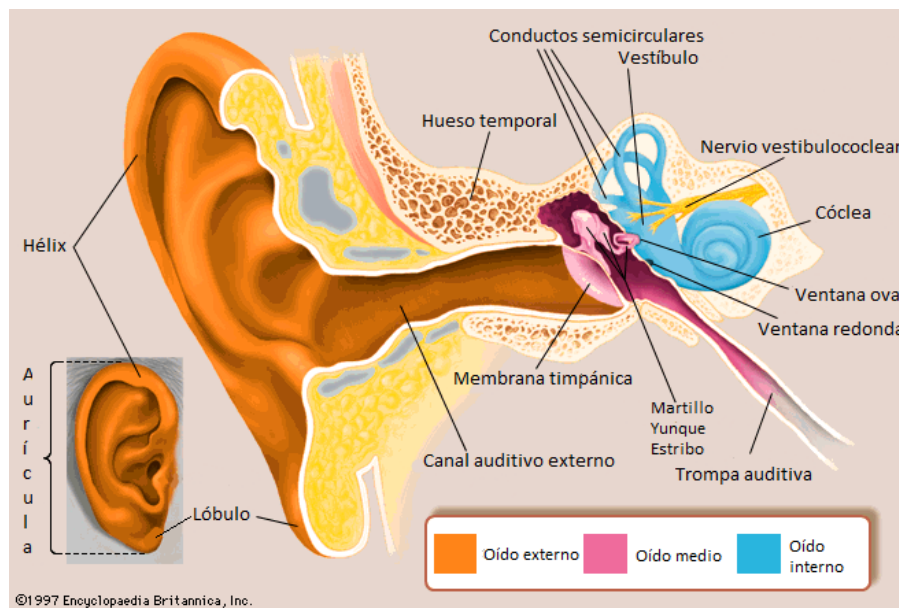
## Capítulo 1: El oído

### 1.1 Anatomía

El oído es el sentido que nos permite percibir sonidos, por la conversión de ondas sonoras en señales eléctricas, y mantenernos en equilibrio gracias a los receptores que posee en su interior. Se divide en tres partes: externa, media e interna (Figura 1) (Tortora & Derrickson, 2013).

#### Figura 1

*Anatomía del oído*



*Nota.* Adaptada de Structure of the human ear, de Encyclopædia Britannica, (<https://academic-eb-com.pbidi.unam.mx:2443/levels/collegiate/article/human-ear/109529>). De dominio público.

#### 1.1.1 Oído externo

Está constituido por la aurícula, pabellón auricular u oreja; por el conducto o canal auditivo externo y el tímpano o membrana timpánica. El pabellón auricular consta de cartílago elástico cubierto por piel, formando huecos y surcos, al borde se le denomina hélix y a la parte inferior se le conoce como lóbulo (Encyclopædia Britannica, 2021).

A continuación de la aurícula se encuentra el canal auditivo externo, un conducto ligeramente curvo con una región de cartílago en la parte inicial y después con una región ósea, todo cubierto con piel. En las paredes de este canal, específicamente en la porción de cartílago, se encuentran las glándulas ceruminosas que secretan el cerumen o cerilla para proteger al oído de agentes externos (Lalwani, 2018).



Al final del conducto auditivo inicia la membrana timpánica, separando el oído externo del oído medio. Es delgada y semitransparente, consiste en tres capas: la primera es de piel, la segunda está constituida por tejido conectivo con fibroblastos y fibras elásticas que le confieren la tensión y rigidez a la membrana, y la última es una capa de epitelio. La membrana cuenta con buena irrigación de vasos sanguíneos y terminales nerviosas que le confieren sensibilidad al dolor (Encyclopædia Britannica, 2021).

### **1.1.2 Oído medio**

Está conformado por una cavidad llena de aire, cubierta por epitelio, las estructuras que se mencionan a continuación se puede observar en la Figura 2. La pared anterior de esta cavidad tiene una abertura que permite la conexión entre el oído medio y la porción superior de la garganta (nasofaringe) mediante la trompa auditiva o trompa de Eustaquio; normalmente esta abertura se encuentra cerrada, exceptuando el momento de deglución o durante un bostezo para que se equilibre la presión interna con la presión atmosférica. La trompa auditiva está rodeada de hueso del lado superior, mientras que en la parte más cercana a la faringe está constituida por cartílago. (Encyclopædia Britannica, 2021; Tortora & Derrickson, 2013).

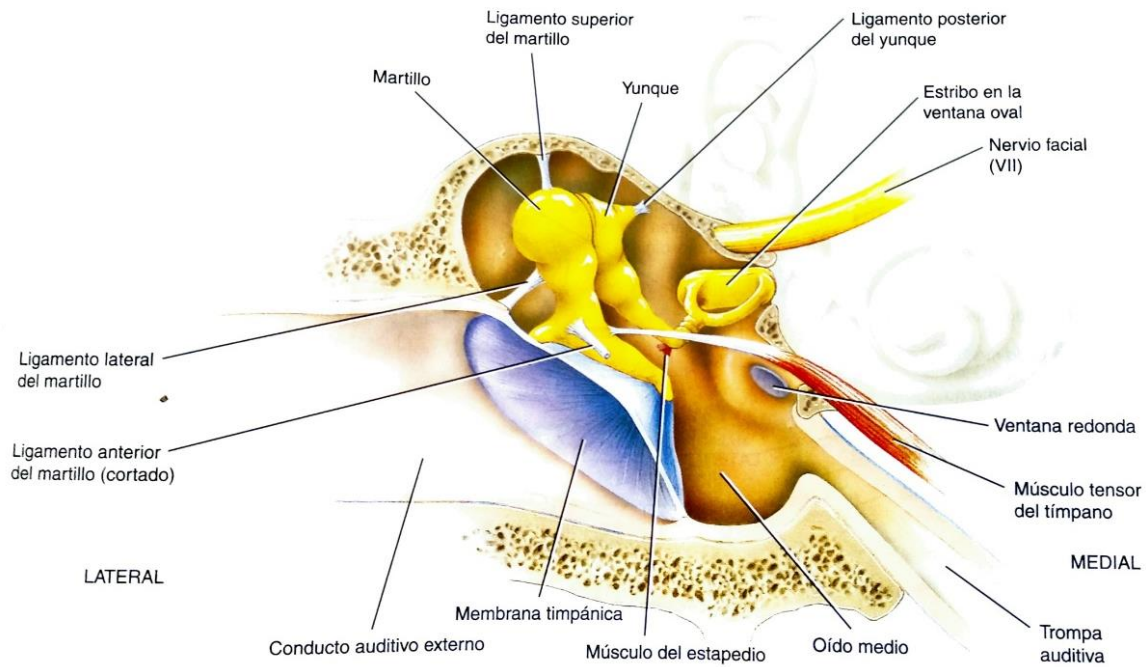
En la pared que separa al oído medio del interno se hallan dos orificios o fenestraciones, una arriba de otra, a la superior se le conoce como ventana oval o vestibular y la inferior es la ventana redonda o coclear. Uniendo a la membrana timpánica con la ventana oval, adheridos por ligamentos al oído medio, se encuentran los huesecillos u osículos, que por su forma se les conoce como martillo, yunque y estribo. La cabeza del martillo y el cuerpo del yunque están articulados juntos, a su vez el yunque se une con la cabeza del estribo y la plataforma de éste se ajusta con la ventana oval (Tortora & Derrickson, 2013).

En esta sección del oído se encuentran dos músculos que ayudan en la adhesión de los huesecillos, se trata del músculo estapedio, que se encarga de atenuar las vibraciones en el estribo producidas por sonidos fuertes para proteger a la ventana oval; el otro músculo es el músculo tensor del tímpano, conectado al martillo, encargándose de aumentar la tensión de la membrana timpánica con el fin de evitar daños a causa de ruidos fuertes (Lalwani, 2018; Tortora & Derrickson, 2013).

En cuanto a estructuras nerviosas, el principal es el nervio facial, que pasa por el oído medio, tiene tres ramificaciones en el hueso temporal. La primera rama provee de nervios a la glándula lagrimal, la segunda rama inerva al músculo estapedio y la última pasa debajo de la membrana timpánica pero da inervación a glándulas sublinguales y submandibulares. Otro nervio de importancia es el timpánico, que inerva al epitelio del oído medio y a la trompa auditiva (Lalwani, 2018).

## Figura 2

### *Estructura del oído medio*



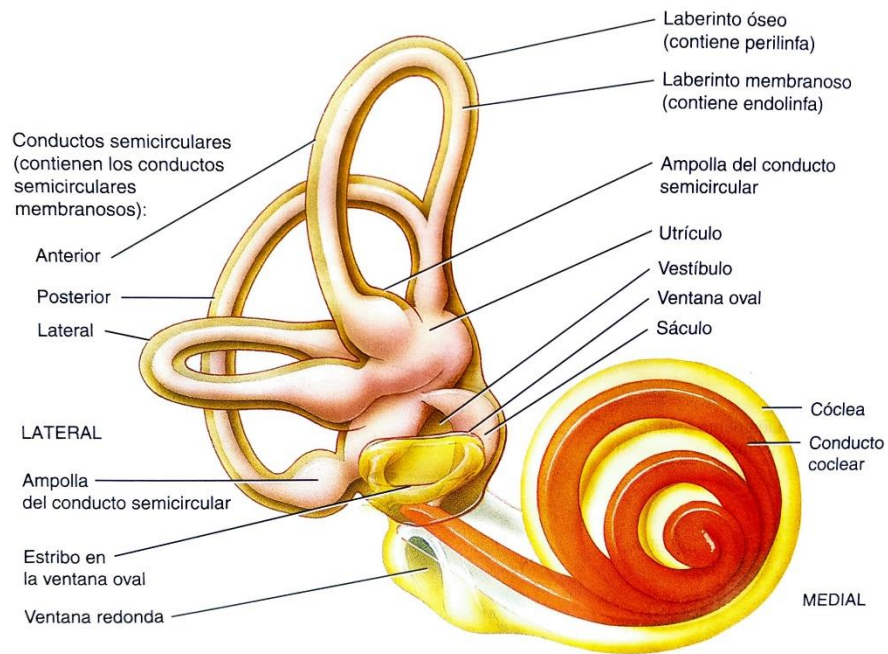
*Nota.* Reproducida de *Principios de Anatomía y Fisiología* (p. 659), de G. J. Tortora & B. Derrickson, 2013, Médica Panamericana. Copyright 2013 de Editorial Médica Panamericana.

### **1.1.3 Oído interno**

Ubicado en la profundidad del hueso temporal, también denominado laberinto, el oído interno consta de una cámara membranosa, llena de endolinfa (con niveles altos de potasio), dentro de una cámara ósea, que contiene perilinfa (parecido al líquido cefalorraquídeo), como se aprecia en la Figura 3 (Lalwani, 2018).

### Figura 3

#### *Laberinto óseo y laberinto membranoso del oído interno*

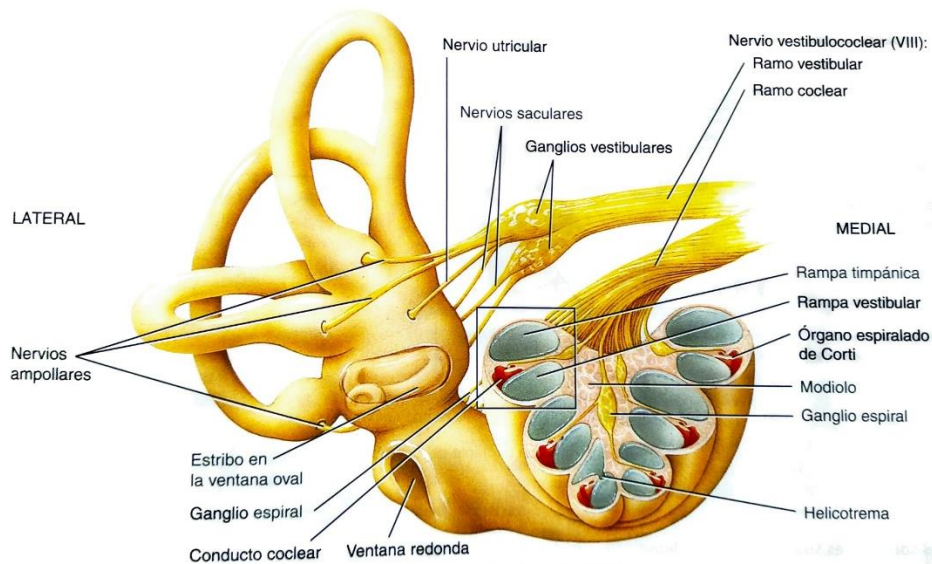


*Nota.* Reproducida de *Principios de Anatomía y Fisiología* (p. 660), de G. J. Tortora & B. Derrickson, 2013, Médica Panamericana. Copyright 2013 de Editorial Médica Panamericana.

La cámara ósea tiene tres subdivisiones: el vestíbulo, conformado por dos sacos (el utrículo y el sáculo), cada uno con un conjunto de células sensoriales que son fundamentales para la modulación del equilibrio; los canales semicirculares, que se denominan de acuerdo con su posición como superior, lateral y posterior, son perpendiculares entre sí y están conectados con el vestíbulo, en su interior se encuentran los conductos semicirculares membranosos y cada uno posee un ensanchamiento al final, al que se le conoce como ampolla (tanto los conductos óseos, como los membranosos); finalmente, la cóclea es la que se encarga de la audición, tiene forma de espiral y se divide en tres conductos: rampa vestibular, rampa timpánica y rampa media o conducto coclear (Figura 4); las primeras dos están llenas de perilinfa y están conectadas entre sí mediante una abertura llamada helicotrema, mientras que la rampa media tiene endolinfa (Encyclopædia Britannica, 2021; Tortora & Derrickson, 2013).

## Figura 4

*Corte transversal de la cóclea con sus respectivos conductos e inervación*



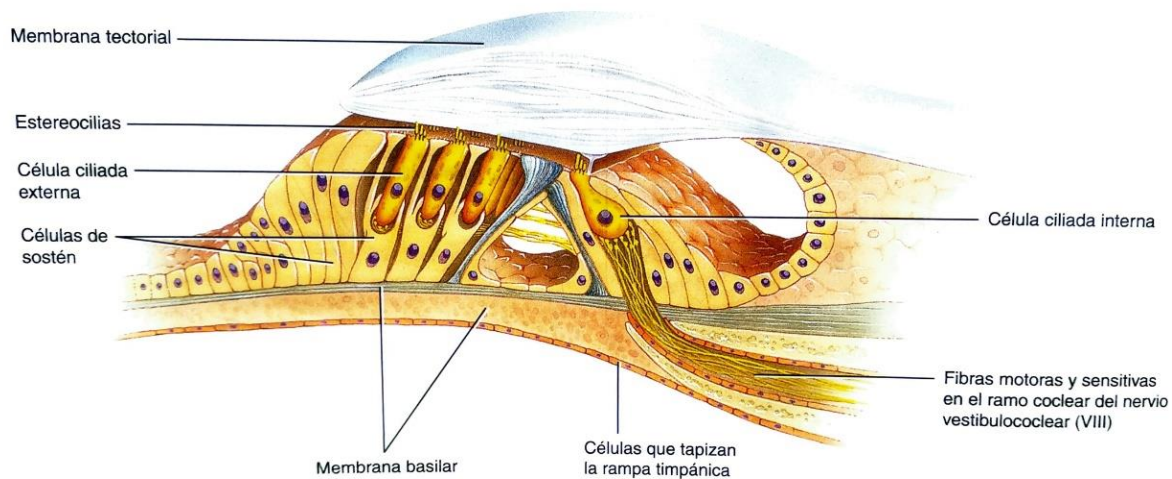
*Nota.* Reproducida de *Principios de Anatomía y Fisiología* (p. 661), de G. J. Tortora & B. Derrickson, 2013, Médica Panamericana. Copyright 2013 de Editorial Médica Panamericana.

Dentro del conducto coclear se encuentra el órgano de Corti (Figura 5), donde están las células que responden al sonido: las células pilosas. En conjunto con las células de sostén, conforman este órgano, un complejo epitelial apoyado en la membrana basilar en el que están distribuidas en hileras: de las células pilosas o ciliadas internas sólo hay una hilera y de células pilosas externas hay tres hileras. Cada célula ciliada tiene alrededor de 40 a 80 estereocilias en la parte superior, microvellosidades compuestas de actina y de diferente altura, que están en contacto con la membrana tectorial (Encyclopædia Britannica, 2021).

Las células ciliadas hacen sinapsis con neuronas del ganglio espiral, que a su vez forma el ramo coclear del nervio vestibulococlear, el cual juega un papel importante en la transmisión de impulsos eléctricos al cerebro, que más adelante se menciona en la fisiología del oído. Por otro lado, el ramo vestibular del nervio vestibulococlear tiene interacciones nerviosas en células del sáculo y del utrículo, mediadas por neuronas del ganglio vestibular (Marieb, 2008).

## Figura 5

### Componentes del órgano de Corti



*Nota.* Reproducida de *Principios de Anatomía y Fisiología* (p. 662), de G. J. Tortora & B. Derrickson, 2013, Médica Panamericana. Copyright 2013 de Editorial Médica Panamericana.

