

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**MUTACIONES EN EL GEN DE CONEXINA 26 CAUSANTES DE SORDERA NEUROSENSORIAL NO
SINDRÓMICA, HOSPITAL MÉXICO, COSTA RICA**

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar el grado de Magíster Scientiae en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular

MARIELA EUGENIA ARIAS HIDALGO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2013

DEDICATORIA

Esta tesis es la culminación de un sueño más. Quiero dedicársela a mis dos mamás y a mis dos papás, quienes siempre me han apoyado y a mi esposo, quien ha sido un pilar fundamental para mantenerme en pie y trabajando siempre pensando en positivo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi comité asesor en especial a mi tutor Don Ramiro, quien sin su invaluable guía no hubiera podido concluir esta maestría.

A Doña Sandra Silva con quien realicé el trabajo de laboratorio y quien hizo milagros para que esta tesis pudiera terminarse.

Al Dr. Alejandro Leal quien me apoyó con ideas para tratar de solventar los problemas que se presentaron durante el proceso.

Al Dr. Julián Chaverri, quien brindó todo el apoyo en la parte clínica y quien consintió en abrirme las puertas de su servicio para realizar el proyecto.

Al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital México, quienes participaron activamente en el reclutamiento de pacientes.

Y a todos y cada uno de los pacientes que accedieron a participar en este estudio y a sus familias por haber creído en el proyecto.

Finalmente agradezco al Fondo de Incentivos del CONICIT y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica quienes financiaron parte de este estudio.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular"



M.Sc. Henriette Raventós Vorst

Representante de la Decana

Sistema de Estudios de Posgrado



Dr. Ramiro Barrantes Mesén

Director de Tesis



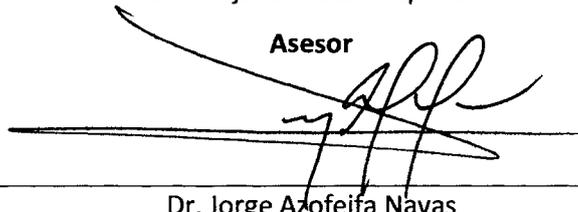
M.Sc. Sandra Silva de la Fuente

Asesora



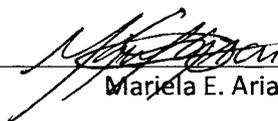
Dr. Alejandro Leal Esquivel

Asesor



Dr. Jorge Azofeifa Navas

Director Programa de Posgrado en Biología



Mariela E. Arias Hidalgo

Sustentante

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDOS	v
RESUMEN	vii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
La sordera.....	1
Sorderas neurosensoriales no sindrómicas de origen genético	2
Mutaciones en el gen de Conexina 26 y la homeostasis iónica coclear.....	3
Antecedentes y Justificación	8
Hipótesis	10
Objetivo General	10
Objetivos específicos.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Muestras	11
Análisis de laboratorio	15
Análisis de resultados.....	17
Análisis estadístico de variables concomitantes.....	17
Análisis genético.....	18
Consentimiento informado	19
RESULTADOS	20

Análisis de las variables concomitantes	20
Análisis molecular	20
Análisis Poblacional.....	24
DISCUSIÓN	26
BIBLIOGRAFIA.....	32
ANEXOS.....	37
Anexo 1: Cuestionario aplicado por los médicos de la Unidad de Otorrinolaringología del Hospital México y utilizado en el presente estudio.....	38
Anexo 2: Consentimiento informado firmado por los sujetos de la muestra de población de referencia de la MSc. Sandra Silva de la Fuente.....	43
Anexo 3: Ejemplos de regiones del gen GJB2 donde que puede ocurrir autodimerización o formación asas pequeñas.....	45
Anexo 4: Primers diseñados por el Dr. Pedro León (no publicado)	49
Anexo 5: Primers utilizados (en rosado se marcan los sitios de mutación más frecuentes para este gen).	50
Anexo 6: Consentimiento informado aprobado por el CLOBI del CENDEISSS	51

RESUMEN

Las sorderas no sindrómicas de origen genético constituyen el defecto neurosensorial hereditario más frecuente en el mundo, convirtiéndose así en un problema de salud pública. La conexina 26 se ubica en la región 13q12 en el gen *GJB2* y pertenece a la familia de las conexinas. *GJB2* es el *locus* más común causante de sordera no sindrómica con una frecuencia de portadores estimada en 1/31 o 1/32 en Europa. Se analizó una muestra de pacientes del Hospital México que padecen sordera neurosensorial no sindrómica, bilateral, hijos de padres oyentes. Por medio de una exhaustiva revisión de su historia se separaron a aquellos que padecieran sordera de causas ambientales. Además se incluyó el estudio de una población de referencia de personas oyentes para determinar las frecuencias de las mutaciones en este gen.

Se pudo amplificar el ADN de 35 pacientes encontrando 4 mutaciones (-15 C>T, 79G>A, 186C>T y la 35delG), siendo la 35delG la única causante de sordera. Se pudo ampliar la muestra a 58 pacientes pero solo para la región donde se encuentra esta delección, encontrándose una prevalencia de 3,4%. En la muestra de población de referencia se encontraron cuatro mutaciones (-15 C>T, 79G>A, 132G>A y 186C>T) siendo la 132 G>A la única que podría causar problemas de sordera según lo reportado en la literatura, pero la misma se no se detectó en los pacientes analizados.

Los dos pacientes que presentan sordera por la mutación 35delG provienen de la comunidad de Yaz de Paraíso de Cartago. Al realizar la genealogía se determinó que ambos están emparentados. Al estimar los índices de endocruzamiento de la comunidad por isonimia, se obtienen valores altos ($F = 1260 \times 10^{-5}$). Los componentes F_r y F_n presentan ambos valores muy similares (610×10^{-5} y 660×10^{-5} respectivamente).

Con respecto a las recomendaciones derivadas de este estudio, se establece que por la naturaleza de la mutación, al tener esta una penetrancia incompleta al nacimiento, el tamizaje audiológico que se realiza en algunos hospitales del país se repita al año de edad. Aquellos niños con tamizaje por potenciales evocados negativos (con sordera) pueden someterse a una prueba genética con el método Wilcox que emplea enzimas de restricción y posterior secuenciación de aquellos que tengan un resultado positivo en esta prueba.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Distribución de la muestra de pacientes del Hospital México por provincia y cantón en números totales.	12
Cuadro 2: Reactivos utilizados y cantidades para realizar la amplificación del exón 2 del gen GJB2	16
Cuadro 3: Protocolo utilizado en el termociclador para la amplificación del exón 2 del gen GJB2.	16
Cuadro 4: Frecuencia de los alelos, heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada para cada uno de los alelos encontrados en la muestra de pacientes y en la población de referencia.	24
Cuadro 5: Frecuencias del polimorfismos V27I en diferentes países de Latinoamérica.	27
Cuadro 6: Frecuencias de la mutación 35delG en diferentes países de Latinoamérica.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de los sistemas celulares presentes en la cóclea. En verde se presentan las células de Deiter y en verde claro las células de soporte y epiteliales quienes juntas constituyen la red epitelial de uniones gap. El tejido conectivo cuyas células tienen forma estrellada correspondientes a lo fibrocitos y las células de la estría vascular (azul claro) corresponden a la red de tejido conectivo de uniones gap. Ambas redes expresan conexina 26 y conexina 30 y se ha propuesto que participan en la vía de reciclaje de potasio.	4
Figura 2: Vía del reciclaje del potasio del oído interno.....	5
Figura 3: Participación de la conexina 26 en la fisiología normal y fisiopatología del movimiento de moléculas en el oído inteno.	7
Figura 4: Distribución de la muestra de 150 pacientes. El color negro representa a aquellos que no fueron secuenciados, el rojo señala los que tienen una secuencia completa y en azul en los que se obtuvo una secuencia parcial.	21
Figura 5: Electroferogramas de 3 pacientes A: corresponde al alelo normal. B: Homocigota para la mutación c.35delG y C: Heterocigota para la mutación c.35delG.	22
Figura 6: Árbol genealógico de dos pacientes (P y *) que en un inicio pertenecían a familias no relacionadas, realizado con el programa Progeny 7.0. Nótese que ambos tienen al menos dos parientes con sordera y que hay un ancestro común que une ambas familias lo cuál era desconocido al momento del reclutamiento. Ambos tienen la mutación c.35delG en homocigota.	23
Figura 7: Electroferogramas con la mutación V27I. A: corresponde al alelo normal. B: Heterocigota para la mutación c.79G>A y C: Homocigota para la mutación c.79G>A.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

GJB2: Gap Junction Protein 2

DFN: Abreviaturas de sordera neurosensorial en inglés (Deafness Neurosensorial)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

TORCH: Enfermedades que comprenden toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus y herpes

INTRODUCCIÓN

La sordera

El ser humano es capaz de percibir frecuencias de los 20 a los 20.000 Hz e intensidades menores a los 130 dB. La audición se sitúa de forma variable entre estos parámetros y se define como audición normal cuando la persona percibe sonidos y no encuentra dificultad alguna para la comunicación verbal, ni para el desarrollo de sus actividades (Vallejo 2003).

La sordera o hipoacusia es un defecto funcional que ocurre cuando un sujeto pierde capacidad auditiva en menor o mayor grado. Para su estudio se subdivide en tres grandes grupos (Vallejo 2003):

- 1- Hipoacusia de transmisión: Problemas en el oído externo y oído medio. Es reversible.
- 2- Hipoacusia Neurosensorial: Ocurre por lesiones en el órgano de Corti, por alteración de las vías acústicas o por trastornos en la corteza cerebral auditiva. Es irreversible.
- 3- Hipoacusia Mixta: Esta posee un componente de transmisión y otro componente neurosensorial.

Luego de clasificar el tipo de sordera por localización del daño que la ocasiona, se debe clasificar cuantitativamente (Vallejo 2003):

- 1- Hipoacusia leve: Pérdida menor a 30 dB.
- 2- Hipoacusia moderada: Pérdidas entre los 30 y 50dB.
- 3- Hipoacusia grave: Pérdida entre 50 y 80 dB.
- 4- Hipoacusia profunda: Pérdidas de más de 80 dB.