### 1.2 Fisiología

El proceso de la audición comienza cuando se producen ondas sonoras que, al viajar por el aire, llegan a nuestro oído para ser procesadas. Pasan por el conducto auditivo externo hasta llegar a la membrana timpánica, donde se convierten en vibraciones que varían dependiendo de la frecuencia del sonido, de ahí pasan por cada uno de los huesecillos y finalmente llegan a la ventana oval, en la que se crean ondas de presión hacia la perilinfa de la cóclea. Estas ondas van de la rampa vestibular a la rampa timpánica por el helicotrema y se disipan al llegar a la ventana redonda para pasar a la endolinfa del conducto coclear y transmitir las vibraciones a la membrana basilar. Esto ocasiona que las células ciliadas del órgano de Corti se muevan en sentido opuesto a la membrana tectorial, lo que provoca que los estereocilios se inclinen, de modo que ocurre la transducción de energía mecánica y eléctrica (Encyclopædia Britannica, 2021).

Como se mencionó anteriormente, la endolinfa tiene un contenido alto de iones potasio, lo que se traduce en un potencial (el cual es positivo) que incrementa el gradiente electroquímico como consecuencia fluyen constantemente los iones potasio a las células ciliadas (con potencial negativo). Los iones se mantienen en circulación gracias a su difusión en la perilinfa y por las proteínas llamadas conexinas, que se encargan de uniones intercelulares.

Cuando los estereocilios se inclinan, se modifica la permeabilidad de la membrana de las células ciliadas, permitiendo la entrada de iones potasio que provocan una despolarización (cambios en el potencial intracelular), de manera que se liberan vesículas con el neurotransmisor glutamato en el espacio sináptico con las neuronas pertenecientes al nervio vestibulococlear para enviar impulsos nerviosos al cerebro y así registrar el sonido (Lalwani, 2008; Sánchez, *et al.*, s. f.).

## **Capítulo 2: Hipoacusia**

### **2.1 Definición**

La hipoacusia se define como una disminución en la capacidad de percibir los sonidos, de acuerdo con Delgado (2011), ya sea en ambos oídos (bilateral) o sólo en uno (unilateral). Por otro lado, de forma más concreta, la OMS (2019) establece que alguien padece hipoacusia si la audición es igual o mayor a 25dB; cabe mencionar que la unidad de medida de la intensidad sonora es el decibel y el oído humano es capaz de detectar sonidos desde 1dB hasta 140dB, que ya se trata de un sonido que causa dolor (Fonoteca Nacional, 2018).

### **2.2 Clasificación**

La hipoacusia se puede clasificar de distintas formas dependiendo el criterio que se tome en cuenta. Por el grado de audición puede ser: leve (de 26 a 40dB), el individuo presenta algunas dificultades para escuchar y entender diálogos desde cierta distancia o para distinguir diálogos de sonidos de fondo; moderada (41 a 60dB), el individuo tiene dificultades para escuchar las conversaciones regularmente, incluso a distancias cortas; severa (61 a 80dB), el individuo sólo escucha sonidos y conversaciones fuertes; o profunda (mayor a 81dB), los sonidos fuertes se perciben como vibraciones (OMS, s. f.).

En relación con la adquisición de las habilidades de lenguaje, se habla de hipoacusia perlocutiva o prelingual al presentarse antes del desarrollo del lenguaje (0 a 2 años de edad); perilocutiva cuando se presenta entre los 2 y 4 años de edad; o es poslocutiva o poslingual si aparece después de que las habilidades básicas del lenguaje ya se adquirieron (Arenas-Sordo, *et al.*, 2020).

Anatómicamente, la hipoacusia se clasifica en función de la zona del oído que está afectada. Es conductiva o de transmisión, cuando el oído externo o medio es el afectado, por lo que las ondas sonoras no se transmiten adecuadamente; frecuentemente este tipo de hipoacusia está originada por las malformaciones, traumatismos e infecciones. Es neurosensorial o de percepción, si la lesión ocurre a nivel del oído interno, específicamente en la cóclea (sensorial), o en el nervio vestibulococlear (neural); sus causas suelen ser el envejecimiento, la ototoxicidad, la exposición prolongada a sonidos fuertes, procesos autoinmunes o tienen un origen genético. En caso de presentar alteración en las zonas ya mencionadas, entonces se trata de una hipoacusia mixta, ya sea por una superposición donde alguna de las alteraciones es transitoria o por la progresión de otra patología que afecta de forma secundaria al oído (Arenas-Sordo, *et al.*, 2020; Olarieta, *et al.*, 2015).

Cabe mencionar que las hipoacusias con origen genético se dividen en sindrómicas y no sindrómicas. Las sindrómicas se refieren a que se presentan alteraciones en otros órganos o sistemas aparte del oído, además de haber cierta relación con malformaciones del oído externo. Mientras que en las hipoacusias no sindrómicas (o puras) no se presentan otros signos o síntomas fuera del oído medio e interno (Pavón, 2012).

### 2.3 Causas

Las causas que dan lugar a la hipoacusia pueden dividirse en congénitas y adquiridas. Las de tipo congénitas consisten en complicaciones durante el embarazo o el parto, además de mutaciones genéticas; mientras que las adquiridas pueden afectar al individuo en cualquier etapa de su vida (OMS, 2019).

**Tabla 1**

*Tipos de causas de la hipoacusia*

<b>Congénitas</b>	<b>Adquiridas</b>
Infecciones: citomegalovirus, rubéola, sífilis, toxoplasmosis, herpes.	Traumatismos craneoencefálicos o del oído: ruptura timpánica, fracturas, luxación de los huesecillos.
Uso inadecuado de medicamentos ototóxicos: aminoglucósidos, diuréticos, antipalúdicos.	Exposición continua a ruidos fuertes, ya sea en el entorno laboral, en conciertos u otros eventos, o por el uso de audífonos.
Hiperbilirrubinemia.	Obstrucción por cuerpos extraños o por acumulación de cerumen.
Bajo peso al nacer.	Uso de medicamentos ototóxicos y de quimioterapia.
Malformaciones: microtia, síndrome de Goldenhar, síndrome de Treacher Collins.	Otitis media aguda y crónica.
<b>Mutaciones genéticas</b>	Enfermedades autoinmunes del oído.
Autosómicas recesivas.	Enfermedades autoinmunes donde se ve afectada la audición.
Autosómicas dominantes.	Infecciones: meningitis, sarampión, parotiditis.
Ligadas al cromosoma X.	Envejecimiento (degeneración de la vía nerviosa o pérdida de las células ciliadas).
Mitocondriales.	Tumores del oído medio.

*Nota.* Adaptado de "Detección precoz de la hipoacusia infantil" de J. J. Delgado, 2011, *Pediatría Atención Primaria*, 13(50), p. 279-297. ([http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322011000200012&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322011000200012&lng=es&tlng=es)); "Hearing Loss in Adults: Differential Diagnosis and Treatment" de T. C. Michels, M. T. Duffy, & D. J. Rogers, 2019, *Am Fam Physician*, 100(2), p. 98-108. (<https://www.aafp.org/afp/2019/0715/p98.html>); "Sordera y pérdida de la audición" de Organización Mundial de la Salud, 2019, (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>). Copyright 2011 de SciELO

En cuanto a las hipoacusias que tienen origen genético, predominan las de tipo no sindrómico, las cuales tienen un patrón de herencia autosómico recesivo en su mayoría (alrededor del 80% de casos), en segundo lugar está el autosómico dominante (cerca del 20% de los casos), seguido del 1% correspondiente a una herencia ligada al cromosoma X y menos del 1% de casos con patrón de herencia mitocondrial. Más de 200 genes pueden estar asociados con esta patología y sólo se han identificado alrededor de 90, con la posibilidad de que un mismo gen puede presentar distintas mutaciones, por ejemplo el gen GJB2 que está implicado en el funcionamiento del oído (Mishra, *et al.*, 2018).

## **2.4 Diagnóstico**

Llegar al diagnóstico no siempre es fácil o rápido, por lo que se recurre a la historia clínica, exploración física y pruebas audiométricas. En la historia clínica se deben revisar los antecedentes familiares, la exposición a ruido y a ototóxicos, al igual que se debe revisar si el paciente presenta síntomas que estén relacionados a esta u otra patología. En la exploración física se realiza una otoscopia para revisar la integridad, posición y color de la membrana timpánica, puesto que puede encontrarse perforada, o puede revelarse la presencia de otitis o de colesteatoma. También se revisa si no hay cuerpos extraños o cerumen en exceso que obstruyan el conducto auditivo externo, u otra anomalía (Olarieta, *et al.*, 2015).

En cuanto a las pruebas audiométricas, algunas son para confirmar que se trata de hipoacusia, mientras que otras permiten diferenciar el tipo de pérdida que presenta el paciente. Las de acumetría permiten conocer la simetría de la audición, así como orientar al médico si se trata de una hipoacusia neurosensorial o conductiva; las principales son la prueba de Weber y la prueba de Rinne. También se cuenta con la audiometría tonal, con la que se puede comprobar si hay hipoacusia o no, el tipo y grado, generando un gráfico que se denomina audiograma. El timpanograma se realiza para corroborar la integridad de la membrana timpánica o si en la otoscopia se encontró fluido en el oído medio. La prueba de potenciales evocados auditivos es una prueba electrofisiológica en la que se introduce un audífono en el oído para evaluar la respuesta del cerebro a estímulos, es una prueba que se suele emplear en niños. Igualmente está la de emisiones otoacústicas, en la que se evalúa la integridad de la cóclea al introducir un micrófono cerca de la membrana timpánica para detectar estas emisiones que son generadas por las células ciliadas en respuesta a ondas sonoras, esta prueba es la que se realiza en el Tamiz Neonatal Auditivo en México (Berlanga, *et al.*, 2013; Korver, *et al.*, 2017; Olarieta, *et al.*, 2015).

Otras pruebas se pueden llegar a realizar de forma preliminar, una de ellas consiste en que el médico frota suavemente sus dedos a una distancia aproximada de 15cm del oído del paciente, otra prueba consiste en susurrar palabras o números a una distancia mayor que en la prueba anterior, el paciente se cubre un oído y tiene que repetir las palabras o números. En ocasiones se aplican cuestionarios con respuesta sí/no, o donde a las respuestas se les asigna un valor que al final se suma. Algunos cuentan con audiómetros portables o utilizan aplicaciones en dispositivos móviles para evaluar la audición del paciente (Michels, *et al.*, 2019; Nieman & Oh, 2020).



Con el fin de desentrañar la etiología, se recurre a algunas pruebas adicionales, tales como pruebas de imagen o pruebas de laboratorio si se sospecha de una enfermedad sistémica. Asimismo, se debe evaluar de forma cognitiva a los pacientes con hipoacusia, puesto que puede estar acompañada de deterioro cognitivo, depresión o demencia. En pocos casos se recurre al diagnóstico genético, en el que se suele evaluar al gen GJB2, y en ocasiones el GJB6, por medio de técnicas de biología molecular, sólo se procede a evaluar otros genes si los primeros no presentan mutaciones y si se considera necesario o se cuenta con el equipo para realizar las pruebas; sin embargo, este tipo de diagnóstico es muy útil para el asesoramiento genético en la planificación familiar, así como en la toma de decisiones para escoger el mejor tratamiento o terapia (Korver, *et al.*, 2017; Michels, *et al.*, 2019).

## **2.5 Tratamiento**

El otorrinolaringólogo o especialista que esté a cargo, ofrecerá al paciente un tratamiento o terapia en función de la causa de hipoacusia o el estado de gravedad del paciente, se divide en dos grupos: tratamiento quirúrgico y no quirúrgico. En los no quirúrgicos se encuentran medicamentos recetados según el caso, ya sea que la hipoacusia sea provocada por una enfermedad autoinmune o una infección; si la causa es una obstrucción del canal auditivo, entonces se remueve el objeto o el cerumen que obstruye (de forma manual o con cerumenolíticos); también están los programas de rehabilitación y educación que, principalmente, son para proveer estrategias de comunicación al paciente y sus familiares, así como pláticas informativas sobre cuidados y consejos para su vida diaria; finalmente, están los dispositivos de ayuda auditiva como los audífonos/aparatos auditivos y los dispositivos de asistencia auditiva (teléfonos, amplificadores, etc.) (Michels, *et al.*, 2019).

La opción más común dentro del tratamiento quirúrgico es el implante coclear y se implementa en casos leves hasta severos de hipoacusia neurosensorial; consiste en un micrófono, un transmisor, un receptor o estimulador y un electrodo intracoclear, su función es enviar las señales directamente al nervio vestibulococlear. También se realizan cirugías para reconstruir el oído cuando ha habido algún traumatismo o en malformaciones, siempre y cuando sea viable, o en el caso de colesteatoma u otros tumores que puedan ser removidos (Korver, *et al.*, 2017; Nieman & Oh, 2020).

### Capítulo 3: Mutaciones asociadas a hipoacusia

Como ya se ha mencionado, una gran diversidad de genes se ha asociado a la hipoacusia, la mayoría son genes que codifican para factores de transcripción y proteínas que desempeñan un papel importante en el proceso de la audición, tales como las conexinas, proteínas extracelulares, canales iónicos, de transporte (Arenas-Sordo, *et al.*, 2020).

Una forma que se ha establecido para denominar las hipoacusias hereditarias por su patrón de herencia es con las siglas DFN (por *deafness*=sordera, en inglés) seguido de una A, si se trata de un mecanismo autosómico dominante, una B si es autosómico recesivo, o una X si es ligado al X; luego sigue un número que se asignó según el orden en que se fueron descubriendo. En el caso de las mutaciones mitocondriales se utilizan las letras MT y luego se escribe RNR si la mutación es en un gen de RNA ribosomal, o TS si es en uno de RNA de transferencia (Pavón, 2012).

#### 3.1 Autosómico dominante

La mayoría de hipoacusias con este patrón de herencia son de tipo poslingual y bilaterales simétricas; el 18% son no sindrómicas, aunque algunos genes pueden ocasionar también hipoacusia sindrómica (Arenas-Sordo, *et al.*, 2020). A continuación se enlistan los principales genes que se han identificado, puesto que en OMIM se tienen registrados 65 locus que se asocian a hipoacusia.

**Tabla 2**

*Principales genes causantes de hipoacusia con herencia autosómica dominante*

Locus (OMIM)	Gen	Proteína que codifica
DFNA1	DIAPH1	DRF1 (O60610)
DFNA2A	KCNQ4	Canal de potasio dependiente de voltaje subunidad Kv7.4 (P56696)
DFNA2B	GJB3	Conexina 31 (O75712)
DFNA3A	GJB2	Conexina 26 (P29033)
DFNA3B	GJB6	Conexina 30 (O95452)
DFNA4	MYH14	Miosina-14 (Q7Z406)
DFNA5	GSDME	Gasdermina-E (O60443)
DFNA6/14/38	WFS1	Wolframina (O76024)
DFNA8/12	TECTA	Alfa-tectorina (O75443)
DFNA9	COCH	COCH-5B2 (O43405)
DFNA17	MYH9	Miosina-9 (P35579)
DFNA11	MYO7A	Miosina-VIIa (Q13402)

*Nota.* El número entre paréntesis corresponde al número de identificación en UniProt.

### 3.2 Autosómico recesivo

Suelen ser hipoacusias bilaterales, prelinguales y moderadas a severas, además de neurosensoriales. Alrededor del 80% de hipoacusias no sindrómicas son ocasionadas por genes autosómicos recesivos, se ha estimado que el 50% de hipoacusias no sindrómicas con este tipo de herencia, son ocasionadas por mutaciones en el gen GJB2 (Pavón, 2012). Igualmente en la Tabla 3 se muestran algunos de los genes con este patrón de herencia, ya que se tienen 101 locus registrados en OMIM.

**Tabla 3**

*Principales genes causantes de hipoacusia con herencia autosómica recesiva*

Locus (OMIM)	Gen	Proteína que codifica
DFNB1A	GJB2	Conexina 26 (P29033)
DFNB1B	GJB6	Conexina 30 (O95452)
DFNB2	MYO7A	Miosina-VIIa (Q13402)
DFNB3	MYO15A	Miosina-XV (Q9UKN7)
DFNB4	SLC26A4	Pendrina (O43511)
DFNB6	TMIE	Proteína transmembrana del oído interno (Q8NEW7)
DFNB7/11	TMC1	Proteína transmembrana 1 tipo canal (Q8TDI8)
DFNB8/10	TMPRSS3	Serina proteasa transmembrana 3 (P57727)
DFNB9	OTOF	Otoferlina (Q9HC10)
DFNB12	CDH23	Caderina-23 (Q9H251)

*Nota.* El número entre paréntesis corresponde al número de identificación en UniProt.

#### 3.2.1 GJB2: 35delG

El gen GJB2 (por sus siglas en inglés, *gap junction protein beta-2*) se encuentra en el cromosoma 13 y está compuesto por 2 exones, de los cuales sólo 1 contiene el marco de lectura que codifica 226 aminoácidos para la conexina 26 (Friedman & Griffith, 2003).