Existen otras clasificaciones según cómo evoluciona; en: estables, progresiva, rápidamente progresiva, brusca o fluctuante. Según la cronología, si es precoz o tardía y una última categoría que es por la relación sordera – lenguaje que pueden ser postlocutivas o prelocutivas (prelinguales). Estas últimas dificultan o impiden el aprendizaje del habla (Vallejo 2003).

Las sorderas neurosensoriales son las formas más frecuentes de sordera. En Estados Unidos, por ejemplo, uno de cada mil niños nace con sordera bilateral profunda, es tres veces más frecuente que el síndrome de Down, seis veces más frecuente que espina bífida y 50 veces más frecuente que fenilcetonuria. Alrededor de 4000 niños nacen al año con sordera neurosensorial, bilateral de grave a profunda y 8000 más con sordera unilateral o bilateral leve (Smith *et al.* 2005). No existen estadísticas para Costa Rica pero se estima que nacen de uno a tres niños sordos por cada mil nacidos y por lo tanto nacerían alrededor de 200 niños sordos por año (Chaverri, P. com. pers.).

Aproximadamente la mitad de los casos de hipoacusia neurosensorial se deben a causas genéticas y la otra mitad a causas ambientales entre las que se citan: trauma acústico, infecciones por TORCH (toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus y herpes) especialmente durante el embarazo y el uso de ototóxicos, entre otros (Vallejo 2003, Smith *et al.* 2005). Es probable que estos porcentajes ya no correspondan a la realidad, actualmente, ya que las sorderas de tipo genético aumentan, por el incremento en los matrimonios entre sordos y las sorderas causadas por factores ambientales, disminuyen por el mejoramiento en los servicios de salud (Vallejo 2003).

Sorderas neurosensoriales no sindrómicas de origen genético

Las sorderas no sindrómicas de origen genético constituyen el defecto neurosensorial hereditario más frecuente en el mundo, convirtiéndose así en un problema de salud pública (Smith *et al.* 2005). Ya se han localizado alrededor de 110 regiones posiblemente relacionados con la dolencia y se han identificado 65 genes que causan la hipoacusia. Se utilizan cuatro términos según la forma de herencia de la sordera. DFNA (Sordera neurosensorial tipo A) son las formas dominantes, DFNB (Sordera neurosensorial tipo B) las formas recesivas, DFN ligada al X, son las producidas por mutaciones en este cromosoma y DFNM (sordera neurosensorial tipo

mitocondrial) a las que son causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial. Dentro de esta clasificación las sorderas por Conexina 26 son llamadas DFNB1 (Morton & Nance 2006).

El transporte del sonido inicia con la llegada de la onda sonora a la membrana timpánica, esto provoca el movimiento de la cadena de huesecillos del oído medio, los que percuten en la ventana redonda provocando el movimiento de endolinfa y membranas como la tectoria y la basilar en el oído interno. Estas vibraciones en los líquidos y membranas provocan que las células ciliadas abran canales de K^+ despolarizándose y culminando así el proceso con la transducción de la señal al nervio auditivo. A este proceso que ocurre en el oído interno se le denomina transducción mecanoeléctrica, ya que transforma al sonido (señal mecánica) en una señal eléctrica (potencial de acción neuronal). Los genes involucrados en la sordera neurosensorial pueden afectar múltiples pasos de esta vía.

Los genes que se han relacionado con problemas en la transducción mecanoeléctrica codifican para proteínas estructurales de la membrana tectoria y los estereocilios, por ejemplo la alfa-tectorina, colágeno XIa, otoancorina, estereocilina, miosina XVa y VIIa, harmonina, caderina 23, entre otras. En el caso de problemas en nervio auditivo solo se ha relacionado al gen de la otoferlina (Eisen & Ryugo 2007). Los genes involucrados con cambios en los potenciales electroquímicos son en su mayoría canales iónicos como las Conexinas 26, 30, 31 y 32 (Estivill & Gasparini 2013).

Mutaciones en el gen de Conexina 26 y la homeostasis iónica coclear

El gen *GJB2* que codifica para la conexina 26, se encuentra en la región 13q12 en y pertenece a la familia de las conexinas. *GJB2* es el *locus* más común asociado a la sordera no sindrómica (Eisen & Ryugo 2007). Las conexinas se unen entre ellas para formar otras subunidades llamadas conexones, que a su vez se unen para formar canales en la membrana celular mejor

conocidos como uniones “gap” que permiten el paso de diversas moléculas a través de ellos (Smith *et al.* 2005, Eisen & Ryugo 2007).

La conexina 26 se expresa en las células basales e intermedias de las estría vascular. Además se encuentra en los fibrocitos tipo V del ligamento espiral y fibrocitos tipo II de la prominencia espiral y células del sulcus externo (Figura 1 ; Liu y Zhao, 2008).

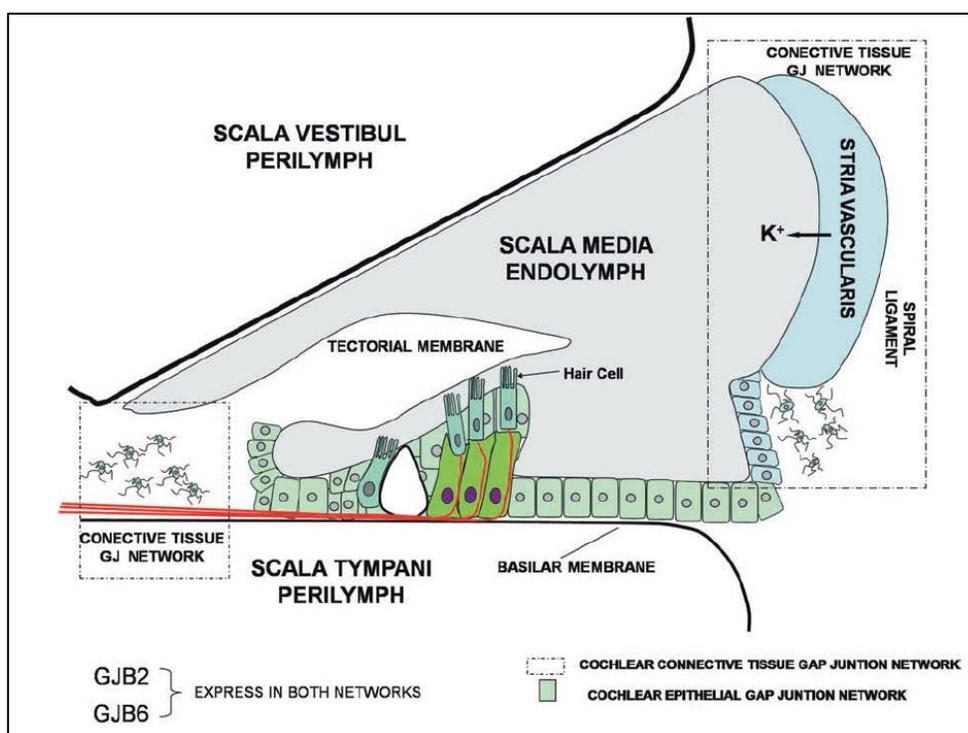


Figura 1: Diagrama de los sistemas celulares presentes en la cóclea. En verde se presentan las células de Deiter y en verde claro las células de soporte y epiteliales quienes juntas constituyen la red epitelial de uniones gap. El tejido conectivo cuyas células tienen forma estrellada correspondientes a los fibrocitos y las células de la estría vascular (azul claro) corresponden a la red de tejido conectivo de uniones gap. Ambas redes expresan conexina 26 y conexina 30 y se ha propuesto que participan en la vía de reciclaje de potasio.

Fuente: Martínez, A et al. 2009. Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss. *Antioxidants & Redox Signaling* 2: 309-322.

Las mutaciones en conexina 26 se han asociado con problemas en la vía del reciclaje del potasio. Al llegar la señal auditiva, los estereocilios abren los canales de potasio y permiten su entrada. Al terminar el estímulo, el potasio debe de ser devuelto a la endolinfa vía ligamento espiral y estría vascular, en donde se expresa la conexina 26 que es la encargada de este proceso (Figura 2; Kikuchi *et al.* 2000).

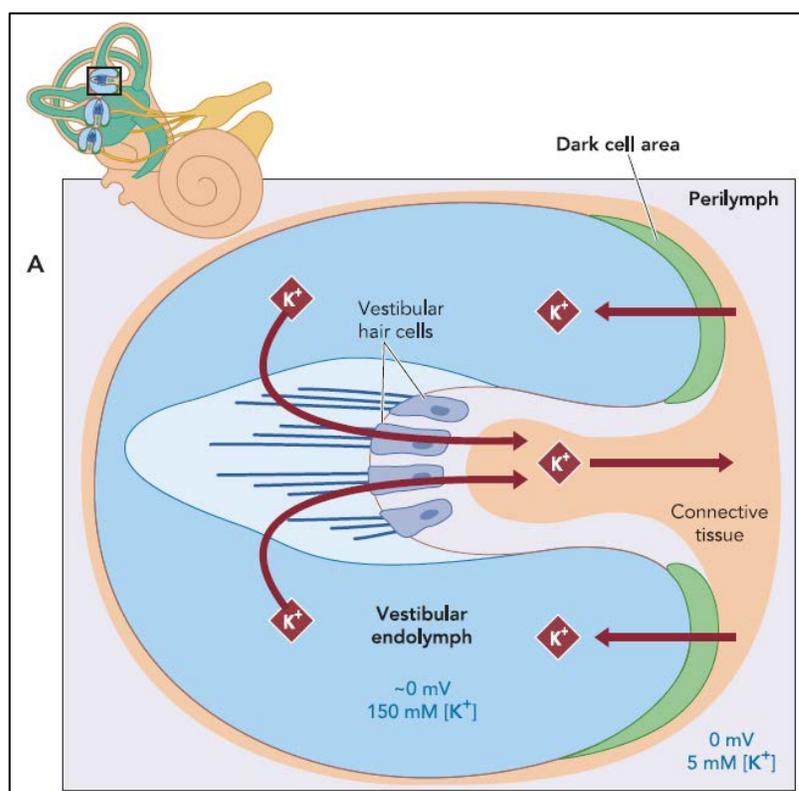


Figura 2: Vía del reciclaje del potasio del oído interno.