Se han encontrado alrededor de 92 mutaciones con patrón de herencia autosómica recesiva en este gen, 9 de tipo dominante y 10 aún desconocidas, todas provocan hipoacusia no sindrómica. La mutación de mayor importancia y con mayor presencia en el mundo, es la delección 35 de guanina (35delG) (Azadegan-Dehkordi, *et al.*, 2018). De acuerdo con un análisis realizado por Bouzaher y colaboradores (2020) en 43 artículos de estudios realizados en población latina, en México esta mutación tiene mayor frecuencia (6.7%) en comparación con otras variantes patogénicas del gen que se han estudiado.

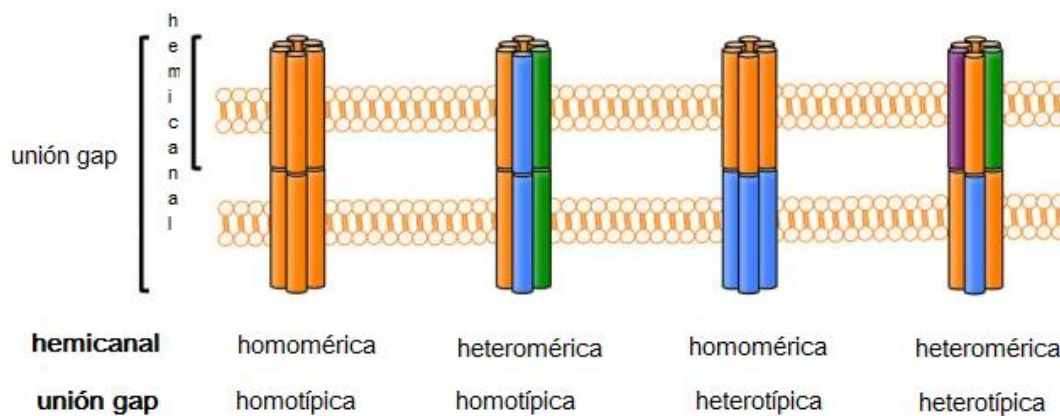
Es importante mencionar que esta variante igualmente se puede encontrar como heterocigoto compuesto, es decir, que el individuo presenta dos mutaciones diferentes (variantes) en un mismo gen. Por otra parte, el gen GJB2 también puede presentar herencia digénica (dos genes contribuyen al fenotipo) y suele ser con el gen GJB6 (Arenas-Sordo, *et al.*, 2020; Pavón, 2012).

Esta delección de guanina en la posición 35 tiene como consecuencia un desplazamiento en el marco de lectura y la traducción se ve interrumpida en el aminoácido 13 (valina), resultando en una proteína incompleta y con baja estabilidad. A nivel funcional, esto repercute en la organización de las conexinas para formar un conexón o hemicanal (consta de seis conexinas), y poder llevar a cabo la unión tipo gap con el conexón de otra célula. Los conexones pueden estar formados por un mismo tipo de conexina (homomérico) o por diferentes conexinas (heteromérico), ya que en la cóclea se han encontrado 5 isoformas, aunque las que predominan son la 26 y la 30, y están distribuidas en las células ciliadas y de soporte del órgano de Corti; a su vez, los conexones que se unen pueden ser de la misma conformación (homotípicos) o diferentes entre sí (heterotípicos), como se aprecia en la Figura 6 (Alberts, *et al.*, 2008; Nickel & Forge, 2008; Zytsar, *et al.*, 2018).

De esta manera, por la falta de conexones, se produce una acumulación de iones  $K^+$ , así como otras moléculas que pasan a través de ellos, como el glutamato, inositol trifosfato (IP3), ADP, ATP, entre otros; por lo que la célula no se despolariza y los impulsos eléctricos no son transmitidos, además de producir apoptosis tanto en células de soporte como en las ciliadas, generando así la pérdida de audición (Alberts, *et al.*, 2008; Nickel & Forge, 2008).

### Figura 6

*Conformación de los conexones y de las uniones tipo gap*



*Nota.* Adaptada de "Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases" de H. Takeuchi & A. Suzumura, 2014, *Front Cell Neurosci.*, 8(189). Copyright 2014 de Takeuchi y Suzumura.

### 3.3 Ligado al cromosoma X

Este tipo de hipoacusias tienen una variabilidad mayor que las anteriores, pueden ser prelinguales o poslinguales y sólo del 1% al 5% de hipoacusias no sindrómicas tienen este patrón de herencia (Pavón, 2012). En la base de datos OMIM se tienen registrados 7 genes causantes de hipoacusia con un patrón de herencia de este tipo, en la Tabla 4 se enlistan.

**Tabla 4***Locus y genes causantes de hipoacusia con herencia ligada al cromosoma X*

Locus (OMIM)	Gen	Proteína que codifica
DFNX1	PRPS1	Ribosa-fosfato pirofosfocinasa 1 (P60891)
DFNX2	POU3F4b	Dominio POU clase 3, factor de transcripción 4
DFNX3	-	-
DFNX4	SMPX <sup>a</sup>	Proteína del músculo esquelético (Q9UHP9)
DFNX5	AIFM1 <sup>b</sup>	Factor inductor de apoptosis 1 (O95831)
DFNX6	COL4A6 <sup>b</sup>	Cadena de colágeno alfa-6 (IV) (Q14031)
DFNX7	GPRASP2 <sup>b</sup>	GASP-2 (Q96D09)

*Nota.* El número entre paréntesis corresponde al número de identificación en UniProt.

<sup>a</sup> es de carácter dominante. <sup>b</sup> de carácter recesivo.

### 3.4 Mitocondrial

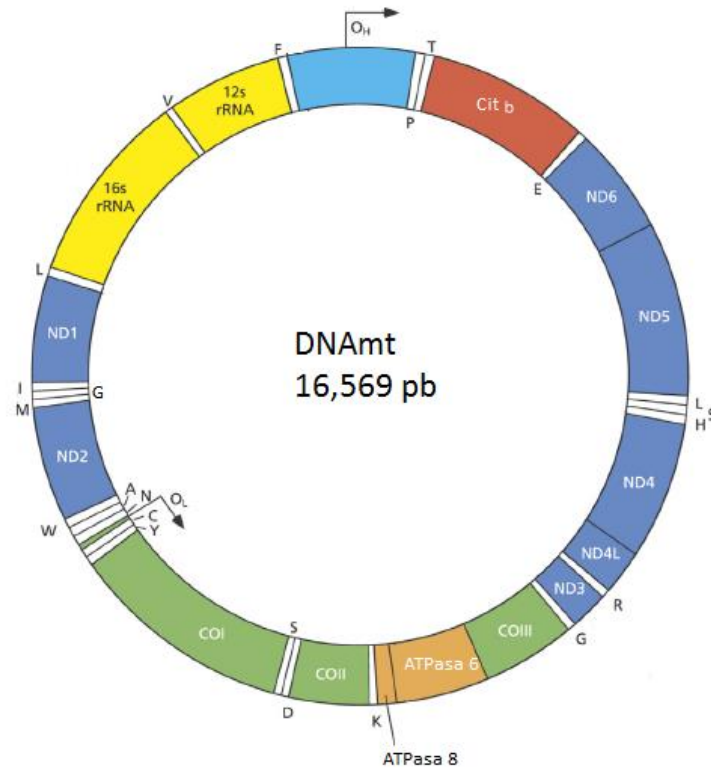
#### 3.4.1 Genoma mitocondrial

La mitocondria, aquel organelo que llegó como bacteria a un ancestro de las células eucariotas hace miles de millones de años para hacer simbiosis, ahora desempeña una gran cantidad de funciones además de proveer energía a las células mediante la síntesis de ATP (por fosforilación oxidativa), también participa en otras reacciones de gran importancia, tales como la apoptosis, la beta-oxidación de ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos, entre otros (Feillet, *et al.*, 2014; Lane & Martin, 2010).

Posee su propio DNA, es circular, de herencia materna y consta de 16,569 pb (representando sólo el 0.25% del total de DNA en una célula) que conforman 37 genes que codifican para 37 polipéptidos, 22 RNA de transferencia (RNAt), 2 RNA ribosomales (RNAr), todos fundamentales en la fosforilación oxidativa; también se encuentran 1122pb que forman una región "control" en la que se encuentra el origen de replicación para una de las cadenas del DNA, aunque no codifica para ningún producto, así que se le denomina como región no codificante. Los 13 polipéptidos forman parte de las subunidades de la cadena transportadora de electrones: siete subunidades (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) del complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa); una subunidad (citocromo b) del complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa); la subunidad 6 y 8 de la ATP sintasa (complejo V); y tres subunidades (COI, COII, COIII) del complejo IV (citocromo c oxidasa). En la cadena pesada del DNA se codifican 28 productos y en la cadena ligera se encuentran los genes de 8 RNAt y ND6 (Figura 7) (Butler, 2012; Saneto, 2020).

## Figura 7

### Genoma mitocondrial humano



*Nota.* La región no codificante está en color azul claro; las regiones en blanco corresponden al RNAt, cada uno tiene señalado el aminoácido que transportan; O<sub>H</sub> es el origen de replicación de la cadena pesada y O<sub>L</sub> es el de la cadena ligera. Adaptada de "The Human Mitochondrial Genome (355)" de R. D. S. Pitceathly & S. Rahman, 2020, Academic Press, p. 353–374 (<https://doi.org/10.1002/ana.24835>). Copyright 2020 de Elsevier Inc.

Cabe mencionar que, cuando un gen se encuentra en el mismo estado en todo el DNA (completamente íntegro o mutado), se habla de homoplasmia y, cuando el DNA presenta variantes de un gen, se trata de heteroplasmia. Este último estado es variable de un órgano a otro, ya que la cantidad de mitocondrias de un tipo de célula a otro varía, aunado a esto, durante la mitosis las mitocondrias se dividen y se reparten de forma aleatoria, contribuyendo al estado de heteroplasmia. Asimismo, un mayor porcentaje de heteroplasmia conlleva a un mayor riesgo de que el individuo desarrolle una patología por la expresión de los genes mutados, si es que la mutación origina alguna enfermedad (Feillet, *et al.*, 2014; Saneto, 2020).

### **3.4.2 MTRNR1 (A1555G)**

En MTRNR1 se presentan el 71% de mutaciones que producen hipoacusia no sindrómica, mientras que el 29% ocurre en MTTT1. El gen que se ve afectado por estas mutaciones es el de la subunidad 12S del RNAr, está asociado a predisposición a ototoxicidad por aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina, kanamicina, amikacina, etc.) o a hipoacusia de comienzo tardío (el individuo no se expone a aminoglucósidos). Cuando se trata de hipoacusia asociada a la ototoxicidad, suele ser severa a profunda, bilateral y se presenta a los pocos días o semanas después de que el individuo ingirió aminoglucósidos (Pavón, 2012).

La principal mutación que provoca esto es A1555G (sustitución de una adenina por una guanina en la posición 1555). Al igual que otras mutaciones mitocondriales, esta mutación presenta penetrancia incompleta (no todos los individuos que tengan el gen mutado, van a desarrollar la patología), pues se han encontrado individuos con la mutación pero sin hipoacusia, por lo que se cree que A1555G requiere de otros factores para poder producir hipoacusia, como el estado de heteroplasmia, la presencia de otras mutaciones o los aminoglucósidos (Zhu, *et al.*, 2006).

El mecanismo que se ha propuesto para explicar el desarrollo de hipoacusia por A1555G consiste en que, al sustituirse la adenina por guanina, se forma un nuevo par GC y esto hace que la estructura de la subunidad 12S del RNAr sea similar a la subunidad 16S del RNAr bacteriano, el cual es blanco de los aminoglucósidos. De forma normal, estos antibióticos se unen al RNAr para producir errores de traducción proteica y así llegar a la muerte de la bacteria; sin embargo, cuando la mutación está presente, el antibiótico se une a la subunidad 12S del RNAr y produce los mismos efectos como si se tratara de una célula bacteriana, de modo que se provoca la muerte de las células ciliadas del órgano de Corti, en la cóclea (Hamasaki & Rando, 1997, citado en Pereira, *et al.*, 2008).

### **3.4.3 G7444A**

La posición 7444 del genoma mitocondrial está en los límites del gen MTCO1 y MTTT1 (específicamente en el gen que codifica para el RNAt que transporta serina). La mutación que se ha asociado con hipoacusia no sindrómica es un cambio de guanina por adenina, Pandya y colaboradores (1999), Yuan y colaboradores (2005) y Zhu y colaboradores (2006) encontraron que esta mutación está presente en algunos individuos con hipoacusia en conjunto con la mutación A1555G. Asimismo, Brown y colaboradores (1995) reportaron que la mutación G7444A está asociada con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), pero se considera que es secundaria y sólo aumenta la penetrancia de las mutaciones principales, así que por sí misma no causa la enfermedad.

El mecanismo de esta mutación se cree que es el mismo que el de la mutación A7445G, que también ocasiona hipoacusia no sindrómica. Yuan y colaboradores (2005), explican que esta sustitución ocasiona que, en la traducción, el codón que en condiciones normales era AGA (codón de paro en el gen CO1) cambie a AAA, de modo que la traducción continúa hasta el siguiente codón de paro y se agregan tres aminoácidos más al polipéptido correspondiente (lisina, glutamina y lisina), pudiendo ser parcialmente funcional. Aunado a esto, como la mutación se encuentra a un lado del gen del RNAt ya mencionado, específicamente en el extremo 3', puede afectar su procesamiento en la transcripción, así como el de otros genes cercanos, teniendo como consecuencias niveles bajos de los productos correspondientes y por ende, fallas en el funcionamiento de la mitocondria.

#### **Capítulo 4: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica *in vitro* de biología molecular, desarrollada por Kary Mullis en 1985 para la amplificación de secuencias de DNA, es decir, obtener múltiples copias de una secuencia. Se basa en el proceso de replicación del DNA dentro de las células, pero empleando únicamente los componentes implicados en el proceso: el DNA a amplificar, los *primers* u oligonucleótidos, una DNA polimerasa (se suele usar el análogo de *Thermophilus aquaticus*), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), magnesio (como cofactor) y un amortiguador (Bluth & Bluth, 2018; Masoodi, *et al.*, 2021).

El proceso, o ciclo, consiste en 3 pasos, el primero es la desnaturalización, la cual consiste en someter el DNA a una temperatura de 94-95°C para que se rompan los enlaces de hidrógeno y se separe la doble hélice; el siguiente paso es el alineamiento, la temperatura disminuye a la temperatura de alineamiento que varía dependiendo de los oligonucleótidos, para permitir que cumplan con su función, que es la de unirse a la secuencia que servirá de molde en cada cadena de DNA; esto da paso a la extensión, donde la DNA polimerasa y los dNTP llevan a cabo la polimerización, lo que quiere decir que los dNTP comienzan a formar una cadena complementaria de DNA a partir de la secuencia molde como extensión del extremo 3' de cada oligonucleótido, esto ocurre a 72°C. Este ciclo se repite varias veces con el fin de obtener millones de copias de DNA, pues en cada ciclo se obtiene el doble de copias que se tenía en el ciclo anterior (Bluth & Bluth, 2018). A lo largo de los años, se ha desarrollado una diversidad de variantes de la PCR con distintas aplicaciones, las más utilizadas se presentan a continuación en la Tabla 5.



**Tabla 5***Variantes de PCR más conocidas y principales características*

Variante	Descripción
PCR en tiempo real (también se abrevia como RT-PCR en inglés)	Permite observar en tiempo real la expresión de un gen, con ayuda de un fluorocromo. No se necesita de un procesamiento posterior.
RT-PCR (PCR con transcriptasa inversa)	Se emplea la enzima transcriptasa inversa para poder obtener DNA complementario (cDNA) a partir de una secuencia de RNA como molde.
PCR anidada (nested PCR, en inglés)	Luego de realizar una amplificación regular, el producto se vuelve a someter a amplificación con un par de primers denominados internos.
PCR Multiplex	Se utiliza un conjunto de diferentes pares de primers para amplificar distintas secuencias de DNA.
AS-PCR (PCR alelo específica)	Permite detectar polimorfismos mediante un extremo 3' específico en uno de los primers.
PCR-RFLP	Después de realizar la PCR, se emplean enzimas de restricción con las que se pueden identificar polimorfismos, posteriormente se realiza una electroforesis.

*Nota.* Bluth & Bluth (2018); Dorado, *et al.* (2019). Elaboración propia

#### 4.1 PCR-RFLP

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, o restriction fragment length polymorphism (RFLP), es una de las múltiples técnicas que ofrece la biología molecular, permite diferenciar variaciones (polimorfismos) en una secuencia de DNA gracias a la especificidad de las enzimas de restricción. Los polimorfismos son resultado de mutaciones (inserciones, deleciones, translocaciones, sustituciones, etc.), de modo que implica un par de bases del DNA y entonces se les denomina polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, en inglés) (Matsuda, 2017; Mittal, *et al.*, 2013).

Una enzima de restricción es una enzima de origen bacteriano con actividad endonucleasa, es decir, que corta el enlace fosfodiéster entre nucleótidos dentro de la cadena de DNA; este corte ocurre en una posición específica de la secuencia. El DNA que se somete a *digestión* con la enzima puede ser genómico, producto de una PCR, un plásmido, entre otros; se incuba por un periodo de tiempo, después se separan los fragmentos obtenidos por medio de electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida y pueden visualizarse con ayuda de algún colorante de DNA en un transiluminador con luz UV o pueden ser transferidos para efectuar un Southern blot, clonación, u otro procedimiento (González & Bueno, 2013; Mittal, *et al.*, 2013).

Cuando se analiza un SNP con esta técnica, primero se amplifica la secuencia de DNA que contiene el SNP. Lo que ocurre si está presente la alteración en uno de los sitios que reconoce una enzima, se pierde el sitio de reconocimiento y entonces no se producen fragmentos; caso contrario, por un SNP se puede generar un nuevo sitio de reconocimiento, por lo que la enzima va a fragmentar la secuencia de DNA. Todo eso será visible después de realizar la electroforesis correspondiente (Bluth & Bluth, 2018; Mittal, *et al.*, 2013).

Esta técnica se ha aplicado en diversos estudios con SNP, algunos también relacionados con la hipoacusia. Por ejemplo, Braga y colaboradores (2014) emplearon una enzima de restricción para identificar la mutación G174C (en el gen de la interleucina 6) y su frecuencia alélica en un grupo de personas de la tercera edad, además de su posible relación con hipoacusia por exposición a ruido; igualmente Postal y colaboradores (2009) hicieron uso de la enzima Hph I para evidenciar la presencia de la mutación C1494T (en el gen MTRNR1), que también está asociada a la hipoacusia inducida por aminoglucósidos y provoca la pérdida del sitio de reconocimiento de la enzima. Se ha empleado en el estudio de otros SNP que también ocurren en el genoma mitocondrial, como Ryan y colaboradores (2015) que desarrollaron la metodología para la detección de 3 mutaciones que ocasionan la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) con sólo una enzima de restricción.

#### **4.2 AS-PCR**

Las metodologías de amplificación de secuencias específicas con PCR han recibido distintos nombres: PCR alelo específica (AS-PCR), amplificación de alelos específicos por PCR (PASA, en inglés), amplificación del sistema de mutación refractaria (ARMS, en inglés), entre otros. Consisten en el diseño de primers con un extremo 3' que es complementario al SNP, de manera que se amplificará la secuencia si el SNP está presente; algunos diseñan los primers para unirse al alelo normal en lugar del SNP (Matsuda, 2017).

A su vez, se han desarrollado variantes de estas metodologías con el fin de obtener una especificidad mayor del producto amplificado (amplicón), debido a que la DNA polimerasa *Taq* no tiene actividad de exonucleasa del extremo 3' al 5', lo que evita que pueda corregir un desemparejamiento (o mismatch) en el extremo 3' del primer. Newton y colaboradores (1989) propusieron cambiar otra base cercana al extremo 3' para desemparejar y así mejorar la especificidad, aunque esto está condicionado por la posición y la base en que se haga el cambio. Otra variante, PASA bidireccional, emplea un primer interno y otro externo para amplificar un alelo en una dirección y otro primer interno y otro externo se encargan del otro alelo en una dirección diferente, además de que los primers externos amplifican un producto que puede servir como un control positivo; sin embargo, no siempre amplifican todos los productos y se debe tener cuidado en el diseño de los primers para evitar interacción entre sí (Athanasidou, *et al.*, 2010; Gaudet, *et al.*, 2009; Matsuda, 2017).

Algunas de estas metodologías se han aplicado para la determinación de haplotipos, o en combinación con otros métodos como la hibridación con microarreglos, tal como Li y colaboradores (2008) hicieron para evaluar 11 mutaciones asociadas a hipoacusia en los genes GJB2, GJB3, SLC26A4 y MTRNR1, de forma rápida, efectiva y económica. Asimismo, Han y colaboradores (2013) desarrollaron un kit que permite amplificar tanto alelos normales como alelos mutados para detectar cuatro mutaciones que provocan hipoacusia, además de generar un producto que funge como control, empleando un total de 16 primers alelo específicos, es decir, 2 pares de primers (internos y externos) para cada mutación.

Debido a su diversidad de aplicaciones y a la eficiencia reportada en trabajos anteriores, ambas técnicas (PCR-RFLP y AS-PCR) fueron seleccionadas para su utilización en la investigación del presente trabajo.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En México, la Secretaría de Salud (2019) ha estimado que 3 de cada 1000 recién nacidos desarrollan hipoacusia, sin embargo esta pérdida de audición tiene diversos agentes causales que pueden ser congénitos o no, de modo que podría no ser detectada con el Tamiz Auditivo Neonatal.

Este tipo de patología genera una problemática con un impacto a nivel social, se trata de marginación hacia este sector de la población en todos los ámbitos (educativo, laboral, prestación de servicios, etc.), incluso en el familiar, al no tener un desarrollo pleno del lenguaje y de sus habilidades sociales, generando prejuicios e ideas erróneas contra ellos. De acuerdo a la Encuesta Nacional sobre Discriminación (ENADIS) de 2017, dentro de la población con discapacidad, el 5.3% es de tipo auditiva.

El impacto a nivel económico implica mayor presupuesto destinado al sector salud para la atención médica y aparatos auditivos o implantes, según el caso. Asimismo, comparando los gastos que debe realizar la población para acceder al tratamiento con el ingreso que perciben, se ven afectados económicamente y la situación de desigualdad aumenta.

La mayoría de los estudios que se han realizado en México se han abordado desde la perspectiva médica, por lo que el diagnóstico se obtiene por pruebas audiométricas o únicamente se realiza la secuenciación del gen GJB2 al tener mayor incidencia reportada en la población mundial. Aunado a esto, la población estudiada suele ser una porción pequeña y del sector infantil, de manera que no se puede establecer un análisis epidemiológico de toda la población mexicana. Por estas razones consideramos estudiar la hipoacusia no sindrómica en la población mexicana desde la perspectiva genética para identificar las mutaciones más frecuentes que la originan, específicamente por medio del diagnóstico molecular.

Para esta investigación se eligieron tres mutaciones: una delección de guanina en la posición 35 del gen nuclear GJB2, dada su frecuencia reportada, y dos mutaciones en genes mitocondriales (A1555G y G7444A) por la relación que podrían guardar entre sí y que se ha reportado en estudios previos, además de resaltar la importancia del genoma mitocondrial en este tipo de patologías.

La identificación de estas mutaciones se realizará por medio de PCR-RFLP y AS-PCR, de las cuales primero se debe diseñar la metodología a efectuar. Para esto, se cuenta con una amplia gama de herramientas y programas bioinformáticos que facilitan el diseño de primers y la obtención de enzimas de restricción; además se pueden obtener visualizaciones previas de los probables resultados en la experimentación, evitando así la mayor cantidad posible de errores al momento de efectuar el experimento real. El uso de estas técnicas para el diagnóstico de hipoacusia no sindrómica representa una ventaja frente a otras técnicas, sobre todo en cuanto a costo y rapidez, sumado a la eficiencia con que se obtienen resultados.

Una vez que se detectan las mutaciones, se le proporciona el seguimiento correspondiente al paciente y se le provee asesoramiento genético, ya sea a ellos o a sus familiares, especialmente a pacientes que deseen tener hijos, pues facilitaría su tratamiento y un desarrollo óptimo de comunicación. Por ejemplo, la mutación A1555G puede detonar la hipoacusia por ingesta de aminoglucósidos, de manera que las mujeres embarazadas portadoras de esta mutación eviten este tipo de antibiótico, o que los individuos con dicha mutación los consuman.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

Diseñar técnicas de biología molecular para evaluar las mutaciones mitocondriales A1555G del gen MT-RNR1 y G7444A del gen CO1, así como de la delección 35 de guanina en el gen nuclear GJB2 en el diagnóstico de hipoacusia no sindrómica.

#### **3.2 Particulares**

- a. Extraer DNA mediante el método *salting out* con acetato de amonio previamente estandarizado para su posterior análisis en PCR.
- b. Diseñar una metodología de PCR-RFLP de los genes MT-RNR1 y CO1 en DNA mitocondrial, con el fin de detectar las mutaciones A1555G y G7444A.
- c. Diseñar una AS-PCR del gen GJB2 en DNA nuclear para identificar la delección 35 de guanina.

## **4. METODOLOGÍA Y RESULTADOS**

### **4.1 Población de estudio**

Se seleccionó un grupo de familias que sumaron un total de 65 individuos con un rango de edad de 6 a 79 años, a cada uno (o a su tutor, en el caso de menores de edad) se le proporcionó un consentimiento informado y un cuestionario de datos personales y problemas de audición (ver Anexo 8.1), el cuestionario se obtuvo de una guía elaborada por el Ministerio de Salud de Chile (2013).

### **4.2 Toma de muestra**

A cada participante se le proporcionó 15mL de una solución de sacarosa al 3% contenida en un tubo cónico de 50mL para que realizara un enjuague durante 1 minuto y lo volviera a depositar en el tubo.

### **4.3 Extracción y evaluación de DNA**

El procesamiento de las muestras para obtener el DNA se realizó en el laboratorio L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1. La metodología que se empleó para extraer el DNA se basó en lo propuesto por Aidar & Line (2007), Domínguez y colaboradores (2019) y Küchler y colaboradores (2012).

Como primer paso, se centrifugaron las muestras a 2500rpm por 10 minutos y se decantó el líquido, luego se agregaron 3mL de TNE y se centrifugó a 2000rpm por 5 minutos.

Después de decantar el líquido, se agregaron 1.3mL de solución de lisis, que está compuesta por Tris 10mM, SDS 0.5% y EDTA 5mM. Se agitó con el vórtex por 5 segundos y se procedió a incubar las muestras por 21 horas a 37°C.

Una vez que transcurrió el tiempo, el contenido se pasó a tubos cónicos de 1.5mL y se agregaron 500µL de acetato de amonio 8M y EDTA 1mM, nuevamente se sometieron a agitación con vórtex por 5 segundos y centrifugación a 12,000rpm por 10 minutos.

A 1.5mL del sobrenadante resultante se le agregaron 500µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000rpm por 5 minutos, para después decantar y dejar secar el contenido.

Continuando con el lavado de las muestras, se agregaron 500µL de etanol y luego se centrifugó a 12,000rpm por 5 minutos; de igual manera se decantó el líquido y se dejó secar el botón. Finalmente, para resuspender, se colocaron de 20µL a 50µL de agua destilada, dependiendo del tamaño del botón obtenido en cada muestra.

Para su cuantificación, se empleó el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, con 2µL de cada muestra, revisando la concentración y pureza del DNA (relación 260/280), como se muestra en la Tabla 6, se calculó la media del total de estos valores.

**Tabla 6**

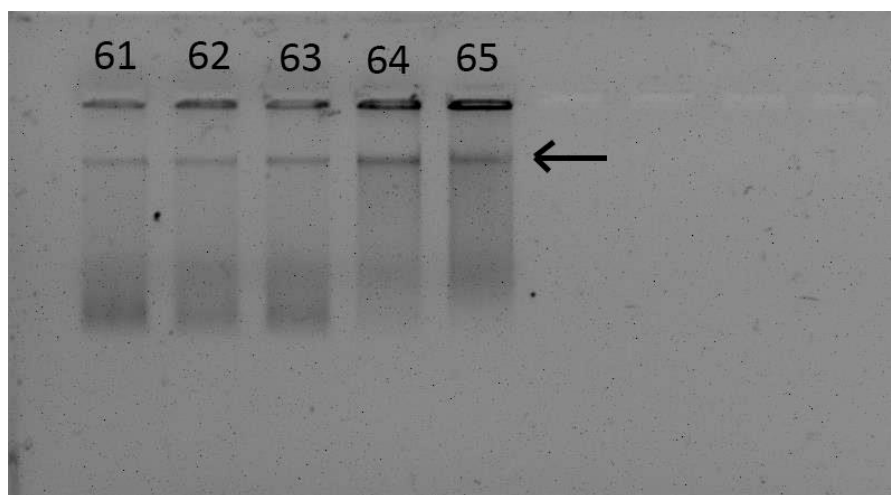
*Promedio de concentración y relación 260/280 de las muestras con el NanoDrop ND-1000*

No. de muestras	Prom. concentración (ng/ $\mu$ L)	Prom. relación 260/280
65	292.7	1.88

Seguido de esto, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0.8% con amortiguador TAE 1X y se aplicó un flujo eléctrico de 100V por 30 minutos, con el fin de revisar la integridad del material genético con ayuda de un transiluminador con luz UV, en la Figura 8 se muestra de forma representativa el DNA genómico obtenido de las muestras.

**Figura 8**

*DNA genómico aislado de las muestras en un gel de agarosa 0.8%*



*Nota.* El número corresponde al número de muestra empleada; la flecha señala las bandas correspondientes al DNA genómico.

#### **4.4 PCR-RFLP de A1555G**

##### **4.4.1 PCR**

Para efectuar la PCR y obtener la región de DNA mitocondrial que contiene la posición 1555, se empleó la pareja 2 de primers para amplificar todo el genoma mitocondrial de Rieder y colaboradores (1998), que proporcionó el Laboratorio 18 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 y el kit de Promega GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix. El primer forward consiste en 5'-CGATCAACCTCACCTCT-3', y el primer reverse en 5'-TGGACAACCAGCTATCACCA-3', que amplifican un fragmento de 801pb, de acuerdo al análisis realizado en Primer-BLAST.

En la Tabla 7 se enlistan los reactivos y volúmenes usados para llevar a cabo la PCR de acuerdo con las indicaciones del inserto del kit para obtener la región del genoma mitocondrial con la posición 1555.

**Tabla 7**

*Preparación para un volumen de 25µL para la PCR*

Reactivo	Volumen
GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix 2X	12.5µL
Primer forward 10µM	0.25µL
Primer reverse 10µM	0.25µL
DNA (muestra)	0.5µL
Agua libre de nucleasas	c.b.p

Además de las muestras, se preparó un tubo que fungió como blanco, sustituyendo la cantidad de muestra por agua libre de nucleasas. Se agitaron los tubos en vórtex por 5 segundos y luego se centrifugaron por 2 segundos, para ser colocados después en el termociclador, siguiendo el programa propuesto por Rivera (2018) que en la Tabla 8 se muestra.

**Tabla 8**

*Programa de PCR para el polimorfismo A1555G*

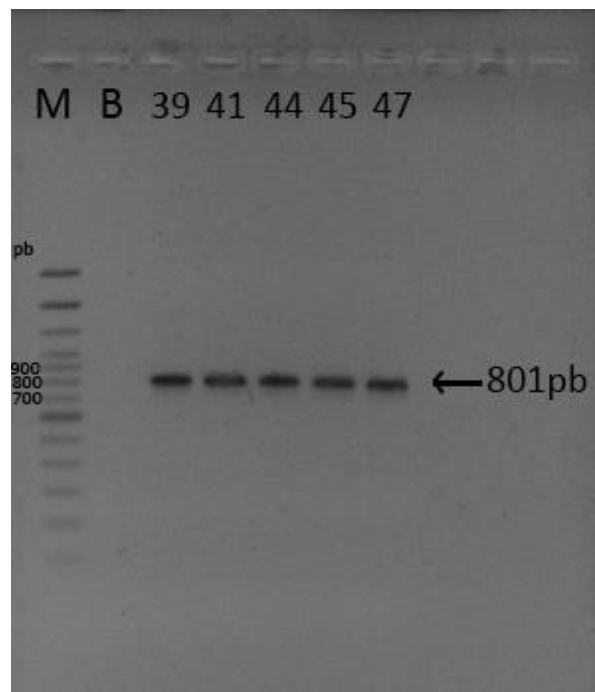
Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	1	95	120
Desnaturalización	35	95	30
Alineamiento		60	30
Elongación		72	90
Extensión final	1	72	300

#### 4.4.2 Electroforesis

Una vez realizada la PCR, se procedió a preparar un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (BrEt). La mezcla que se colocó en cada pozo del gel se conformó por: 2µL de muestra o blanco, o 1.5µL de marcador de peso molecular; 3µL de BrEt y 3µL de Blue/Orange. El flujo eléctrico aplicado fue de 90V por 45 minutos y posteriormente se observó el gel a través de un transiluminador con luz UV. El resultado obtenido se aprecia en la Figura 9 de manera representativa con algunas de las muestras.

## Figura 9

*Electroforesis del amplicón en gel de agarosa 1.5% con cinco muestras*



*Nota.* La M corresponde al marcador de peso molecular; la columna B corresponde al blanco; los números corresponden al número de muestra.

### 4.4.3 RFLP y electroforesis

Derivado de la pandemia de 2020, la experimentación no se pudo concluir, por lo que de este apartado en adelante sólo se trabajó con ayuda de herramientas bioinformáticas para realizar el diseño y análisis *in silico* de las técnicas moleculares propuestas.

De este modo, se procedió a obtener el amplicón con Primer-BLAST e introducirlo en NEBcutter (New England BioLabs) para verificar el sitio de reconocimiento de la enzima BcoDI en una secuencia normal, lo cual se muestra en la Figura 10.