Fuente: Hibino H & Y. Kurachi. 2006. Molecular and Physiological Bases of the K^+ Circulation in the Mammalian Inner Ear. *Physiology* 21: 336–345.

Otra teoría de cómo las mutaciones en el gen GJB2 causan sordera está relacionada con la percepción de la señal del sonido. Al haber un aumento en las concentraciones de K^+ en la perilinfa y un impedimento en la vía de reciclaje de este ión, se inhibe la recaptura del glutamato el cuál es el principal neurotransmisor lo que resulta en muerte celular por intoxicación del Órgano de Corti (Cohen-Salmon *et al.* 2002, Eisen & Ryugo 2007) y muerte en las células ciliadas externas por ser más sensibles a los cambios de concentración de K^+ y fallos de la homeostasis coclear (Nickel y Forge 2008).

Existen otras mutaciones que afectan el dominio de activación del canal que es mediado por Ca^{+2} y no permiten el tráfico de moléculas producidas en la célula, lo que causa que estas se acumulen y lleven a la muerte celular (Stong *et al.* 2006).

Además del K^+ , otros cationes como Ca^{+2} normalmente se propagan como mensajeros celulares a través de los canales homoméricos, heteroméricos y heterotípicos de conexina 26 facilitando la liberación de ATP y permitiendo que se mantengan por periodos extendidos las señales intercelulares mediadas por este catión por lo que si mutan, la comunicación intercelular mediada por Ca^{+2} se modifica (Anselmi F. *et al.* 2008). El IP_3 es una molécula que contribuye a la señalización por Ca^{+2} que también puede ver afectado su transporte por mutaciones en el gen GJB2 (Figura 3; Martínez *et al.* 2009).

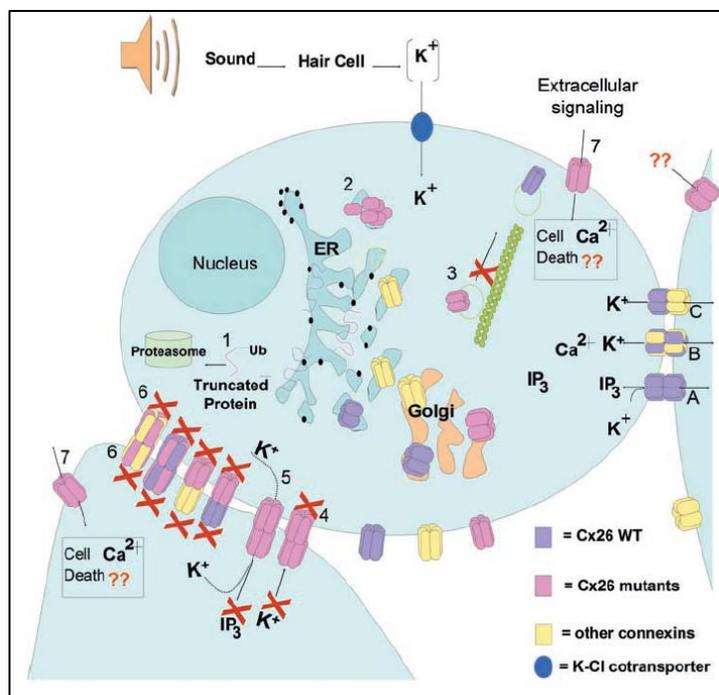


Figura 3: Participación de la conexina 26 en la fisiología normal y fisiopatología del movimiento de moléculas en el oído interno.

Fuente: Martínez, A et al. 2009. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxidants & Redox Signaling* 2: 309-322.

La sordera causada por mutaciones en GJB2 puede ser de moderada a severa, dependiendo del nivel de daño que se le ocasione a la proteína (Öztürk *et al.* 2006). Actualmente se le atribuyen a este gen alrededor del 60% de las sorderas neurosensoriales autosómicas recesivas en poblaciones de origen europeo. En Latinoamérica se han realizado estudios en países como Cuba (Mendez *et al.* 2001) y México (Huesca & Domínguez-Arbutó 2002) que arrojan porcentajes similares. Se ha determinado que el número de portadores puede variar de 0,97% hasta un 3,19% dependiendo de la ubicación geográfica de la población estudiada (Gasparini *et al.* 2000, Mahdieh & Rabanny 2009).

A nivel mundial hay tres mutaciones que presentan una alta frecuencia y que son específicas para cada una de las poblaciones investigadas: para la europea es la mutación 35delG, en la población judía Ashkenazi la 167delT y en la oriental la 235delC. La mutación 35delG,

también llamada 30delG, se ha encontrado en más de dos tercios de las personas con DFNB1 en las poblaciones caucasoides, israelitas y en los países árabes (Denoyelle *et al.* 1997, Morell *et al.* 1998, Gasparini *et al.* 2000). Esta mutación posee dos nombres ya que en esta región hay una secuencia de 6 guaninas por lo que hay algunos investigadores que indican que la guanina que se pierde es en la posición 30 mientras otros en la 35.

A la fecha, para este gen hay reportadas 9 mutaciones dominantes, alrededor de 100 mutaciones recesivas, 10 con forma de herencia desconocida y 45 polimorfismos (Estivill & Gasparini 2013).

Antecedentes y Justificación

En Costa Rica se han estudiado hasta el momento tres tipos de sordera neurosensorial a saber: la sordera de los Monge (León *et al.* 1981); otra asociada a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la cual constituye una sordera de tipo sindrómico (Leal *et al.* 2003a) y la que se presenta en la enfermedad de Norrie (Rehm *et al.* 1997).

El estudio de la familia Monge es el más conocido y consistió en mapear el gen responsable de la sordera dominante en una extensa familia de Cartago que presentaba sordera (León *et al.* 1992). Posteriormente se identificó y caracterizó molecularmente el gen *Diaphanus* causante de este padecimiento (Lynch *et al.* 1997).

Por otra parte Leal *et al.* (2003a) analizaron una familia con la enfermedad de Charcot-Marie –Tooth que presentaba un síndrome que incluía, además de los síntomas clásicos de esta enfermedad y otras complicaciones sensoriales, sordera progresiva en uno de los pacientes. Adicionalmente Leal *et al.* (2003b) describieron un gen de la miosina (*MYH14*) el cuál posteriormente se asoció ,en otros estudios, a sordera.

La enfermedad de Norrie fue estudiada en una familia de Guanacaste (Rehm *et al.* 1997) y es un padecimiento recesivo ligado al X. Entre sus síntomas presenta ceguera, insuficiencia venosa

y sordera. La pérdida de audición se caracteriza por ser postlocutiva, progresiva y principalmente con pérdida en los tonos agudos (Halpin *et al.* 2005).

No se encuentran en la literatura estudios moleculares ni epidemiológicos en conexina 26, ni de ninguna otra causa genética o ambiental de sordera no sindrómica en Costa Rica, por lo que es importante empezar a generar datos de las mutaciones existentes en el país, con el propósito de analizar la posibilidad de elaborar y proponer un programa de detección temprana, ya que esta pérdida de audición generalmente aparece antes de que el niño empiece a hablar. Esto aumenta la necesidad de establecer un diagnóstico temprano para mejorar su calidad de vida, en vista de que si no es detectada a tiempo se dificulta el aprendizaje del lenguaje.

Se ha demostrado que los pacientes con mutaciones en el gen de conexina 26 que reciben implantes cocleares tienen una mejor respuesta que aquellos con otra causa de sordera congénita (Green *et al.* 2002; Wu *et al.* 2008). Además, responden mejor a la terapia de lenguaje posterior a la implantación de este dispositivo (Fucushima *et al.* 2002).

Cabe mencionar que en el país ya se realiza un tamizaje de la sordera por métodos audiométricos (potenciales evocados) por parte de profesionales en otorrinolaringología del Hospital México; sin embargo, la sordera por conexina 26 no necesariamente se presenta desde el momento del nacimiento, lo que implica que la hipoacusia por mutaciones en conexina 26 puede tardar hasta 60 meses en aparecer y sin tamizaje molecular se pueden pasar por alto un 3,8% de los niños con este padecimiento (Norris *et al.* 2006). En un estudio elaborado por Orzan y Murgia (2007) observan que 50% de los niños que presentaban mutaciones que causaron una sordera profunda, presentaron un tamizaje audiológico normal antes de los 3 meses. Por ello es valioso y necesario contar con un diagnóstico molecular a edades tempranas.

Se calcula que más de 100 niños nacen por año con problemas auditivos en Costa Rica, de ellos, solamente 50% cursan con algún factor de riesgo (com. pers. Dr. Julián Chaverri) por lo que

se torna importante investigar sobre las causas de la sordera de “causa desconocidas” e identificar el papel de los problemas genéticos en esta población.

Hipótesis

Se supone que las mutaciones en el gen *GJB2* y las frecuencias de éstas, en Costa Rica, no deberían ser muy diferentes a las encontradas en otros países de Latinoamérica; por lo tanto, es de esperar entonces que la mutación 35delG, esté presente en la mayoría de los pacientes y también tenga la más alta frecuencia en los portadores. Sin embargo, una alternativa que incluya un análisis de las características propias de la estructura de la población costarricense, permitirá establecer diferencias o semejanzas tanto en las mutaciones estudiadas como en su frecuencia en la población.

Objetivo General

Estudiar las mutaciones presentes y prevalencia de las mismas, en el gen de la conexina 26 y su variación en una muestra de la población costarricense como causante de la sordera congénita. Además, en este contexto, proponer una alternativa viable y efectiva al diagnóstico temprano de esta enfermedad hereditaria.

Objetivos específicos

1. Determinar cuáles mutaciones en el gen *GJB2* se encuentran en pacientes del servicio de otorrinolaringología del Hospital México y calcular su frecuencia en una muestra referente de la población costarricense.
2. Determinar el o los tipo(s) de herencia de la enfermedad en las distintas familias localizadas.
3. Estimar la frecuencia de los portadores de las mutaciones de conexina 26 del país.
4. Ofrecer un método alternativo de diagnóstico molecular, complementario a la prueba audiométrica actual, con el propósito de establecer un diagnóstico preciso en la edad temprana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Para este proyecto se utilizaron dos muestras. La primera, una muestra de pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica correspondiente a 150 personas atendidas en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital México de mayo del 2008 a enero del 2010. La segunda, una muestra de población de referencia oyente constituida por 80 personas.

El servicio de otorrinolaringología del Hospital México, tiene la particularidad de que es el único centro médico que realiza implantes cocleares en el país y por lo tanto allí se reciben pacientes de todo el territorio nacional. El personal de esta unidad realizó el diagnóstico clínico apropiado y seleccionó a los pacientes que cumplían con los siguientes criterios de inclusión:

- a- Ser hijos de padres oyentes.
- b- Padecer una sordera no sindrómica y de causa desconocida.
- c- Padecer una sordera neurosensorial, bilateral, sin cambios en la severidad y con severidad similar para ambos oídos.

Son excluidas causas ambientales como: infecciones materno- fetales, historia de meningitis, rubéola, citomegalovirus, toxoplasmosis, herpes o varicela durante el embarazo. Los datos fueron extraídos de un cuestionario perteneciente a un estudio que se realiza en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital México (Anexo 1). Las variables concomitantes reportadas para cada paciente fueron: edad, sexo, dirección, edad en la cual se diagnosticó la sordera, antecedentes personales pre, peri y postnatales. Además, se incluyó dentro de la historia del probando información familiar como el lugar de procedencia de cada uno de los padres y profesión de los mismos y si existía alguna relación de parentesco entre ellos o algún otro miembro de la familia con sordera.

Los pacientes incluidos en esta investigación provienen de todas las provincias de Costa Rica (), un 60% de los pacientes viven dentro de la gran área metropolitana y un 40% pertenecen a localidades más alejadas como por ejemplo la zona sur y la zona norte por lo que en este sentido podría considerarse una muestra del país (Cuadro 1). La muestra equivale a un 0,2% del total de sordos registrados para cada provincia según el Censo Nacional 2011.

Cuadro 1: Distribución de la muestra de pacientes del Hospital México por provincia y cantón en números totales.

Provincia	Cantón	Número de Pacientes
San José	Central	18
	Escazú	1
	Desamparados	3
	Tarrazú	1
	Aserrí	2
	Goicochea	4
	Santa Ana	2
	Alajuelita	3
	Acosta	1
	Tibas	3
	Moravia	1
	Curridabat	2
	Perez Zeledón	3
Alajuela	Central	7
	San Ramón	2
	Grecia	8
	Atenas	3
	Naranjo	6
	Palmares	2
	Orotina	1
	San Carlos	4
	Upala	2
	Los Chiles	1

Cartago	Central	7
	Paraíso	2
	La unión	3
	Jimenez	1
	Turrialba	1
	Oreamuno	1
Heredia	Central	3
	Santo Domingo	1
	Santa Bárbara	1
	San Rafael	2
	Belén	2
	San Pablo	1
	Sarapiquí	2
Guanacaste	Liberia	1
	Nicoya	1
	Santa Cruz	2
	Bagaces	1
	Carrillo	2
	Abangares	1
	Tilarán	1
	Hojancha	1
Puntarenas	Central	5
	Buenos Aires	3
	Osa	1
	Aguirre	3
	Golfito	1
	Coto Brus	3
	Parrita	1
Limón	Central	5
	Pococí	5
	Siquirres	3
	Talamanca	1
	Guácimo	1

Esta muestra de pacientes consistió en 68 hombres y 81 mujeres con edades entre los 1 y 36 años para un promedio de edad de 11 años. La mayoría de pacientes son costarricenses. Solo dos pacientes son nacidos en Nicaragua y tres son hijos de inmigrantes nicaragüenses.

Un 95% de los pacientes reporta pérdida de audición antes de los 8 años. Solo 8 pacientes fueron diagnosticados después de los 9 años. 41 pacientes reportan tener al menos un familiar con sordera. En este grupo se procedió a tomar una muestra de sangre del dedo corazón del probando, padres y hermanos (cuando los hubo), con previa firma del consentimiento informado.

Para la toma de las muestras se utilizaron lancetas y la sangre fue montada en papeles filtro FTA® Classic Card de Whatman, cada uno con capacidad para cuatro muestras. En estas tarjetas se utilizó un código para proteger la confidencialidad del paciente. La nomenclatura consistió en asignar un número consecutivo a partir de uno para cada familia. El segundo dígito es un uno para el probando, un dos para el padre y un tres para la madre y para los hermanos los siguientes consecutivos. Este código se encuentra bajo la custodia de la Dra. Sandra Silva en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica.

La muestra de referencia consistió en un grupo de 80 muestras de ADN obtenido de población general, oyente. Este ADN fue obtenido por la Dra. Sandra Silva de la Fuente de personas con cédula costarricense que se presentaron para la realización de una prueba de paternidad, previa firma del consentimiento informado (Anexo 2). La muestra consistió en 32 hombres y 48 mujeres mayores de edad. Un 48% de los participantes nacieron en San José, un 24% en Alajuela, 10% en Puntarenas, 8% en Guanacaste, 5% en Heredia, 3% en Limón y un 2% en Cartago.

Análisis de laboratorio

El análisis de las muestras se realizó en los laboratorios de Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica.

Las muestras de ADN de los pacientes fueron extraídas mediante el proceso semiautomatizado Maxwell16® de Promega siguiendo las especificaciones del fabricante utilizando 4 perforaciones de 2mm de diámetro, con la cual se obtuvieron las amplificaciones y secuencias que se presentan como resultados de este trabajo. La extracción de ADN de la muestra de referencia fue extraída de sangre total por el método de cloroformo (Grimberg *et al.* 1989) entre mayo de 1997 y octubre del 2001.

La región del exón 2 del gen de la conexina fue una región complicada de trabajar. En primer lugar la región es rica en citosina y guanina (51%) por lo que se dificulta su amplificación. Al realizar un análisis con el programa OLIGOCALC, se encuentra que la región en la banda "Foward" tiene doce pares de secuencias internas que pueden formar estructura secundaria por complementariedad de bases y un sin número de tramos cortos de aproximadamente 7 nucleótidos que pueden doblarse sobre sí mismos y formar pequeñas asas (Anexo 3). Lo mismo sucedió con la banda complementaria.

Se hicieron numerosos intentos por estandarizar la amplificación de la región de interés, utilizando diferentes pares de los iniciadores que ya se tenían (Anexo 4). Como no se obtuvieron las amplificaciones como se deseaba se sintetizaron nuevos iniciadores para lograr cubrir en una sola amplificación todas las mutaciones (Anexo 5). Con los iniciadores: Cx26F - AGGTTGTGTAAGAGTTGGTGT y Cx26R- AGAAGATGCTGCTTGTGTAG se logró obtener un fragmento de 573 pb del exón 2.

Se probaron también diferentes polimerasas con diferentes características, para lograr una amplificación eficiente y consistente. El mejor resultado se obtuvo con el protocolo que se describe en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Reactivos utilizados y cantidades para realizar la amplificación del exón 2 del gen GJB2

ADN (100-400ng/ μ l)*	2,5 μ l
Buffer 10X	3 μ l
dNTPs (2mM)	3 μ l
Iniciadores (20 μ M)	0,5 μ l c/u
Taq High Fidelity "Fermentas" 5 U/ μ l	0,25 μ l
Agua	20,25 μ l
Volumen total	30 μ l

*Dependiendo de la calidad del ADN, a mayor calidad se requiere menor concentración.

El protocolo utilizado en el termociclador es de 40 ciclos con una desnaturalización inicial y una elongación final tal y como se describe en el Cuadro 3. Al finalizar el termociclador mantenía una temperatura de 4 C°.

Cuadro 3: Protocolo utilizado en el termociclador para la amplificación del exón 2 del gen GJB2.

Proceso	Temperatura (C°)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	3
Desnaturalización	94	0,5
Alineamiento	59	1
Elongación	72	1
Extensión final	72	10

Los productos de PCR se limpiaron con el Kit de Macherey-Nagel "Nucleo Spin Gel and PCR clean-up" y resuspendidos en 20-30 μ L de buffer de elusión considerando la cantidad de producto en cada reacción.

La reacción de secuenciación también sufrió modificaciones en los protocolos convencionales del Big Dye Terminator 3.1 de ABI, como iniciar con un ciclo de 5 minutos a 98°C, aumentar la temperatura de desnaturalización a 98°C en cada ciclo y agregar un 2% de DMSO en la reacción. A pesar de ello, algunas de las secuencias obtenidas fueron pobres, pues se generan unas lecturas inespecíficas muy altas al inicio conocidas como “blobs”. Estos aparecen en la secuencia en posiciones entre los 70-80 nucleótidos y luego más adelante entre los 110-120 nucleótidos. Debido a esto la mayoría de las secuencias se realizaron con la empresa MacroGen en Korea (www.macrogen.com). El análisis de las mismas fue realizado mediante el programa SeqScape de Applied Biosystems.

Análisis de resultados

Luego del trabajo de laboratorio se realizó un análisis de los resultados como se plantea a continuación.

Análisis estadístico de variables concomitantes

Como la sordera es un padecimiento que puede verse afectado por múltiples factores se realizó un análisis descriptivo de variables concomitantes incluidas en el protocolo del Hospital México. Se analizó comparativamente mediante Chi Cuadrado en el programa SPSS las distintas variables entre la población de pacientes y una población de referencia debidamente escogida para un estudio de los casos y una muestra control. Para ello se utilizaron las variables de la parte 3, 4, 5 y 6 del Anexo 1. La muestra de referencia en este caso, serán los cuestionarios realizados a pacientes del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital México que fueron entrevistados por sorderas de causas ambientales conocidas.

Se elaboraron mapas en el programa R, utilizando la dirección proporcionada por cada paciente según provincia, cantón y distrito.

Análisis genético

Se procedió a

- a. Establecer relaciones fenotipo-genotipo para cada variante con los datos obtenidos de la evaluación clínica.
- b. Calcular la frecuencia de todas las variantes y determinar existencia de variantes raras.
- c. Calcular la variabilidad del locus en estudio mediante la estimación de la heterocigosis observada y esperada.