**Figura 10**

*Amplicón sin la mutación A1555G*

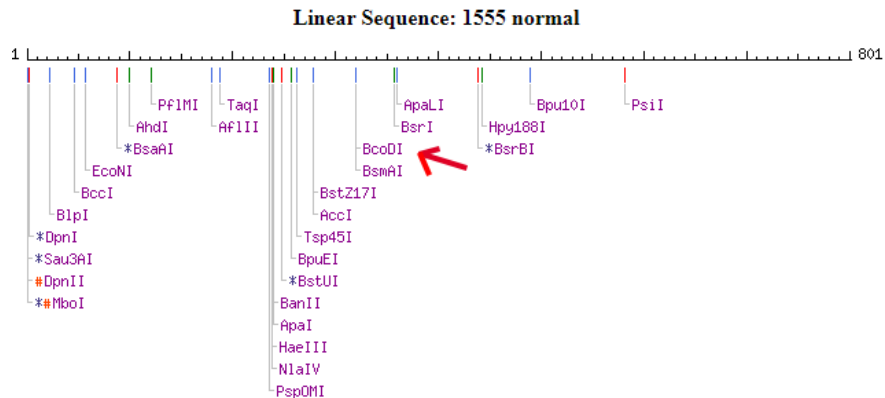
Local sequence file:  Ningún archivo seleccionado  
GenBank number:  [\[Browse GenBank\]](#)  
or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)

```
CAATTTCTACCCCAAPAAACTACGATAUCCLTTATGAACTTAAUGGTCGAAUGTGUATTTAUCAG  
TAAA  
CTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCA  
AGTA  
TACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATAGAGGAGCAAAGTCGTAACATGGT  
AAGT  
GTACTGGAAAGTGCACCTTGGACGAACCAGAGTGTAGCTTAACACAAAGCACCCAACCTTACACTTAG  
GAGA  
TTTCAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAAGCTAAGCCCAAGCCACTCCACCTTACTACCAAG
```

The sequence is:  Linear  Circular      Enzymes to use:  NEB enzymes  
 All commercially available specificities  
 All specificities  
 All + defined oligonucleotide sequences  
 Only defined oligonucleotide sequences  
[\[define oligos\]](#)

Minimum ORF length to display:  a.a.

Name of sequence:  (optional)



*Nota.* La adenina subrayada en azul es la de la posición 1555 del amplicón obtenido sin el SNP pero con el sitio para la enzima BcoDI (flecha roja).

Igualmente se introdujo la secuencia con el cambio de nucleótido (A1555G) para corroborar que el sitio de la enzima de restricción se pierde (ver Figura 11), de acuerdo con lo reportado por Pandya y colaboradores (1999) para el isoesquizómero de la enzima (Alw26I).

**Figura 11**

*Amplicón con la mutación A1555G*

Local sequence file:  Ningún archivo seleccionado  
GenBank number:  [\[Browse GenBank\]](#)  
or paste in your DNA sequence: *(plain or FASTA format)*

```
CA TTTTCTACCCCGAARACTACGTTAGCCCTTATGAACTTTRAGGUTCGAAGTGGATTACAG  
TAAA  
CTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCTCACCTCCTCA  
AGTA  
TACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATAGA GGAGCAA GTCGTAACATGGT  
AAGT  
GTACTGGAAAGTGCACTTGGACGAACAGAGGTAGCTTAACACAAAAGCACCCAACTTACACTTAG  
GAGA  
TTTCGAAGTTAAGTTGACCGCTCTGAGCTAAAGCTAGCCCGAAGCCACTGCACCTTACTAGCAGAC
```

The sequence is:  Linear  Circular  
Enzymes to use:  NEB enzymes  
 All commercially available specificities  
 All specificities  
 All + defined oligonucleotide sequences  
 Only defined oligonucleotide sequences  
[\[define oligos\]](#)

Minimum ORF length to display:  a.a.

Name of sequence:  *(optional)*



**Linear Sequence: A1555G**

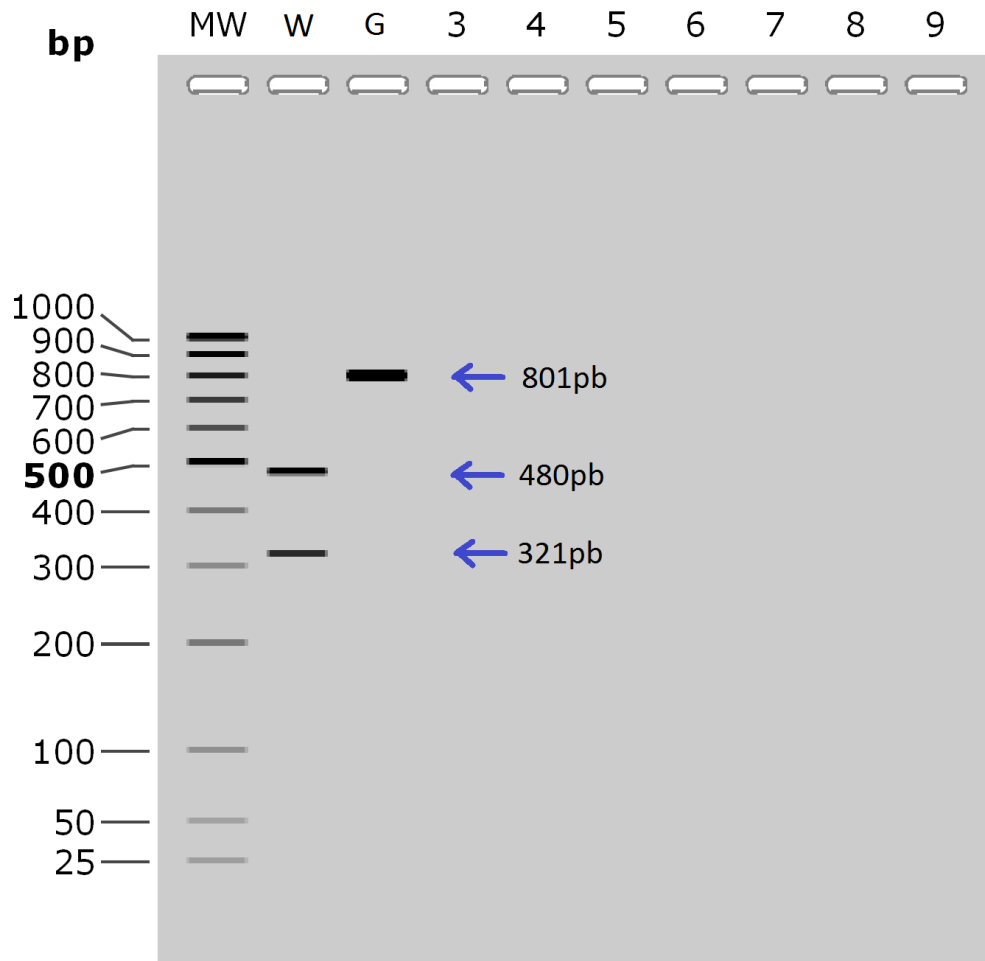


*Nota.* La guanina subrayada en azul es la correspondiente a la posición 1555 del amplicón modificado con el SNP y sin el sitio para la enzima BcoDI.

Se obtuvo el gel *in silico* con los fragmentos generados correspondientes con el programa SnapGene (de Insightful Science) ajustando el porcentaje de agarosa a 2%, usando TAE como buffer y agregando el marcador de peso molecular 100 bp PCR DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific, el gel obtenido se observa en la Figura 12.

## Figura 12

*Gel in silico de los fragmentos esperados con el SNP A155G y sin el SNP*



*Nota.* La columna MW corresponde al marcador de peso molecular; la W correspondería a una muestra sin la mutación y con el sitio para la enzima, produciendo dos fragmentos (uno de 480pb y otro de 321pb); mientras que la G correspondería a una muestra con el cambio de adenina por guanina y sin el sitio de la enzima de restricción, observándose solamente el amplicón de 801pb.

## 4.5 PCR-RFLP de G7444A

### 4.5.1 PCR

Para el diseño de los primers se empleó la herramienta PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies (IDT), donde se introdujo la secuencia del genoma mitocondrial humano (NC\_012920.1 en GenBank) y se ajustaron los criterios de los primers: temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) mínima de 59°C y máxima de 60°C, un porcentaje de GC mínimo de 40 y máximo de 65 (el máximo ya estaba predeterminado), un tamaño mínimo de 20pb y máximo de 22pb; también se estableció un mínimo de 200pb y un máximo de 900pb para el tamaño del amplicón; además de indicar la región blanco de la posición 7400 a 7500.

Todos los resultados ofrecidos se evaluaron con OligoAnalyzer para verificar su T<sub>m</sub>, ya que el cálculo cambia de una herramienta a otra y se consideró la T<sub>m</sub> calculada por esta herramienta; también se revisó si formaban hairpins, homodímeros y heterodímeros, seleccionando el par que a continuación se presenta en la Tabla 9.

**Tabla 9**

*Par de primers para la posición 7444 del genoma mitocondrial*

Primer	Tamaño [pb]	T <sub>m</sub> [°C]
Forward: 5'-CACTCCACGGAAGCAATATG-3'	20	53.6
Reverse: 5'-GGGAAGTAGCGTCTTGTAGA-3'	20	53.6

De igual manera, con ayuda de Primer-BLAST se corroboró que los primers amplificaran el producto (de 749pb) como se indicaba en PrimerQuest Tool, de la posición 6880 a 7628 en el genoma mitocondrial.

### 4.5.2 RFLP y electroforesis

Posteriormente, la secuencia normal obtenida de Primer-BLAST se introdujo en NEBcutter para realizar una digestión con la enzima XbaI (ver Figura 13) y se modificó el nucleótido en la posición 7444 para confirmar que al introducir la secuencia con el SNP G7444A se pierde el sitio de la enzima de restricción (ver Figura 14), de acuerdo con Pandya y colaboradores (1999).

**Figura 13**

*Amplicón sin la mutación G7444A*

Local sequence file:  Ningún archivo seleccionado  
GenBank number:  [\[Browse GenBank\]](#)  
or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)

```
ATATTTATTTATTTTCATGATTTTAGAAAGCTTCGCTTCGAAAGCGAAGAGTCCCTATATAGTAGAAAGAAC  
CCTC  
CATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCCCCCACCTACCACACATTGGAAGAACCCGTATACAT  
AAAA  
TC TAGACAAA AAAAGGAAGGAATCGAACCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGGCCTCCAT  
GACT  
TTTTCAAAAAGGTATTAGAAAAACCATTTTCATAACTTTGTCAAAGTTAAATATAGGCTAAATCCT  
ATAT  
ATGCTTAATGGCAGATGAGGCGAGTAGGTCTAGAGGCTACTTCCC
```

The sequence is:  Linear  Circular

Enzymes to use:

- NEB enzymes
- All commercially available specificities
- All specificities
- All + defined oligonucleotide sequences
- Only defined oligonucleotide sequences

[\[define oligos\]](#)

Minimum ORF length to display:  a.a.

Name of sequence:  (optional)



**Linear Sequence: 7444 normal**



*Nota.* La guanina subrayada en azul es la de la posición 7444 del amplicón obtenido sin el SNP pero con el sitio para la enzima XbaI (flecha roja).

**Figura 14**

*Amplicón con la mutación G7444A*

Local sequence file:  Ningún archivo seleccionado  
GenBank number:  [\[Browse GenBank\]](#)  
or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)

```
TATTATTATTTCATGATTTGAADAGCCCTTCCTTCGAAACCGAAGAGTCCCTATTAGTAAAGAAAC  
CCTC  
CATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCCCCCACCTACCACACATTGGAAGAACCCGTATACAT  
AAAA  
TCTAAACAAAAAAGGAAGGAATCGAACCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGGCCTCCAT  
GACT  
TTTTTCAAAAAGGTATTAGAAAAACCATTCATACTTTGTCAAAGTAAATATAGGCTAAATCCT  
ATAT  
ATCTTAATGGCAGATGCAGGGCAAGTAGGTCTACAGAGGCTACTTCCG
```

The sequence is:  Linear  Circular

Enzymes to use:

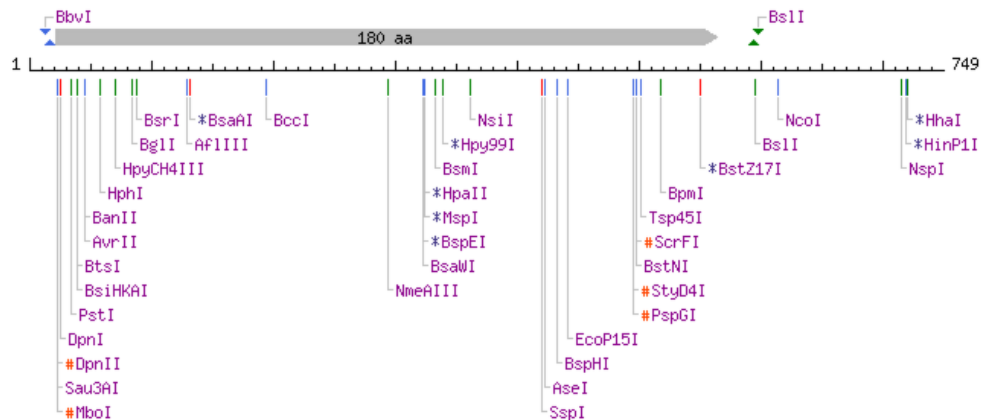
- NEB enzymes
- All commercially available specificities
- All specificities
- All + defined oligonucleotide sequences
- Only defined oligonucleotide sequences [\[define oligos\]](#)

Minimum ORF length to display:  a.a.

Name of sequence:  (optional)



**Linear Sequence: G7444A**

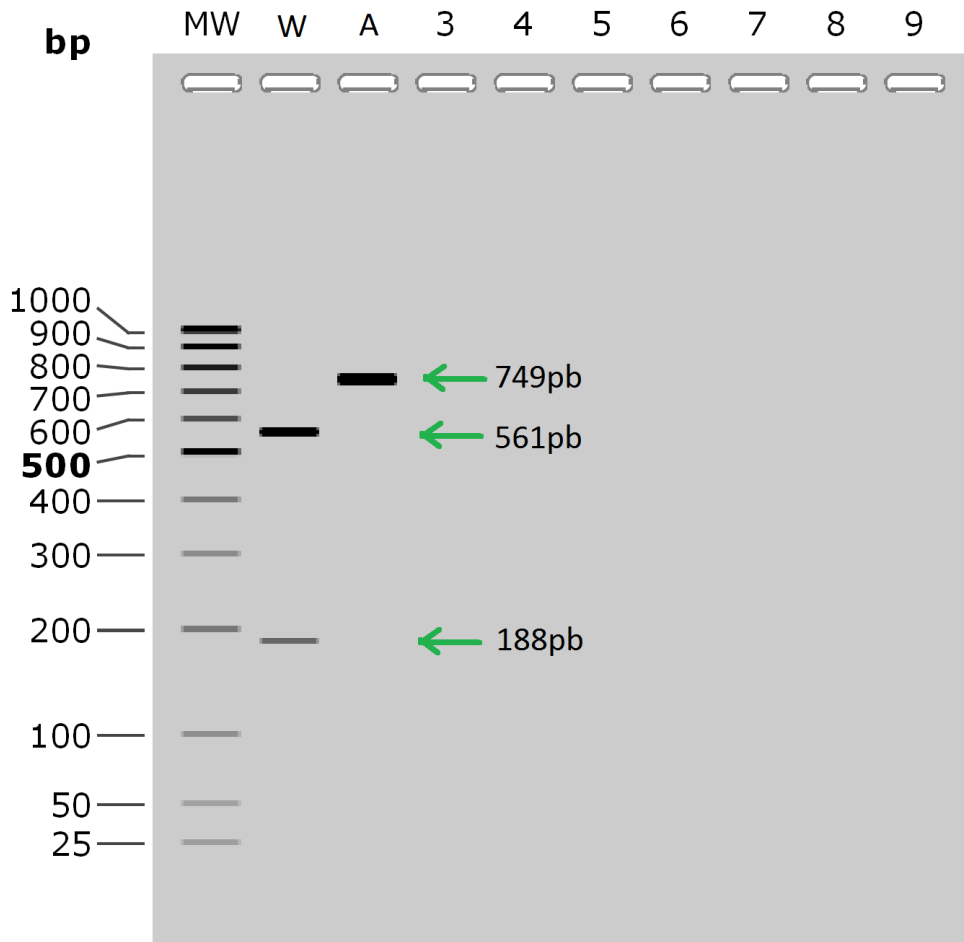


*Nota.* La adenina subrayada en azul es la correspondiente a la posición 7444 del amplicón modificado con el SNP y sin el sitio para la enzima XbaI.

También se empleó el programa SnapGene (de Insightful Science) para la visualización del gel con los fragmentos que podrían obtenerse de los individuos sin mutación y con la mutación. Se introdujeron los mismos ajustes anteriormente mencionados de porcentaje de agarosa, el mismo buffer y marcador de peso molecular y se obtuvo la imagen de la Figura 15.