Para complementar la información de los afectados se elaboraron las genealogías para aquellos pacientes positivos para conexina 26, que contaran con antecedentes familiares de sordera con el programa Progeny 7.0. Para ello se utilizó página de los mormones de la Iglesia de Jesucristo de los Santos de los Últimos Días (www.familysearch.org) y la página del Tribunal Supremo de Elecciones Supremo de Elecciones (www.tse.go.cr).

Además, se analizó la estructura de la población en la comunidad de El Yaz de Paraíso de Cartago, de donde provienen dos de los afectados encontrados, utilizando isonimia. La isonimia permite estimar el endocruzamiento utilizando los apellidos de los matrimonios registrados en una comunidad. Los datos utilizados se tomaron de las actas matrimoniales de los archivos de la Curia Metropolitana desde 1917 hasta 1938. Se estimó el endocruzamiento total (F), utilizando el método descrito por Crow (1980) que utiliza las siguientes fórmulas:

$$F = F_n + (1 - F_n)F_r$$

Dónde F_r representa el componente aleatorio y F_n el no aleatorio y ambos se calculan de la siguiente manera:

$$F_r = \frac{Pr}{4}$$

$$F_n = \frac{P - Pr}{4(1 - Pr)}$$

Donde P representa la proporción de matrimonios isonímicos y $Pr = \sum p_i q_i$. La frecuencia de p_i corresponde a la frecuencia de un apellido determinado en los hombres y el q_i la frecuencia de ese apellido en las mujeres.

Consentimiento informado

La fórmula de consentimiento, fue aprobada por el comité ético científico del CENDEISSS para el proyecto R08-SABI-00021: “Estudio de las sordera neurosensoriales al nacimiento, en la infancia o en la edad adulta temprana y su eventual tratamiento en pacientes atendidos en el servicio de otorrinolaringología del Hospital México CCSS” a cargo del Dr. Julián Chaverri Polini. Se adjunta copia del documento (Anexo 6). El proyecto se encuentra adscrito a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica bajo el nombre: “Mutaciones en el gen de Conexina 26 en una muestra de la población costarricense” No. 801-A8-300 a cargo de la MSc. Sandra Silva de la Fuente como investigador principal.

RESULTADOS

Análisis de las variables concomitantes

Al realizar el análisis comparativo entre las variables concomitantes del grupo de sordos muestreado para análisis genético y el grupo de referencia, no se obtienen diferencias significativas para la distribución de las variables. En ambos grupos la mayoría de los niños: nacieron a término, no presentaron complicaciones durante el parto, presentaron un peso al nacer superior a los 2000g, no presentaron malformaciones congénitas ni hospitalizaciones.

Solo dos variables presentaron diferencias significativas entre grupos. La variable de infecciones prenatales ($X^2= 32$, $p<0,05$, $gL= 1$) presentó una mayor frecuencia en el grupo de referencia donde un 40% presentó alguna infección en contraste al 5% en los pacientes que formaron parte de la muestra de sordos de causa desconocida. Mientras que los antecedentes familiares de sordera fueron mayores en el grupo de pacientes con sordera de causa desconocida (28%) y sometidos al análisis genético ($X^2= 11,3$, $p<0,05$, $gL= 1$) que en el grupo de referencia (2%).

Análisis molecular

Con el análisis molecular se obtuvieron 35 secuencias completas de la región amplificada y 23 secuencias incompletas que se distribuyen geográficamente de una manera muy similar a la muestra total de los 150 pacientes (Figura 4).

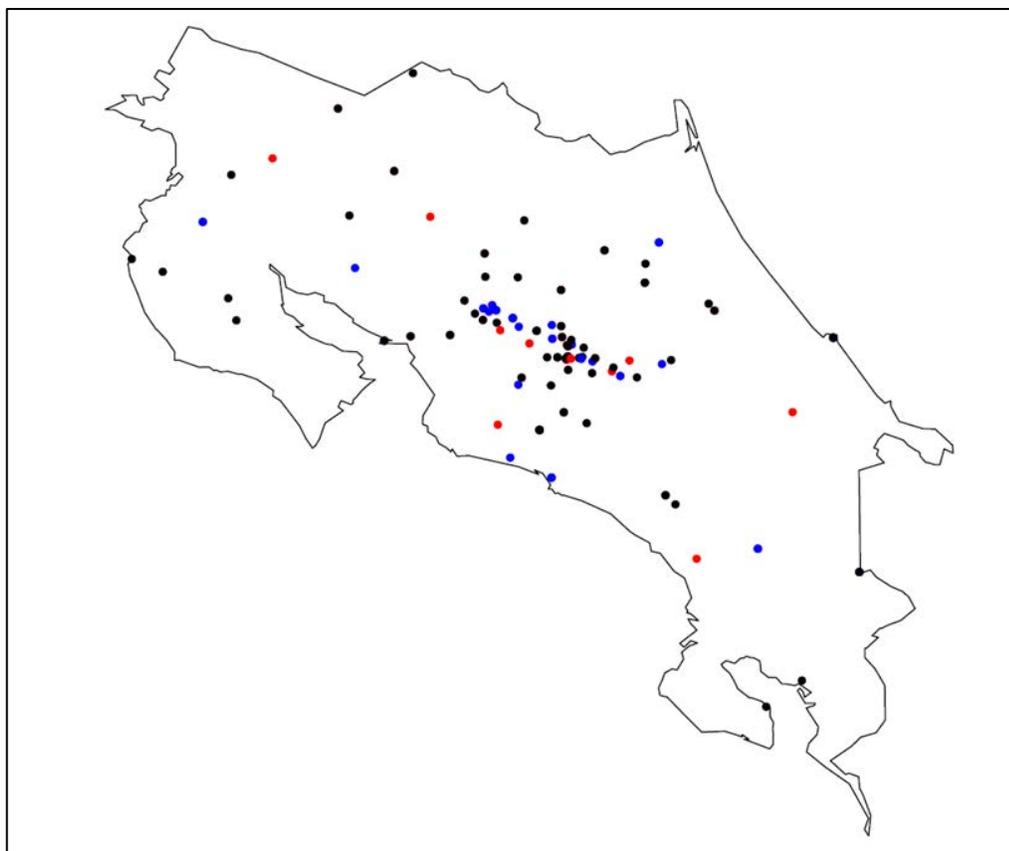


Figura 4: Distribución de la muestra de 150 pacientes. El color negro representa a aquellos que no fueron secuenciados, el rojo señala los que tienen una secuencia completa y en azul en los que se obtuvo una secuencia parcial.

En los 35 pacientes de quienes se obtuvo la secuencia completa, se encontraron cuatro cambios en la secuencia del exón 2 del gen GJB2 que son: -15 C>T, c.35delG, c.79G>A y c.186C>T. De ellos, solo la mutación c.35delG está descrita como causante de sordera. La misma se encontró en homocigota en uno de los pacientes y en heterocigoto en un segundo. Esta mutación ocurre cuando se pierde una guanina en la posición 35 pasando de seis guaninas (alelo normal) a solo 5 (alelo mutado; Figura 5).

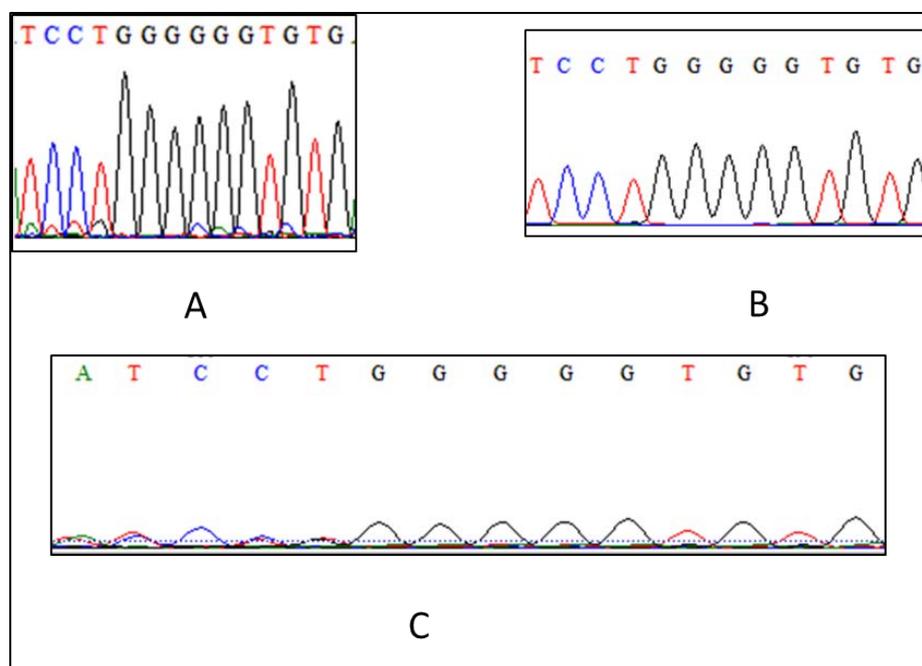


Figura 5: Electroferogramas de 3 pacientes A: corresponde al alelo normal. B: Homocigota para la mutación c.35delG y C: Heterocigota para la mutación c.35delG.

Al analizar las secuencias parciales legibles de 23 pacientes más, se encontró la delección 35delG en un tercer paciente en estado homocigoto. Por lo tanto, esta mutación es la causante de sordera en el 3,4% de los casos analizados, un poco mayor a lo encontrado en países como Nicaragua (2,8%), pero inferior a lo reportado para Colombia (8,9%), Chile (7,5%) y México (10,5%).

Al revisar la historia clínica de los dos pacientes homocigotos para la mutación 35delG, se encuentra que ambos poseen antecedentes familiares de sordera en al menos dos parientes, por lo que se procede al análisis genealógico. Se encuentra que ambos provienen de una pequeña localidad llamada El Yaz de Santiago de Paraíso de Cartago y que están relacionados (Figura 6).

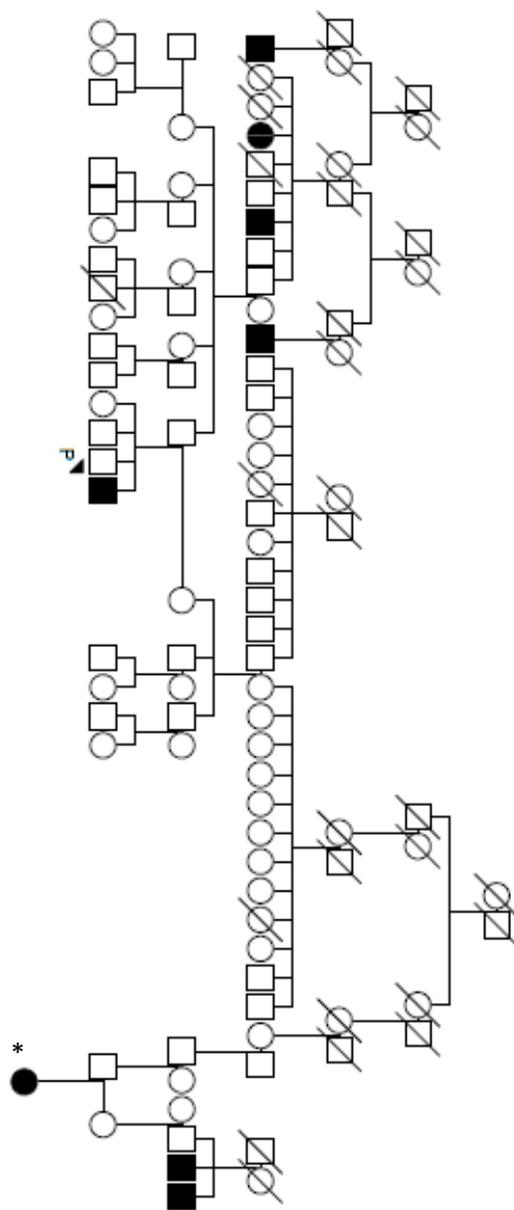


Figura 6: Árbol genealógico de dos pacientes (P y *) que en un inicio pertenecían a familias no relacionadas, realizado con el programa Progeny 7.0. Nótese que ambos tienen al menos dos parientes con sordera y que hay un ancestro común que une ambas familias lo cuál era desconocido al momento del reclutamiento. Ambos tienen la mutación c.35delG en homocigota.

Al examinar las actas matrimoniales de la comunidad de El Yaz, llama la atención que solo se reportan 66 apellidos que es significativamente menor a lo reportado para Paraíso (703) y Cartago (1524; Barrantes, datos no publicados) lo que da un indicio sobre el tamaño de la comunidad y la posible endogamia. Al calcular el coeficiente de endocruzamiento de la comunidad por isonimia, se reportan valores altos ($F = 1260 \times 10^{-5}$) al compararlo con lugares de baja consanguineidad como San José (566×10^{-5} ; Rodríguez-Larralde & Barrantes 2012). Los componentes F_r y F_n presentan ambos valores muy similares (610×10^{-5} y 660×10^{-5} respectivamente) lo que indica que hay uniones consanguíneas por azar que tenga como causa probable un tamaño pequeño de la población y también un efecto del endocruzamiento por uniones entre parientes. Estas características hacen a esta comunidad un sitio interesante para futuras investigaciones.

En la población de referencia oyente no se observaron dos de las variantes encontradas en pacientes (-15 C>T y c.35delG) pero se reportó la mutación c.132 G>A la cual no se encontró en los pacientes analizados.

Análisis Poblacional

Las frecuencias, heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada para cada uno de los alelos encontrados en la muestra de pacientes ($n=35$, excepto para la 35delG cuyo $n=58$) y la muestra de referencia oyente ($n=80$) se presentan a continuación (Cuadro 4).

Cuadro 4: Frecuencia de los alelos, heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada para cada uno de los alelos encontrados en la muestra de pacientes y en la población de referencia.

Alelo	Frecuencia		H_e		H_o	
	Pacientes	Referencia	Pacientes	Referencia	Pacientes	Referencia
-15 C>T	0,06	-	0,11	-	0,06	-
c.35delG	0,04	-	0,08	-	0,03	-
c.79G>A	0,1	0,16	0,18	0,27	0,2	0,26
c. 132G>A	-	0,006	-	0,01	-	0,01
c. 186C>T	0,03	0,012	0,06	0,02	0,03	0,02

El alelo con mayor frecuencia tanto en el grupo de pacientes como en la población de referencias es la c.79G>A también llamada V27I. En los pacientes se encontró solo en estado heterocigoto, mientras que en la población de referencia oyente se encontró tanto en homocigota como en heterocigoto. El alelo normal tiene una guanina en la posición 79 mientras que en el alelo mutado se encuentra una adenina (Figura 7).

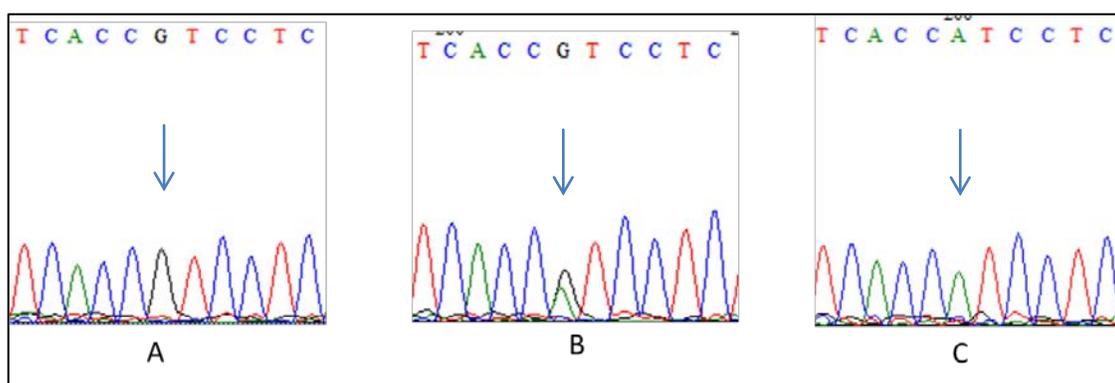


Figura 7: Electroferogramas con la mutación V27I. A: corresponde al alelo normal. B: Heterocigota para la mutación c.79G>A y C: Homocigota para la mutación c.79G>A.

Para la región 35delG al repetir los cálculos tomando en cuenta 24 pacientes más a quienes se le pudo analizar únicamente la región donde se encuentra esta mutación, la frecuencia del alelo sube 0,05, la $H_o = 0,018$ y la $H_e = 0,095$. La frecuencia de portadores observada en la muestra de pacientes se encuentra entre un 2,8% (1/35) y un 1,7% (1/58) para un promedio de 2,25%. Esta mutación no se encontró en la muestra de referencia oyente.

DISCUSIÓN

En países desarrollados, las mutaciones en el gen de la conexina 26 son una causa importante de sordera no sindrómica en la población de sordos de causa desconocida. Sin embargo, los resultados obtenidos para Costa Rica difieren de lo esperado ya que solo se pudo diagnosticar a dos pacientes con mutaciones causantes de este padecimiento. Una de las posibles razones de que esto ocurra, es que los pacientes que conforman la muestra en realidad tengan factores de riesgo ambiental que por sesgos al momento de realizar la historia clínica no hayan podido ser tomados en cuenta, ya que la toma de los datos se hace de forma anecdótica por lo se carece de datos más fiables como por ejemplo resultados de pruebas de laboratorio para detectar algunas de las enfermedades que pueden padecer las madres y que pueden ocasionar pérdida de la capacidad auditiva.

Con respecto a los cambios encontrados en la secuencia de ADN para la región analizada, el polimorfismo -15 C>T se encuentra en la región 5'UTR y se describe como una variante benigna (Putcha *et al.* 2007, Estivill & Gasparini 2013). Por otra parte, la variante 186C>T constituye una mutación sinónima y no se ha descrito aún si poseen relevancia clínica (Putcha *et al.* 2007).

La mutación 132G>A también llamada W44X, fue detectada en un individuo de la muestra de población general oyente en estado heterocigoto. Esta mutación trunca a la proteína por lo que en estado homocigota sí podría causar sordera (Putcha *et al.* 2007, Estivill & Gasparini 2013). Sin embargo no fue encontrada en la muestra de sordos que pudo ser analizada.

La mutación V27I (79G>A) provoca la sustitución de una valina por una isoleucina en el codón 27, sin embargo, no ha podido ser relacionada a la pérdida auditiva debido a que aparece tanto en casos como en controles. Además, estudios moleculares demuestran que el comportamiento del hemicanal y del canal de conexina 26 con esta mutación mantiene una

funcionalidad elevada al compararlo con la proteína silvestre, por lo que es considerado un alelo inocuo (Choi *et al.* 2011).

Este polimorfismo se ha encontrado en alta frecuencia en otros estudios en el continente americano, por ejemplo en la población estadounidense, constituye el 6,28% del total de mutaciones detectadas en el gen GJB2 (Putcha *et al.* 2007). En Guatemala se encontró esta mutación en 21 de 65 pacientes sordos (Bustamente *et al.* 2011) y en otras regiones como México y Nicaragua se presentan frecuencias incluso mayores a las reportadas en esta investigación (Cuadro 5).

Cuadro 5: Frecuencias del polimorfismos V27I en diferentes países de Latinoamérica.

País	Número de casos	Frecuencia	Referencia
Colombia	112	0,09	Tamayo <i>et al.</i> 2009
México	76	0,24	Arenas-Sordo <i>et al.</i> 2012
Chile	80	0,05	Arancibia <i>et al.</i> 2012
Nicaragua	86	0,22	Saunders <i>et al.</i> 2007
Argentina	94	0,08	Gravina <i>et al.</i> 2010
Costa Rica	35 / 80	0,1 / 0,16	Este estudio

Como se mencionó anteriormente, la delección 35delG fue la única mutación detectada que causa sordera cuando se encuentra en estado homocigoto, ya que la misma genera un codón temprano de terminación, truncando la proteína. En uno de los pacientes, se encontró en estado heterocigoto, por lo que no se puede afirmar que esta sea la causa de la pérdida auditiva, pero por lo que se ha observado en otros estudios, no se puede excluir que contribuya a la aparición del padecimiento, ya que existe la posibilidad de la heterocigosis compuesta, por ejemplo con la

conexina 30 que no está siendo analizada. En el resto de los pacientes de quienes se obtuvo la secuencia completa y no se encontraron otras mutaciones, su diagnóstico de sordera continúa siendo desconocida.