### Figura 15

*Gel in silico de los fragmentos esperados con el SNP G7444A y sin el SNP*



*Nota.* La columna MW corresponde al marcador de peso molecular; la W correspondería a una muestra sin la mutación y con el sitio para la enzima, produciendo dos fragmentos (uno de 561pb y otro de 188pb); mientras que la A correspondería a una muestra con la mutación y sin el sitio de la enzima de restricción, observándose únicamente el amplicón de 749pb.

## 4.6 AS-PCR de 35delG en GJB2

### 4.6.1 AS-PCR

Primero se diseñaron un par de primers a los que se les denominó externos, que fueran capaces de amplificar una región que tuviera la posición 35 del gen GJB2. En PrimerQuest Tool se introdujo la secuencia del gen (M86849.2 de GenBank) y se ajustaron los parámetros: Tm mínima de 60°C y máxima de 62°C, porcentaje de GC mínimo de 40, tamaño mínimo de 20pb y máximo de 22pb; tamaño del amplicón entre 200pb y 1000pb; y región blanco de la posición 100 a 950. Únicamente se obtuvieron 3 resultados, que también se revisaron en OligoAnalyzer (Tm, formación de hairpins, homodímeros y heterodímeros).

El par de primers que se escogió genera un producto de 956pb, en la Tabla 10 se indica su tamaño y Tm. Además de revisar que sí amplificaran el producto como se señalaba en PrimerQuest Tool, con ayuda de Primer-BLAST (Figura 16).

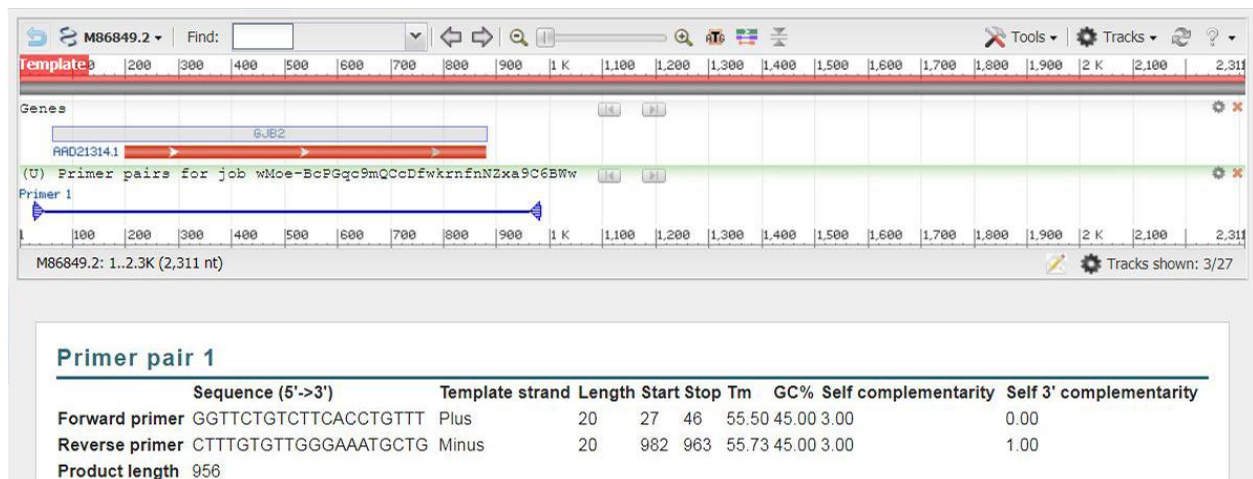
**Tabla 10**

*Primers externos para el gen GJB2*

Primer	Tamaño [pb]	Tm [°C]
Forward: 5'-GGTTCTGTCTTCACCTGTTT-3'	20	52.5
Reverse: 5'-CTTTGTGTTGGGAAATGCTG-3'	20	52.5

**Figura 16**

*Amplificación con los primers externos para el gen GJB2*



*Nota.* La línea azul indica la zona que abarcan los primers y la tabla de la parte inferior contiene los datos sobre cada primer y el tamaño del amplicón (956pb).



Luego de esto, para obtener los primers internos se siguió la metodología de Morales & Cortés (2019). Para el primer reverse interno, en la cadena sentido (+) del amplicón obtenido se seleccionaron 18nt donde se encontrara la posición 30, de modo que ésta quedara en el extremo 3' del primer. Este primer es específico para amplificar el alelo sin mutación, en conjunto con el primer forward externo generan un producto de 219pb.

En el caso del primer forward interno, en la cadena antisentido (-) del amplicón obtenido, se seleccionaron 16 nucleótidos (nt) donde se encontrara la posición 34, de modo que el extremo 3' del primer quedara en esa posición del gen, puesto que de la posición 30 a 34 todos los nucleótidos son citosinas. Este primer es específico para amplificar el alelo con mutación, por eso se consideran 5 citosinas en lugar de 6, y en conjunto con el primer reverse externo generan un producto de 765pb.

Siguiendo las recomendaciones de Little (2001) y Wangkumhang y colaboradores (2007), se introdujo un mismatch en la penúltima posición de ambos primers internos y en la Tabla 11 se señala el cambio.

**Tabla 11**

*Primers internos para la delección en la posición 35*

Primer	Tamaño [pb]	Tm [°C]
Forward: 5'-CAGACGATCCTGGG <u>A</u> G-3'	16	51.4
Reverse: 5'-TGTTTGTTCACACCC <u>C</u> TC-3'	18	52.5

*Nota.* La base subrayada es la base modificada para obtener un mismatch adicional.

En ambos primers se revisó la posible formación de hairpins, homodímeros y heterodímeros (también se hizo la revisión de los primers internos con los externos) con ayuda de OligoAnalyzer Tool (ver Figura 17-20). Además se verificó en Primer-BLAST que se obtuvieran los amplicones correspondientes introduciendo la secuencia del gen en estado normal y con la mutación.



## Figura 17

Información del primer forward interno y estructuras de hairpin que se forman

### Results

SEQUENCE	5'- CAG ACG ATC CTG GGA G -3'
COMPLEMENT	5'- CTC CCA GGA TCG TCT G -3'
LENGTH	16
GC CONTENT	62.5 %
MELT TEMP	51.4 °C
MOLECULAR WEIGHT	4931.2 g/mole

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
1		0.01	24.9
2		0.59	16.4

## Figura 18

Homodímero y heterodímero del primer forward interno









<b>A)</b> Dimer Sequence: 5'- CAGACGATCCTGGGAG -3' Maximum Delta G: -30.64 kcal/mole	<b>B)</b> Primary Sequence: 5'- CAGACGATCCTGGGAG -3' Secondary Sequence: 5'- TGTTTGTTACACCCCTC -3' Maximum Delta G: -32.97 kcal/mole
<b>Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs: 3</b> 5' CAGACGATCCTGGGAG     ::: 3' GAGGGTCCTAGCAGAC	<b>Delta G: -6.14 kcal/mole Base Pairs: 3</b> 5' CAGACGATCCTGGGAG     : 3' CTCCCCACACTTGTGGT

*Nota.* A) El homodímero con el delta G menor es de -4.64kcal/mol. B) Heterodímero que se forma con el primer reverse interno, con el valor más bajo de delta G de -6.14kcal/mol.

## Figura 19

Información del primer reverse interno y estructuras de hairpin que se forman

### Results

SEQUENCE	5'- TGT TTG TTC ACA CCC CTC -3'		
COMPLEMENT	5'- GAG GGG TGT GAA CAA ACA -3'		
LENGTH	18		
GC CONTENT	50 %		
MELT TEMP	52.5 °C		
MOLECULAR WEIGHT	5376.5 g/mole		
structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
1		0.66	15.8
2		0.71	13
3		0.79	11.9
4		0.86	9.9
5		0.91	4.5
6		1.28	4
7		1.48	-6.8
8		1.56	0.3

## Figura 20

Homodímero con el valor más bajo de delta G del primer reverse interno

**Dimer Sequence:**

5'- TGTTTGTTACACCCCTC -3'

**Maximum Delta G:** -32.97 kcal/mole

**Delta G:** -3.3 kcal/mole **Base Pairs:** 3

5' TGTTTGTTACACCCCTC

||| :::

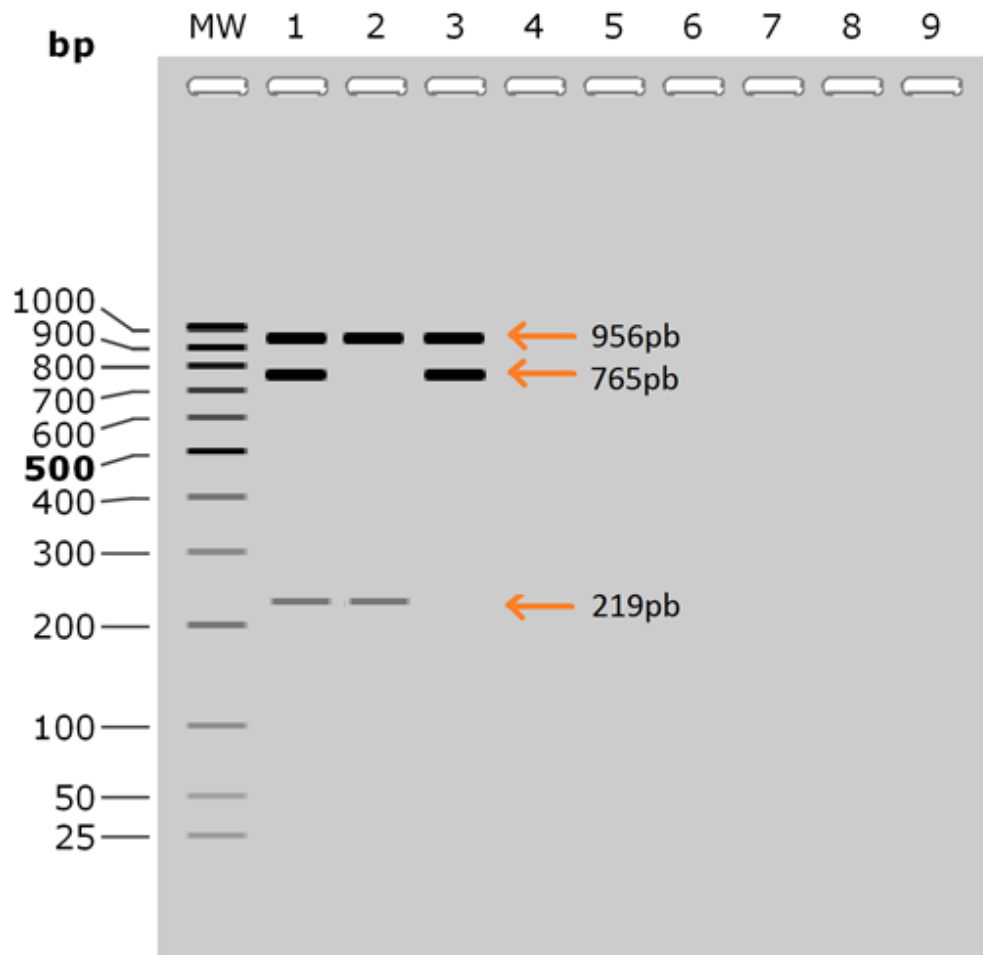
3' CTCCCACACTTGTTTGT

#### 4.6.2 Electroforesis

Se recurrió al programa SnapGene (Insightful Science) para obtener la visualización del gel con las bandas que se obtendrían en diferentes casos (individuos heterocigotos y homocigotos) después de la ejecución de la PCR, como se observa en la Figura 21. El porcentaje de agarosa también se configuró a 2%, se empleó el marcador de peso molecular 100 bp PCR DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific y TAE como buffer.

**Figura 21**

*Gel in silico de los fragmentos esperados de individuos homocigotos y heterocigotos en GJB2*



*Nota.* MW indica el marcador de peso molecular; la columna 1 correspondería a individuos heterocigotos con las bandas de los productos de 765pb y 219pb; la 2 correspondería a individuos homocigotos sin la delección, presentando el producto de 219pb; la 3 representa a los individuos homocigotos con la delección, presentando el producto de 765pb. El producto de 956pb sirve como control.

## 5. DISCUSIÓN

Para el estudio del DNA es indispensable contar con una muestra pura, íntegra y en suficiente cantidad, pero para llegar a esto se debe elegir el mejor medio para tomar la muestra, de manera que, junto con la técnica de extracción adecuada, permitan asegurar estas cualidades y por ende, se pueda utilizar la muestra de manera confiable.

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en emplear una toma de muestra y técnica de extracción de DNA alternativas que se estandarizaron antes de su aplicación. La razón por la que se usó una solución de sacarosa 3% para tomar la muestra radica en que es menos invasiva que una venopunción, la cual presentaba varias desventajas para este trabajo: elevar costos por el material requerido, tiempo y espacio necesarios para la toma de muestra de cada individuo, así como se habría requerido mayor capacitación debido al rango de edad de los pacientes; por el contrario, Kùchler y colaboradores (2012) sostienen que con la solución de sacarosa se emplea menos material y reactivos, el propio paciente puede tomar la muestra por lo simple que es, además de ser más barata que el uso de otros dispositivos como el citobrush, añadiendo que se pueden tomar varias muestras simultáneamente y a gran escala. Sin embargo, se deben tener algunos cuidados para evitar que la muestra se contamine y dificulte la extracción, por ejemplo: que el paciente no haya ingerido alimentos previamente a la toma de muestra o que no tenga maquillaje en los labios.

En cuanto a la extracción del material genético, se decidió usar el acetato de amonio, tal como plantean Aïdar & Line (2007) para *salting out*, porque es menos tóxico que fenol-cloroformo tanto para el medio ambiente como para el investigador y no compromete la integridad del DNA, misma que se revisó con espectrofotometría UV y electroforesis.

Se obtuvo la relación 260/280 de cada muestra, junto con su concentración, teniendo como resultado un promedio de 1.88 en la relación 260/280 (Tabla 6) y que está dentro del rango ideal de pureza de 1.8 a 2 (de 1.6 a 1.8 es aceptable), de acuerdo al Banco Nacional de ADN Carlos III (2020), que también menciona que valores mayores a 2 se podrían deber a contaminación con RNA, que fue el caso de algunas muestras. Ahora bien, en cuanto a la concentración, el promedio obtenido de DNA fue de 292.7ng/ $\mu$ L, aunque se alcanzaron concentraciones de hasta 1666ng/ $\mu$ L en algunos casos, posiblemente porque algunos pacientes realizaron el enjuague con mayor vigor que otros y recordaron usar la lengua para frotar las mejillas, siendo que esta concentración resultó favorable para su posterior uso en PCR; sin embargo, se obtuvieron concentraciones bajas (la menor fue de 19.8ng/ $\mu$ L) que posiblemente se debieron a pacientes que no realizaron el enjuague de forma adecuada, esto genera un problema para su uso posterior al requerir mayor cantidad de muestra para trabajar.

En lo referente a la electroforesis, se observaron bandas definidas (Figura 8), en algunos casos se observaron algunas partes difusas que podrían deberse a la técnica de colocación de la muestra en el carril, puesto que la mayoría de ellas tenían una relación 260/280 dentro del rango aceptable, de modo que no podía tratarse de contaminación en todos los casos, así que en general puede hablarse de un DNA íntegro.

Lo último que se realizó experimentalmente antes de la pandemia fue la electroforesis después de la PCR para obtener el amplicón que contiene la posición 1555 (ver Figura 9), que corrobora lo que se obtuvo con Primer-BLAST, pues se observan los fragmentos a la altura de la banda de 800pb del marcador de peso molecular.

Previo al estudio de las mutaciones *in vitro*, es indispensable realizar un análisis de los primers y enzimas de restricción propuestos para trabajar, pues es de gran importancia asegurar su especificidad y eficiencia para la obtención de los resultados esperados de forma óptima y confiable, de modo que tenga una aplicación en futuros protocolos.

El resultado obtenido al introducir la secuencia del amplicón con el cambio de adenina por guanina en NEBcutter corrobora que el cambio de nucleótido provoca la pérdida del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BcoDI (Figura 10 y 11), justo como Pandya y colaboradores (1999) reportaron al emplear el isoesquizómero Alw26I. A continuación se presenta el sitio de reconocimiento de la enzima (que es el mismo de la enzima Alw26I y BsmAI), en el genoma mitocondrial el orden de la secuencia se encuentra de forma invertida, de modo que el SNP ocurriría en la adenina subrayada, evitando así el corte de la enzima de restricción:

5'...GTCTCN↓...3'

3'...CAGAG(N)5↑...5'

Ahora bien, en la Figura 12 se representan los posibles resultados de las muestras después de incubarlas con la enzima de restricción y someterlas a una electroforesis. Siendo el caso de un paciente sin la mutación, la enzima reconocerá el sitio normal y realizará el corte de la secuencia, obteniendo los dos fragmentos señalados en la columna W (480pb y 321pb); caso contrario, un paciente con la mutación perderá el sitio para la enzima, de modo que el corte no se realizará y en la electroforesis se observará únicamente el fragmento obtenido de la PCR (columna G).

El uso de RFLP como método de detección de SNP es de gran utilidad, pues en casos como este, únicamente la mutación de interés modifica el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, confiriéndole especificidad; además de que no resulta difícil la interpretación de los resultados, ya que se obtienen fragmentos de diferentes tamaños detectables en la electroforesis. También, el uso de enzimas de restricción reduce costos, al no requerir procedimientos posteriores al tratamiento con la enzima. Una gran ventaja de que la enzima BcoDI tenga isoesquizómeros es que cualquiera de estas enzimas puede emplearse para detectar la mutación y el patrón de bandas en la electroforesis es el mismo.

Es importante mencionar que para realizar un diagnóstico completo y para estudios posteriores, se pregunte al paciente si a lo largo de su vida ha ingerido aminoglucósidos u otro medicamento ototóxico, siendo que este SNP está relacionado con este tipo de antibióticos, así como preguntar otras cuestiones (si ha padecido meningitis, otitis media, el tipo de trabajo que tiene, si ha sufrido algún trauma craneoencefálico, etc.). Además, se deberían realizar pruebas audiométricas para contrastar resultados con los del análisis genético y poder definir el tipo de hipoacusia, si es que hay pacientes que no tengan un diagnóstico previo de hipoacusia pero que presenten dificultades de audición.

Por otra parte, para la detección de la mutación G7444A, los primers seleccionados de las opciones que ofreció PrimerQuest Tool (Tabla 9) presentaron una temperatura de fusión dentro del rango de Tm similar al de la temperatura de alineamiento (50-60°C) y con una diferencia no mayor a 5°C entre sí, al igual que el porcentaje de pares GC (de 40% a 60% es lo recomendado) que fue del 50%; el primer forward presentó 8 estructuras de hairpin, las cuales tienen una Tm inferior a la Tm en que se ejecuta la alineación en la PCR, por lo que no se consideran problemáticas estas estructuras, aunado a sus respectivos valores de delta G ( $\Delta G$ ) que fueron positivos no mayores a 2kcal/mol. El primer reverse sólo presentó 3 estructuras de hairpin, todas con Tm inferior a la de alineación en la PCR, 2 de ellas presentaron valores de  $\Delta G$  positivos y el otro fue negativo cercano a 0. Se recomienda que el valor de  $\Delta G$  sea intermedio, es decir, valores que no sean muy negativos (menor o igual a -9kcal/mol) ni muy altos en términos positivos, especialmente para homodímeros y heterodímeros (Álvarez-Fernández, 2013; Dorado, *et al.*, 2019; Integrated DNA Technologies, 2021).

En cuanto a homodímeros, en el primer forward el valor más negativo fue de  $\Delta G$  fue de -4.64kcal/mol y en el primer reverse de -3.61kcal/mol, esto no resulta de preocupación para la ejecución de la PCR, pues como ya se mencionó, el valor no debe ser menor a -9kcal/mol. Para los heterodímeros entre primers se obtuvo un  $\Delta G$  con valor mínimo de -4.95kcal/mol, el cual tampoco rebasa el límite para que estas estructuras representen un problema.

Al igual que con la mutación anterior, el cambio de nucleótido produce pérdida del sitio de reconocimiento de la enzima (Figura 13 y 14), que en este caso el cambio es de guanina por adenina y la enzima empleada fue XbaI. Enseguida se muestra el sitio de reconocimiento de dicha enzima con sus respectivos sitios de corte, además de señalar el nucleótido que se ve afectado con la mutación en la posición 7444 dentro del genoma mitocondrial:

5'...T↓CTAGA...3'

3'...AGATC↑T...5'

Sin embargo, la pérdida de reconocimiento del sitio para la enzima de restricción no sólo se ve afectada por la mutación G7444A, Pandya y colaboradores (1999) reportaron que también puede ocurrir por mutaciones en la posición 7443 y 7445, de las cuales la mutación A7445G también está asociada a hipoacusia e inicialmente fue para su detección que se empleó dicha enzima de restricción. Esto conlleva a que no se tenga certeza completa de que los resultados obtenidos se deban a la mutación en la posición 7444, por consiguiente se recomendaría emplear otra técnica de biología molecular para la correcta genotipificación de esta patología durante el diagnóstico.

Por otro lado, en la Figura 15 se representa el resultado que se obtendría en la electroforesis luego de la digestión de las muestras con la enzima XbaI, donde el amplicón de un paciente sin el SNP G7444A sería fragmentado en dos partes (una banda de 561pb y otra de 188pb) y el amplicón de un paciente con el SNP permanecería intacto y se observaría únicamente una banda (de 749pb). Este resultado también se obtendría si el paciente presentara la mutación A7445G únicamente con la diferencia de un par de bases entre las bandas obtenidas, aunque esto no podría ser visible en la electroforesis.

Pasando a la detección de la deleción de guanina en la posición 35 del gen GJB2, se recurrió a la PCR alelo específica, de modo que se requirió del diseño de dos pares de primers: externos e internos. En el análisis realizado a los primers externos, se encontró que presentaron una  $T_m$  dentro del rango de  $T_m$  ideal (ambos de 52.5°C), igualmente su porcentaje de pares GC de 45% supera el mínimo requerido. Ambos primers presentaron estructuras de hairpins con  $T_m$  y valores de  $\Delta G$  que tampoco impactarían en la PCR. De igual forma, los homodímeros y heterodímeros que forman son mayores a -5kcal/mol, así que no representa un problema. Estos primers generan un producto de 956pb (Figura 16) que funge como control en la PCR, pues se debe producir en todas las muestras.

Como ya se ha mencionado, en esta metodología se emplea un par de primers que son diseñados para reconocer específicamente un SNP, en este caso se trató de los primers internos. Se diseñó un primer para que reconozca el alelo normal y el otro primer el alelo mutado, con el fin de revisar si el paciente es homocigoto u heterocigoto por la obtención de diferentes patrones de bandas en la electroforesis, que más adelante se explica.

Así pues, durante la PCR un primer reconocerá el extremo 3' del alelo normal pero no del mutado, por tanto no habrá amplificación, y viceversa, a esto se le conoce como el mismatch uno; el segundo mismatch que proponen Little (2001) y Wangkumhang y colaboradores (2007) se agregó al cambiar la penúltima base del extremo 3' en cada primer, tal como se mostró en la Tabla 11, de manera que si el primer para el alelo normal interactúa con el alelo mutado, al haber dos bases que no van a ser complementarias al primer, entonces no habría amplificación y sería lo mismo para el primer que reconoce el SNP al interactuar con el alelo normal. Esto se realiza con el fin de evitar falsos positivos con esos primers que hacen mismatch, ya que estos autores mencionan que algunas uniones entre nucleótidos son más débiles que otras, así que al añadir otro mismatch aumenta la desestabilización, por ende la DNA polimerasa no realizará la extensión.



Sobre la composición de los primers internos se observó que presentan una diferencia de dos pares de bases de longitud pero esto no genera ningún problema. En cuanto al análisis de  $T_m$  y porcentaje de GC se encuentran en los límites permitidos (Figura 17 y 18). Tanto el primer forward como el reverse presentaron hairpins con temperaturas de fusión por debajo de la  $T_m$  de alineamiento en la PCR, aunado a sus valores de  $\Delta G$  positivos y menores a 2. El valor de  $\Delta G$  de sus homodímeros no fueron menores a  $-5\text{kcal/mol}$ ; aunque el valor más bajo de dos de los posibles heterodímeros entre ambos primers es de  $-6.14\text{kcal/mol}$ , sin rebasar el límite para tener impacto en la PCR (Figura 19 y 20). Asimismo, se revisaron los heterodímeros que podrían formar con los primers externos, encontrando que los de menor valor de  $\Delta G$  eran de  $-4\text{kcal/mol}$  a  $-6\text{kcal/mol}$ , por ende no serían problemáticos para la PCR.

Dorado y colaboradores (2019) sugieren algunas medidas para reducir la formación de productos inespecíficos durante la PCR que se verían como bandas extras en la electroforesis. Entre estas medidas está el uso de aditivos, el incremento de la temperatura en el alineamiento, realizar un precalentado con el termociclador, añadir cera para separar los reactivos y que puedan entrar en contacto hasta que ésta se funda, o emplear Master Mix con enzimas inactivas o que requieran de una incubación previa a la PCR y que terminen de activarse conforme pase cada ciclo.

Ahora bien, en la Figura 21 se puede apreciar la representación con todas las alternativas de resultados en la electroforesis de las muestras, Primeramente, como ya se mencionó, la banda correspondiente al fragmento de 956pb se encontraría en todas las muestras; mientras que en la columna 1 se observan las bandas adicionales de 765pb y 219pb, esto sería de un individuo heterocigoto, puesto que la obtención de estas dos bandas significaría que ambos primers internos reconocieron y amplificaron a su respectivo alelo (normal y mutado). La columna 2 sería de un individuo sin la delección, es decir, un homocigoto sano, pues sólo ocurriría la amplificación entre el primer reverse interno y el primer forward externo, dando como resultado el fragmento de 219pb. En la columna 3 se observa el fragmento de 765pb, producto del primer forward interno y reverse externo, debido a que serían los únicos en reconocer la secuencia con la ausencia de una guanina, por lo que se trataría de un individuo homocigoto con mutación y con alta probabilidad de presentar hipoacusia en el transcurso de su vida.

Por lo mencionado anteriormente, la búsqueda de la mutación G7444A se realizaría sólo en aquellos pacientes que presenten otra mutación, ya que por sí sola se cree que no produce hipoacusia, por ejemplo en conjunto con la mutación A1555G, tal como Pandya y colaboradores (1999) y Yuan y colaboradores (2005) reportaron pacientes que presentaban ambas mutaciones, algunos de ellos habían ingerido aminoglucósidos alguna vez en su vida y tenían diferentes grados de hipoacusia. Igualmente, Kokotas y colaboradores (2011) describieron el hallazgo de individuos pertenecientes a una misma familia que presentaron la mutación G7444A y la delección 35 de guanina en el gen GJB2, aunque con diferentes fenotipos: uno de ellos con hipoacusia leve/moderada, otro con audición normal y otro con problemas de habla pero sin hipoacusia, sin embargo todos eran heterocigotos para la delección en el gen GJB2 y sin presencia de mutaciones en otros sitios del gen (heterocigoto compuesto) o del gen GJB6 (herencia digénica).

En contraste, López-Bigas y colaboradores (2000) encontraron cuatro pacientes con la mutación A1555G y 35delG en heterocigosis con un fenotipo de hipoacusia moderada, que no ingirieron aminoglucósidos, además corroboraron que A1555G presenta penetrancia incompleta al haber detectado la mutación en la mitad de los individuos diagnosticados con hipoacusia.

Con esto, se puede ver que hay individuos que presentan un fenotipo de hipoacusia con un grado variable, pues intervienen otras cuestiones que influyen, tales como la presencia de otras mutaciones o factores ambientales que propician el desarrollo de hipoacusia, aunado al hecho de que 35delG sea de carácter autosómico recesivo; de igual manera ocurre con A1555G, pues Kokotas y colaboradores (2009) reportaron el caso de individuos con hipoacusia y la mutación A1555G, pero algunos de ellos fueron expuestos a aminoglucósidos y otros no.

Así pues, se debe tener en consideración la complejidad de esta patología al tener distintas causas y factores que pueden contribuir a la expresión de diferentes fenotipos y a diferente edad entre los individuos, incluso dentro de una misma familia. Además, está la variabilidad en la expresión de estas mutaciones de un país a otro, por lo que se remarca la importancia de realizar estudios en nuestro país para identificar las mutaciones de mayor frecuencia y así entender los fenotipos que se presentan en la población. Finalmente, el estudio de estas tres mutaciones en la población mexicana mediante estos métodos es una propuesta para formular una estrategia efectiva de diagnóstico en la hipoacusia no sindrómica, de manera que se le brinde al paciente la atención de manera oportuna con su respectivo asesoramiento, sin recurrir a otras metodologías que resultarían más costosas y requieren más tiempo para la obtención de resultados.

## 6. CONCLUSIONES

En la estandarización de una toma de muestra de epitelio de la mucosa oral con sacarosa y una técnica de extracción de DNA con acetato de amonio (*salting out*) se obtuvo una concentración media de DNA de 292.7ng/ $\mu$ L y un promedio de 1.88 en la relación 260/280, valores que resultan óptimos para su uso en técnicas moleculares. La toma de muestra es aplicable en poblaciones numerosas y con un rango de edad amplio, constituyendo una metodología de bajo costo y efectiva.

La especificidad de la enzima BcoDI en la PCR-RFLP para la identificación de la mutación A1555G en el gen MT-RNR1 propuesta en trabajos anteriores se corroboró, además de confirmar que sus isoformas realizan el mismo corte. En cuanto a la mutación G7444A en el gen CO1, los primers diseñados demostraron ser específicos bioinformáticamente para amplificar la región deseada.

Se diseñaron dos pares de primers específicos siguiendo los lineamientos de una AS-PCR que permitirán detectar la delección 35 de guanina en el gen GJB2, así como conocer el estado de ambos alelos (heterocigosis/homocigosis) de los pacientes.

Las técnicas propuestas en el presente trabajo pretenden apoyar el estudio de la hipoacusia no sindrómica de manera eficiente y económica, con el fin de establecer un algoritmo de diagnóstico para poder abordar en un futuro la perspectiva epidemiológica de esta patología en México.

## 7. REFERENCIAS

### Artículos científicos

Aidar, M., & Line, S. R. P. (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian Dental Journal*, 18(2): 148-152. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402007000200012>

Arenas-Sordo, M. L., Linares-Mendoza, E. P., Peñuelas-Romero, K. J., Castro-Peña, S., & Agís-Ocaña, J. G. (2020). Hipoacusia no sindrómica de origen genético. Conceptos actuales. *An Orl Mex*, 65(1):43-58. <https://www.medigraphic.com/pdfs/anaotomex/aom-2020/aom201g.pdf>

Azadegan-Dehkordi, F., Ahmadi, R, Mahbobeh, K., & Hashemzadeh-Chaleshtori, M. (2018). Update of spectrum c.35delG and c.-23+1G>A mutations on the GJB2 gene in individuals with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Ann Hum Genet*, 83: 1-10. <https://doi.org/10.1111/ahg.12284>

Berlanga, O. M., Sotelo, E., Trejo, V., Segura, M., González, S. E., Rivera, P., & Salinas, J. (2013). Tamiz auditivo neonatal (Fase I). ¿Son útiles las emisiones otoacústicas en una etapa para detectar hipoacusia en recién nacidos sanos? *Evid Med Invest Salud*, 6(2): 41-46. <https://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2013/eo132b.pdf>

Bluth, M. J., & Bluth, M. H. (2018). Molecular Pathology Techniques: Advances in 2018. *Clinics in Laboratory Medicine*, 38(2): 215-236. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.03.004>

Bouzaher, M. H., Worden, C. P., & Jeyakumar, A. (2020). Systematic Review of Pathogenic GJB2 Variants in the Latino Population. *Otol Neurotol*, 41(2): 182-191. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002505>

Braga, M. P., Maciel, S. M., de Moraes Marchiori, L. L., & Poli-Frederico, R. C. (2014). Association between interleukin-6 polymorphism in the -174 G/C region and hearing loss in the elderly with a history of occupational noise exposure. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 80(5): 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.07.001>

Brown, M. D., Torroni, A., Reckord, C. L., & Wallace, D. C. (1995) Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mi-tochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. *Hum Mutat*, 6: 311-325. <https://doi.org/10.1002/humu.1380060405>

Delgado, J. J. (2011). Detección precoz de la hipoacusia infantil. *Pediatría Atención Primaria*, 13(50): 279-297. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322011000200012&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322011000200012&lng=es&tlng=es)

Feillet, F., Schmitt, E., Gherardi, R., & Bonnemains, C. (2014). Enfermedades mitocondriales. *EMC-Pediatría*, 49(2), 1-12. [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(14\)67271-1](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(14)67271-1)