Algunos de los pacientes que no presentaron mutaciones en este gen, reportan tener uno o varios familiares con sordera. Se recomienda entonces completar en ellos la historia familiar con genealogías y determinar si son candidatos para un análisis de ligamiento que permita establecer si efectivamente existe alguna alteración en la secuencia de algún otro locus.

Con respecto al fenotipo de los pacientes que presentan la mutación 35delG en estado homocigota, ambos padecen de una sordera neurosensorial, bilateral, de aparición temprana (antes de los 4 años), prelocutiva y profunda. Esto concuerda con el fenotipo reportado en otros estudios para esta misma mutación (Cryns *et al.* 2004, Öztürk *et al.* 2006).

En un estudio realizado en Estados Unidos esta mutación representa el 42,8% del total de mutaciones en el gen de la conexina 26, pero al subdividir la población por etnia, en la población hispana solo representa el 0,5% de las mutaciones mientras que en los caucásicos es de 31,3% (Putcha *et al.* 2007).

Al comparar las frecuencias de la mutación 35delG encontradas en otros países de Latinoamérica, se puede observar que la frecuencia en Costa Rica se encuentra por debajo de lo reportado por los países suramericanos y México, pero presenta una mayor frecuencia que la reportada para Nicaragua (Cuadro 6).

Cuadro 6: Frecuencias de la mutación 35delG en diferentes países de Latinoamérica.

País	Número de casos	Frecuencia	Referencia
Venezuela	42	0,06	Angeli <i>et al.</i> 2000
Colombia	112	0,17	Tamayo <i>et al.</i> 2009
México	76	0,08	Arenas-Sordo <i>et al.</i> 2012
Chile	80	0,09	Arancibia <i>et al.</i> 2012
Nicaragua	86	0,01	Saunders <i>et al.</i> 2007
Argentina	94	0,2	Gravina <i>et al.</i> 2010
Costa Rica	58	0,04	Este estudio

La frecuencia de portadores para la 35delG es similar a la reportada en Latinoamérica en países como Venezuela donde la frecuencia de portadores observada en población sorda es de 2,4% (Angeli *et al.* 2000) y Bogotá-Colombia 2,7% (Tamayo *et al.* 2009). No obstante, la frecuencia en Nicaragua, el vecino más cercano es de 1,2%.

En otros estudios poblacionales se ha determinado que la frecuencia de portadores presenta un gradiente de norte a sur en Europa (Mahdieh & Rabanni, 2009) siendo la frecuencia de portadores obtenida para España una de las más altas, detrás de Grecia (3,5%), y algunas regiones de Italia y Francia (Lucotte, 2007). En el continente Africano, Marruecos tiene la frecuencia más alta (2,65%), mientras que en otros países como Ghana, la frecuencia de esta mutación y de portadores es 0%. En el continente asiático la frecuencia de portadores, también es baja, siendo nula en países como la India y China (Mahdieh & Rabanni, 2009). Asumiendo que el lugar de origen de una mutación es donde ésta se encuentra con mayor frecuencia, el origen de la mutación 35delG sería la región del Mediterráneo. No está claro el lugar exacto donde se originó esta mutación pero la evidencia apunta a que pudo ser en Grecia (Kokotas *et al.*, 2008 ; Kokotas *et*

al., 2010). Es posible que de allí haya migrado a España (Kokotas et al., 2010) y posteriormente al continente americano y a nuestro país.

Al encontrarse en este estudio la mutación 35delG en dos pacientes que provienen de la misma comunidad y tomando en cuenta los valores obtenidos en el coeficiente de endocruzamiento, se recomienda realizar una investigación en el Yaz de Paraíso para determinar la frecuencia de esa mutación en ese sitio.

Por último, basados en los resultados obtenidos en este estudio y tomando en cuenta la realidad económica del país, se sugiere como posible plan a seguir, para la detección temprana de las sorderas por conexina 26, que el tamizaje audiométrico en neonatos continúe aplicándose y se mejore en cobertura. También, debe establecerse una segunda evaluación audiométrica posterior a los 6 meses y anterior al año de edad debido al retraso que puede existir en la aparición del padecimiento en las sorderas de origen genético incluyendo aquellas causadas por la mutación 35delG en el gen GJB2 de conexina 26. En los pacientes en que el resultado de estas pruebas sea negativo, se puede proceder a realizar un tamizaje con el método Wilcox (enzimas de restricción) que detecta de forma específica la mutación 35delG.

Se considera que debido a que la colocación del implante coclear (único tratamiento disponible) no depende del diagnóstico molecular y por lo complicado de la región, la alternativa diagnóstica propuesta se ajusta a la realidad del país. Las pruebas audiométricas, específicamente los potenciales evocados, permiten detectar todo tipo de sorderas tanto ambientales como genéticas por lo que la relación costo-beneficio es más favorable que la inclusión de la conexina 26 en el programa de tamizaje nacional.

Aquellas muestras que tengan un resultado positivo para este segundo filtro, pueden secuenciarse utilizando el protocolo descrito en este trabajo, con la diferencia de que se recomienda que la extracción de ADN se haga de sangre completa y no en papel filtro, ya que

obtener las amplificaciones fue un procedimiento complejo. Al parecer la región es complicada debido a que otros estudios revisados también presentaron problemas en amplificar la totalidad de las muestras (Saunders *et al.* 2007, Arancibia *et al.* 2012)

Además del tamizaje molecular como herramienta diagnóstica, se considera importante que el estudio genético se extienda al estudio genealógico y que se considere el impacto de la estructura de la población en la distribución de esta mutación con fines preventivos.

BIBLIOGRAFIA

- Angeli S., R. Utrera, S. Dib, E. Chiossone, C. Naranjo, O. Henríquez & M. Porta. 2000. GJB2 Gene Mutations in Childhood Deafness. *Acta Otolaryngol* 120: 133–136
- Anselmi F., V. Hernandez, G. Crispino, A. Seydel, S. Ortolano, S. Roper, N. Kessar, W. Richardson, G. Rickheit, M. Filippov, H. Monyer, & F. Mammano . 2008. ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer second messages propagate Ca²⁺ signals across the inner ear. *PNAS* 105 :18770-18775.
- Arancibia M., R. Ramírez, C. Farfán, M. Acuña & L. Cifuentes. 2012. Frecuencia de la mutación 35delG del gen GJB2 (conexina 26) en una muestra de escolares sordos de Santiago. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 72: 7-14.
- Arenas-Sordo M.L., I. Menendez, E. Hernández-Zamora, A. Sirmaci, D. Gutiérrez-Tinajero, M. McGetrick, P. Murphy-Ruiz, X. Leyva-Juárez, F. Huesca-Hernández, J. Dominguez-Aburto & M. Tekin. 2012. Unique spectrum of GJB2 mutations in Mexico. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 76: 1678-1680
- Baris I. & V. Köksal. 2003. Multiplex detection of common mutations in the Connexin-26 gene. *Genet. Test.* 7: 63-65.
- Bustamante Y., S. Hernandez, A. Avalos, E. Dardón, C. Carranza & G. Silva. 2011. Detección de la presencia de mutaciones en el exón 2 del gen GJB2 que codifica la proteína conexina 26, en niños con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva (HANSAR). I Congreso Costarricense de Genética. San Jose, Costa Rica.
- Cohen-Salmon M., T. Ott, V. Michel, J. Hardelin, I. Perfettini, M. Eybalin, T. Wu, D.C. Marcus, P. Wangemann, K. Willecke & C. Petit. 2002. Targeted ablation of Connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol.* 12: 1106–1111.
- Choi S., K. Y. Lee, H-J. Kim, H-K. Kim, Q. Chang, H-J. Park, C-J. Jeon, X. Lin, J. Bok, & U-K. Kim. 2011. Functional Evaluation of GJB2 Variants in Nonsyndromic Hearing Loss. *Mol. Med.* 17: 550-556
- Crow J.F. 1980. The estimation of inbreeding from isonymy. *Hum. Biol.* 52:1-14.
- Cryns K., E. Orzan, A. Murgia, P. L. M. Huygen, F. Moreno, I. del Castillo, G. Parker Chamberlin, H. Azaiez, S. Prasad, R. A. Cucci, E. Leonardi, R. L. Snoeckx, P. J. Govaerts, P. H. Van de Heyning, C. M. Van de Heyning, R. J. H. Smith & G. Van Camp. 2004. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J. Med. Genet.* 41: 147-154

- Denoyelle F., D. Weil, M.A. Maw, S.A. Wilcox, N.J. Lench, D.R. Allen-Powell, A.H. Osborn, H. Dahl, A. Middleton, M.J. Houseman, C. Dode, S. Marlin & 17 others. 1997. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.* 6: 2173-2177
- Eisen M.D. & D.K. Ryugo. 2007. Hearing molecules: contributions from genetic deafness. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 566 – 580
- Fukushima K., K. Sugata, N. Kasai, S. Fukuda, R. Nagayasu, N. Toida, N. Kimura, T. Takishita, M. Gunduz & K. Nishizaki. 2002. Better speech performance in cochlear implant patients with *GJB2*-related deafness. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 62: 151–157.
- Gasparini P., R. Rabionet, G. Barbujani, S. Melchionda, M. Petersen, K. Brøndum Nielsen, A. Metspalu, E. Oitmaa, M. Pisano, P. Fortina, L. Zelante, X. Estivill & the Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. 2000. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 19–23
- Gravina L.P., M.E. Foncuberta, M. E. Prieto, J. Garrido, C. Barreiro & L. Chertkoff. 2010. Prevalence of *DFNB1* mutations in Argentinean children with non-syndromic deafness. Report of a novel mutation in *GJB2*. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 74: 250-254.
- Green G. E., D.A. Scott, J.M. McDonald, H.F.B Teagle, B.J. Tomblin, L.J. Spencer, G.G. Woodworth, J.F. Knutson, B.J. Gantz, V.C. Sheffield & R.J. Smith. 2002. Performance of cochlear implant recipients with *GJB2*-related deafness. *Am. J. Med. Genet.* 109: 167-170.
- Grimberg J, S. Nawoschik, L. Belluscio, R. McKee, A. Turk & A. Eisenberg. 1989. A simple and efficient nonorganic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 17: 8390.
- Halpin H., G. Owen, G. Gutierrez-Espeleta, K. Sims & H. Rehm. 2005. Audiologic features of Norrie disease. *Annals of Otology & Laryngology* 114:533-538.
- Huesca F. & J. E. Domínguez-Aburto. 2002. Genes, proteínas y mutaciones involucradas en la fisiopatología de la audición. *An. Orl. Mex.* Vol. 47: 17-21
- Kikuchi T., J.C. Adams, Y. Miyabe, E. So & T. Kobayashi. 2000. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med. Electron. Microsc.* 33:51–56.
- Kokotas H., L. Van Laer, M. Grigoriadou, V. Iliadou, J. Economides, S. Pomoni, A. Pampanos, N. Eleftheriades, E. Ferekidou, S. Korres, A. Guinnoulia-Karantana, G. Van Camp & M.