- Friedman, T. B., & Griffith, A. J. (2003). Human Nonsyndromic Sensorineural Deafness. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4: 341-402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110347>
- Hamasaki, K., & Rando, R. R. (1997). Specific Binding of Aminoglycosides to a Human rRNA Construct Based on a DNA Polymorphism Which Causes Aminoglycoside-Induced Deafness. *Biochemistry*, 36(40): 12323–12328. <https://doi.org/10.1021/bi970962r>
- Han, B., Zong, L., Li, Q., Zhang, Z., Wang, D., Lan, L., Zhang, J., Zhao, Y., & Wang, Q. (2013). Newborn genetic screening for high risk deafness-associated mutations with a new Tetra-primer ARMS PCR kit. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 77(9): 1440-1445. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2013.05.040>
- Kokotas, H., Grigoriadou, M., Korres, G. S., Ferekidou, E., Papadopoulou, E., Neou, P., Giannoulia-Karantana, A., Kandiloros, D., Korres, S., & Petersen, M. B. (2009). The A1555G mitochondrial DNA mutation in Greek patients with non-syndromic, sensorineural hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun.*, 390(3): 755-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.044>
- Kokotas, H., Grigoriadou, M., Yang, L., Lodahl, M., Rendtorff, N. D., Gyftodimou, Y., Korres, G. S., Ferekidou, E., Kandiloros, D., Korres, S., Tranebjærg, L., Guan, M. X., & Petersen, M. B. (2011). Homoplasmy of the G7444A mtDNA and heterozygosity of the GJB2 c.35delG mutations in a family with hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 75(1): 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2010.10.016>
- Korver, A. M., Smith, R. J., Van Camp, G., Schleiss, M. R., Bitner-Glindzicz, M. A., Lustig, L. R., Usami, S. I., & Boudewyns, A. N. (2017). Congenital hearing loss. *Nature reviews. Disease primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.94>
- Küchler, E. C., Tannure, P. N., Falagan-Lotsch, P., Lopes, T. S., Granjeiro, J. M., & Amorim, L. M. F. (2012). Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *J Appl Oral Sci*, 20(4): 467-471. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000400013>
- Lane, N., & Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, 467: 929-934. <https://doi.org/10.1038/nature09486>
- Li, C.-X., Pan, Q., Guo, Y.-G., Li, Y., Gao, H.-F., Zhang, D., Hu, H., Xing, W.-L., Mitchelson, K., Xia, K., Dai, P., & Cheng, J. (2008). Construction of a multiplex allele-specific PCR-based universal array (ASPUA) and its application to hearing loss screening. *Human Mutation*, 29(2): 306–314. <https://doi.org/10.1002/humu.20622>
- Little, S. (2001). Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. *Current Protocols in Human Genetics*, 9.8.1-9.8.12. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0908s07>

- López-Bigas, N., Rabionet, R., Martínez, E., Bravo, O., Girons, J., Borragan, A., Pellicer, M., Arbonés, M. L., & Estivill, X. (2000). Mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) and in the GJB2 (connexin 26) gene are not modifiers of the age at onset or severity of hearing loss in Spanish patients with the 12S rRNA A1555G mutation. *American Journal of Human Genetics*, 66(4): 1465–1467. <https://doi.org/10.1086/302870>
- Matsuda, K. (2017). PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation. *Advances in Clinical Chemistry*, 80: 45–72. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>
- Michels, T. C., Duffy, M. T., & Rogers, D. J. (2019). Hearing Loss in Adults: Differential Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 100(2): 98-108. <https://www.aafp.org/afp/2019/0715/p98.html>
- Mishra, S., Pandey, H., Srivastava, P., Mandal, K., & Phadke, S. R. (2018). Connexin 26 (GJB2) Mutations Associated with Non-Syndromic Hearing Loss (NSHL). *Indian J Pediatr*, 85: 1061–1066. <https://doi.org/10.1007/s12098-018-2654-8>
- Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C., & Markham, A. F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, 17(7): 2503-2516. <https://doi.org/10.1093/nar/17.7.2503>
- Nickel, R., & Forge, A. (2008). Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 16(5): 452–457. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32830e20b0>
- Nieman, C. L., & Oh, E. S. (2020). Hearing Loss. *Ann Intern Med.*, 173(11): ITC81-ITC96. <https://doi.org/10.7326/AITC202012010>
- Olarieta, J., García-Alcántara, F., Pérez, N., & Rivera, T. (2015). Hipoacusia. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(91): 5445-5454. <https://doi.org/10.1016/j.med.2015.11.014>
- Pandya, A., Xia, X.-J., Erdenetungalag, R., Amendola, M., Landa, B., Radnaabazar, J., Dangaasuren, B., Van Tuyle, G., & Nance, W. E. (1999). Heterogenous Point Mutations in the Mitochondrial tRNA Ser(UCN) Precursor Coexisting with the A1555G Mutation in Deaf Students from Mongolia. *Am. J. Hum. Genet.*, 65(6): 1803-1806. <https://doi.org/10.1086/302658>
- Pavón, S. M. (2012). Hipoacusia hereditaria no sindrómica. Revisión. *Revista FASO*, 19: 69-84. <http://faso.org.ar/revistas/2012/1/14.pdf>
- Pereira, L., Lemos, B. C., Menezes, M. A. O., Belintani, V., & Maniglia, J. V. (2008). Screening of the mitochondrial A1555G mutation in patients with sensorineural hearing loss. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 74(5): 731-736. [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)31384-7](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)31384-7)

- Postal, M., Palodeto, B., Sartorato, E. L., & de Oliveira, C. A. (2009). C1494T mitochondrial dna mutation, hearing loss, and aminoglycosides antibiotics. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 75(6): 884-887. [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)30554-1](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)30554-1)
- Rieder, M. J., Taylor, S. L., Tobe, V. O., & Nickerson, D. A. (1998). Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research*, 26(4): 967-973. <https://doi.org/10.1093/nar/26.4.967>
- Ryan, S. E., Ryan, F., Barton, D., O'Dwyer, V., & Neylan, D. (2015). Development and validation of a novel PCR-RFLP based method for the detection of 3 primary mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy patients. *Eye and vision (London, England)*, 2(18). <https://doi.org/10.1186/s40662-015-0028-0>
- Saneto, R. P. (2020). Mitochondrial diseases: expanding the diagnosis in the era of genetic testing. *J Transl Genet Genom*, 4: 384-428. <http://dx.doi.org/10.20517/jtgg.2020.40>
- Takeuchi, H., & Suzumura, A. (2014). Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(189). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00189>
- Wangkumhang, P., Chaichoompu, K., Ngamphiw, C., Ruangrit, U., Chanprasert, J., Assawakin, A. & Tongsim, S. (2007). WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics*, 8(275). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-275>
- Yuan, H., Qian, Y., Xu, Y., Cao, J., Bai, L., Shen, W., & Guan, M.-X. (2005). Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNASer(UCN) genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 138A(2): 133–140. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30952>
- Zhu, Y., Qian, Y., Tang, X., Wang, J., Yang, L., Liao, Z., Li, R., Ji, J., Li, Z., Chen, J., Choo, D. I., Lu, J., & Guan, M.-X. (2006). Aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss is associated with the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNASer(UCN) genes in two Chinese families. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(3): 843-850. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.027>
- Zytsar, M. V., Barashkov, N. A., Bady-Khoo, M. S., Shubina-Olejnik, O. A., Danilenko, N. G., Bondar, A. A., Morozov, I. V., Solovyev, A. V., Danilchenko, V. Y., Maximov, V. N., & Posukh, O. L. (2018). Updated carrier rates for c.35delG (GJB2) associated with hearing loss in Russia and common c.35delG haplotypes in Siberia. *BMC Medical Genetics*, 19(138). <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0650-5>

## Bases de datos y programas

Integrated DNA Technologies. (2021). How do I use the OligoAnalyzer tool to analyze possible hairpins and dimers formed by my oligo? <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>

NEBcutter V2.0. (2021). New England BioLabs. <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

OMIM. (2020). Phenotypic Series - PS124900. Johns Hopkins University. <https://www.omim.org/phenotypicSeries/PS124900>

OMIM. (2020). Phenotypic Series - PS304500. Johns Hopkins University. <https://www.omim.org/phenotypicSeries/PS304500>

SnapGene. (2021). Insightful Science. <https://www.snapgene.com/>

UniProt. (2021). UniProtKB. UniProt Consortium. <https://www.uniprot.org/uniprot/>

## Libros

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Biología molecular de la célula*. (5 ed.). Omega.

Lalwani, K. A. (2018). *Diagnóstico y tratamiento en otorrinolaringología. Cirugía de cabeza y cuello*. (3 ed.). McGraw-Hill.

Marieb, E. N. (2008). *Anatomía y Fisiología Humana*. (9 ed). Pearson Educación.

Tortora G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología*. (13 ed). Médica Panamericana.

## Capítulos de libros

Álvarez-Fernández, R. (2013). Chapter One - Explanatory Chapter: PCR Primer Design. En J. Lorsch (ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, p. 1-21). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>

Athanassiadou, A., Stavrou, E. F., Papachatzopoulou, A., & Patrinos, G. P. (2010). Chapter 2 - Allele-Specific Mutation Detection. En G. P. Patrinos & W. J. Ansorge (eds.), *Molecular Diagnostics* (p. 15-28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374537-8.00002-X>

Butler, J. M. (2012). Mitochondrial DNA Analysis. En *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (p. 405-456). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00014-2>



Dorado, G., Besnard, G., Unver, T., & Hernández, P. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR). En R. Narayan (ed.), *Encyclopedia of Biomedical Engineering* (p. 473-492). Reference Work. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.08997-2>

Gaudet, M., Fara, A. G., Beritognolo, I., & Sabatti, M. (2009). Allele-Specific PCR in SNP Genotyping. En A. Komar (ed.), *Methods in Molecular Biology* (p. 415-424). Human Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_26)

González, J., & Bueno, M. R. (2013). Capítulo 13: Enzimas de restricción. En A. M. Salazar, A. S. Sandoval, & J. S. Armendáriz (eds.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill.

Masoodi, K. Z., Lone, S. M., & Rasool, R. S. (2021). Chapter 19-Polymerase chain reaction (PCR). En *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology* (p. 109-116). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824449-4.00019-0>

Mittal, B., Chaturvedi, P., & Tulsyan, S. (2013). Restriction Fragment Length Polymorphism. En S. Maloy (ed.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (p. 190-193). Reference Work. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01314-0>

Pitceathly, R. D. S., & Rahman, S. (2020). Mitochondrial DNA-related diseases associated with single large-scale deletions and point mutations. En *The Human Mitochondrial Genome* (p. 353–374). <https://doi.org/10.1002/ana.24835>

### Páginas web

Fonoteca Nacional. (2018). *Decibeles y efectos*. <https://www.fonotecanacional.gob.mx/index.php/108-articulos/296-decibeles-y-efectos>

Organización Mundial de la Salud. (2019). *Sordera y pérdida de la audición*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>

Organización Mundial de la Salud. (s. f.). *Grades of hearing impairment*. [https://www.who.int/pbd/deafness/hearing\\_impairment\\_grades/en/](https://www.who.int/pbd/deafness/hearing_impairment_grades/en/)

Secretaría de Salud. (2019, 10 de febrero). *046. En México, tres de cada mil nacidos presentarán discapacidad por sordera* [comunicado de prensa]. <https://www.gob.mx/salud/prensa/046-en-mexico-tres-de-cada-mil-nacidos-presentaran-discapacidad-por-sordera>

## Tesis

Morales, D. K., & Cortés, M. S. (2019). *Estandarización de la Genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) relacionados con el metabolismo del metotrexato*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

Rivera, L. R. (2018). *Asociación de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes pediátricos con Hipoacusia Neurosensorial No Síndrónica* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

## Otros

Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). *Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*. Universidad de Salamanca. <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

Domínguez, M., González, N. B., & Gutiérrez, A. (2019). *Manual de prácticas Genética Molecular*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Encuesta Nacional sobre Discriminación. (2019). *Resultados sobre personas con discapacidad*. Consejo Nacional para Prevenir la Discriminación. [http://www.conapred.org.mx/documentos\\_cedoc/ENADIS\\_PcD\\_WEB.pdf](http://www.conapred.org.mx/documentos_cedoc/ENADIS_PcD_WEB.pdf)

Encyclopædia Britannica. (2021). *Human ear*. <https://academic-eb-com.pbidi.unam.mx:2443/levels/collegiate/article/human-ear/109529>

Ministerio de Salud. (2013). *Guía Clínica Hipoacusia Bilateral en Personas de 65 años y más que requieren uso de Audífono*. Gobierno de Chile. <https://www.minsal.cl/sites/default/files/files/Hipoacusiabilateralmayores65agnos.pdf>

Sánchez, E., Pérez, J., & Gil-Carcedo, E. (s. f.). Fisiología auditiva. En *Libro Virtual de Formación en Otorrinolaringología*. Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial. <https://seorl.net/PDF/Otologia/003%20-%20FISIOLOG%C3%8DA%20%20AUDITIVA.pdf>

## 8. ANEXOS

### 8.1 Consentimiento informado y cuestionario

Estado de México, a 24 de noviembre de 2019

Asunto: Consentimiento informado para la donación de epitelio bucal como parte de un estudio genético.

#### **PARTICIPANTE VOLUNTARIO.**

Yo: \_\_\_\_\_ autorizo voluntariamente mi participación dentro del estudio genético, que implica la toma de muestra de células epiteliales de la mucosa bucal y la proporción de datos clínicos personales, así como el uso de la información derivada del procesamiento de estos datos. Se recibió la información pertinente de la técnica de extracción de la muestra, además de la finalidad de dicho procedimiento y su uso exclusivo con fines de investigación, de acuerdo a la Ley General de Protección de Datos Personales y las normas internacionales de los datos genéticos humanos, garantizando así la privacidad de mis datos.

Edad: \_\_\_\_\_ Sexo M F Ocupación: \_\_\_\_\_  
 Embarazo Sí No Hijos: Sí No ¿Cuántos? \_\_\_\_\_  
 ¿Padece alguna enfermedad? Sí No ¿Cuál? \_\_\_\_\_  
 ¿Realiza algún deporte? Sí No ¿Cuál? \_\_\_\_\_ Horas a la semana que lo practica \_\_\_\_\_  
 ¿Consumo algún medicamento? Sí No ¿Cuál? \_\_\_\_\_  
 No \_\_\_\_\_  
 Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC (Índice de Masa Corporal): \_\_\_\_\_  
 Presión arterial: \_\_\_\_\_

Favor de responder el siguiente cuestionario, lea las instrucciones y cada pregunta con cuidado antes de responder.

	Sí (4)	Algunas veces (2)	No (0)
¿Alguna vez se ha sentido avergonzado al conocer personas, debido a problemas para oír?			
¿Los problemas para oír le hacen sentir frustrado al hablar con miembros de su familia?			
¿Tiene dificultad para oír cuando alguien le habla en voz baja?			
¿Alguna vez ha tenido limitaciones debido a problemas para oír?			
¿Los problemas para oír le han causado dificultades al visitar amigos, parientes o vecinos?			
¿Los problemas para oír han hecho que vaya menos seguido de lo que le gustaría a actos sociales o servicios religiosos?			
¿Los problemas para oír han causado discusiones con miembros de su familia?			
¿Los problemas para oír le causan dificultad para entender los programas de televisión o radio?			
¿Cree que su problema para oír limita su vida personal o social?			
¿Un problema para oír le causa dificultad cuando va con amigos o parientes a un restaurante?			

Total de puntos:

## Estudio del material genético

**Objetivo general:** Extraer material genético a partir de muestra bucal mediante técnicas moleculares para realizar la caracterización de esta y relacionarlo con diversas patologías de origen genético.

**Procedimientos de estudio:** Se requiere la toma de una muestra de epitelio bucal mediante la técnica de enjuague con solución de sacarosa 3%

Al realizar la toma de muestra puede presentarse el siguiente inconveniente:

- Irritación de la mucosa después del procedimiento. Fuera de eso, no representa ningún riesgo para su salud o su integridad.

Las muestras obtenidas serán analizadas en el laboratorio de Citogenética por estudiantes de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicada en el Estado de México.

Si usted está de acuerdo, la parte de la muestra no utilizada en el estudio se almacenará en un biobanco. Un biobanco consiste en el almacenamiento de las muestras en condiciones adecuadas de temperaturas para realizar otros estudios en el futuro, relacionados con características genéticas que pudieran estar asociadas con diabetes, hipertensión, hipoacusia, depresión.

El biobanco en el que se conservarán sus muestras estará ubicado en la misma facultad; las muestras serán etiquetadas con un número de folio y no con su nombre, para asegurar la confidencialidad de sus datos personales y se conservarán en el biobanco indefinidamente y posteriormente serán destruidas cuando ya no se requieran.

**Beneficios:** No hay un beneficio directo para usted por proporcionar estas muestras ni por la información genética que se genere, pero estos datos ayudarán al estudio del material genético y su relación con diversas patologías.

**Participación Voluntaria/ Retiro del estudio:** Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de decidir qué muestras son las que está de acuerdo en proporcionar o de negarse a participar o de retirar su participación en el estudio en el momento en que desee. Podrá solicitar también que se retiren sus muestras del estudio sin que ello implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al investigador/a responsable del estudio Maestra en Ciencias Maritere Domínguez Rojas al correo electrónico [maritere.dominguez@cuautitlan.unam.mx](mailto:maritere.dominguez@cuautitlan.unam.mx)

Por favor marque cada uno de los recuadros de abajo para indicar su decisión

Mis muestras/información genética puede ser utilizada solo para este estudio

Mis muestras/información genética puede ser utilizada para este estudio y para investigación futura

Mis muestras pueden ser almacenadas en un banco de muestras/ biobanco, por el tiempo mencionado en este documento

Si usted entiende la información que se le ha dado en este formato, está de acuerdo en participar en este estudio de manera total o parcial y también está de acuerdo en permitir que su información de salud sea usada como se describió antes, entonces le pedimos que indique su consentimiento para participar en este estudio.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante o tutor

\_\_\_\_\_  
Firma testigo 1

\_\_\_\_\_  
Firma testigo 2