- Petersen. 2008. Strong linkage disequilibrium for the frequent GJB2 35delG mutation in the Greek population. *Am. J. Med. Genet.* 146 : 2879-2884.
- Kokotas H., M. Grigoriadou, M. Villamar, A. Guinnoulia-Karantana, I. del Castillo & M. Petersen. 2010. Hypothesizing an Ancient Greek origin of the GJB2 35delG mutation: Can science meet history?. *Genet. Test. Mol. Bioma* 14: 183-187.
- Larsen L., C. Jespersgaard & P. Andersen. 2007. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis using capillary array electrophoresis (CAE) for large-scale mutation detection. *Nat. Protoc.* 2: 1458 – 1466
- Leal A., C. Berghoff, M. Berghoff, G. del Valle, C. Contreras, O. Montoya, E. Hernandez, R. Barrantes, U. Suchlötzer-Schrehardt, B. Neundörfer, A. Reis, B. Rautenstrauss & D. Heuss. 2003 a. Charcot-Marie-Tooth disease: a novel Tyr145Ser mutation in the myelin protein zero (*MPZ, P0*) gene causes different phenotypes in homozygous and heterozygous carriers within one family. *Neurogenetics* 4:191-197.
- Leal A., S. Endele, C. Stengel, K. Huehne, J. Loetterle, R. Barrantes, A. Winterpacht & B. Rautenstrauss. 2003 b. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene* 312: 165-171.
- León, P., J.A. Bonilla, J.R. Sánchez, R. Vanegas, M. Villalobos, L. Torres, F. León, A.L. Howell & J.A. Rodríguez. 1992. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *P. Nat. Acad. Sci.* 89:5181-5184.
- León, P.E., J A Bonilla, J R Sánchez, R Vanegas, M Villalobos, L Torres, F León, A L Howell, & J A Rodríguez. 1981. Low frequency hereditary deafness in man with childhood onset. *Am. J. Hum. Genet.* 33:209-214
- Liu, Y. P. y H. B. Zhao. 2008. Cellular characterization of Connexin 26 y Connexin 30 expression in the cochlear lateral wall. *Cell Tissue Res.* 333: 395-403.
- Lucotte, G. 2007. High prevalences of carriers of the 35delG mutation of Connexin 26 in the Mediterranean area. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 71: 741-746.
- Lynch ED, M.K Lee, J.E. Morrow , P.L. Welch , P.E. León & MC King. 1997. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* 278:1223-1224.

- Mahdieh N. & B. Rabanny. 2009. Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: A meta-analysis of carrier frequency. *Int. J. Audiol.* 48: 263-370
- Martínez A. R. Acuña, V. Figueroa, J. Maripillan & B. Nicholson. 2009. Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss. *Antioxid. & Redox Sign.* 11: 309-322.
- Mendez I., I. del Castillo, M. Carrillo, M. Vilamar, M. Ponce de León, A. Unriarte & F. Moreno. 2001. Mutaciones del gen de la conexina 26 (GJB2) en familias cubanas con sorderas no sindrómicas autonómicas recesivas. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 20:167-72
- Morell R. J., H.J. Kim, L.J. Hood, L. Goforth, L. K. Friderici, R. Fisher, G. Van Camp, C.I. Berlin, C. Oddoux, H. Ostrer, B. Keats & T.B. Friedman. 1998. Mutations in the Connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *New Engl. J. Med* 339: 1500-1505
- Morton C. & W. Nance. 2006. Newborn hearing screening — A silent revolution. *New Engl. J. Med.* 354: 2151-2164.
- Nickel, R. & A. Forge. 2008. Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Curr. Opin. Otolaryngo.* 16: 452-45.
- Norris W. , K. S. Arnos, W. D. Hanks, X. Xia, W. E. Nance & A. Pandya. 2006. Does universal newborn hearing screening identify all children with *GJB2* (Connexin 26) deafness? Penetrance of *GJB2* deafness. *Ear Hearing* 27: 732-741.
- Orzan, E. & A. Murgia. 2007. Connexin 26 is not always congenital. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 71: 501-507.
- Öztürk B., S. Tokgöz, A. Incesulu. & M. Tekin. 2006. Effects of GJB2 genotypes on the audiological phenotype: Variability is present for all genotypes. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 70: 1687—1694.
- Putcha G. V., B.A. Bejjani, S. Bleoo, J.K. Booker, J. C. Carey, N. Carson, S. Das, M.A. Dempsey, J.M. Gastier-Foster, J.H. Greinwald, Jr., M. L. Hoffmann, L.J. Bone Jeng, M.A. Kenna, I. Khababa, M. Lilley, R. Mao, K. Muralidharan, I.M. Otani, H.L. Rehm, F. Schaefer, W.K. Seltzer, E.B. Spector, M.A. Springer, K.E. Weck, R.J. Wenstrup, S. Withrow, B-L. Wu, M.A. Zariwala & I. Schrijver. 2007. A multicenter study of the frequency and distribution of GJB2 and GJB6 mutations in a large North American cohort. *Genet. Med.* 9: 413-426
- Rehm H., G. Gutierrez-Espeleta, R. García, G. Jimenez, U. Khetarpal, J. Priest, K. Sims, B. Keats & C. Morton. 1997. Norrie disease gene mutation in a large costar rican kindred with novel phenotype including venous insufficiency. *Hum. Mutat.* 9:402-408.

- Rodriguez-Larralde I. & R. Barrantes. 2012. Estructura y relaciones isonímicas en Costa Rica. XII Congreso Latinoamericano de Antropología Biológica. San Jose, Costa Rica.
- Saunders J.E., S. Vaz, J.H. Greinwald, J. Lai, L. Morin & K. Mojica. 2007. Prevalence and Etiology of Hearing Loss in Rural Nicaraguan Children. *Laryngoscope* 117: 387-398.
- Smith R., J.F. Bale & K.R. White. 2005. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 365: 879-890.
- Stong, B., Q. Chang, S. Ahmad & X. Lin. 2006. A Novel Mechanism for Connexin 26 Mutation Linked Deafness: Cell Death Caused by Leaky Gap Junction Hemichannels. *Laryngoscope* 116:2205–2210.
- Tamayo M.L., M. Olarte, N. Gelvez, M. Gómez, J.L. Frías, J.E. Bernal, S. Florez, D. Medina. 2009. Molecular studies in the GJB2 gene (Cx26) among a deaf population from Bogotá, Colombia: Results of a screening program Original Research Article. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 73: 97-101
- Vallejo L.A. 2003. Hipoacusia neurosensorial. Masson, Barcelona, España. 166p.
- Walsh P., D.A. Metzenger & R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a medium for the simple extraction of DNA for PCR-bases typing for forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513
- Wilcox S., A. Osborn & H.H. Dahl. 2000. A simple PCR test to detect the common 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Mol. Diagn.*5: 75-78.
- Wu C., Y.C. Lee, P.J. Chen & C.J. Hsu. 2008. Predominance of genetic diagnosis and imaging results as predictors in determining the speech perception performance outcome after cochlear implantation in children. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 162:269-276

Referencias de Internet:

- Xavier Estivill & Paolo Gasparini. 2013. The Connexin-deafness Homepage. Deafness Research Group. España. (Consultado el 23 de enero del 2013, <http://davinci.crg.es/deafness/index.php>)

ANEXOS

2.5 Sordera (1) sindrómica (2) no sindrómica (pasar a 3.1)

2.5.1 Especifique el Síndrome _____

3- Historia Prenatal

3.1 Infecciones Prenatales: Si (1) No (2) (pasar a 3.2)

3.1.1 Especifique: _____ TORCH

3.2 Duración de la gestación: Pretérmino (1) Término (2) Postérmino (3)

3.3 APGAR: Si (1) No especifica (2) (pasar a 3.4)

3.3.1 APGAR al **1 min:** 1-3 (1) 3-5 (2) 5-7 (3) 8-10 (4)

3.3.2 APGAR **5 min:** 1-3 (1) 3-5 (2) 5-7 (3) 8-10 (4)

3.4 Complicaciones del parto Ninguna (1) Sufrimiento fetal (2)

3.5 Peso al nacer: menos de 1000 g (1) 1001-1500 g (2) 1501-2000 g (3)

Mayor a 2001(4) No específica (5)

3.6 Malformaciones congénitas al nacer: Hay (1) No hay (2) (pasar a 4.1)

3.6.1 Si hay, especifique: _____

4- Historia Neonatal

4.1 Patologías del neonato: Sepsis neonatal (1) Hiperbilirrubinemia (2)

Ninguna (3) Otra (4) _____

4.2 Egreso con la madre 1-3 d (1) 3-7 d (2) más de 7 d (3) No especifica (4)

5- Historia del Lactante

5.1 Infecciones del lactante: Si (1) No (2) (pasar a 5.2)

5.1.1 Especifique: _____

5.2 Internamientos: Si (1) No (2) (pasar a 5.4)

5.2.1 Especifique _____

5.3 Manejo en UTI: Si (1) No (2) (pasar a 5.4)

5.3.1 Especifique _____

5.4 Vacunación: Completa (1) Incompleta (2)

6- Historia Familiar

6.1 Antecedentes heredofamiliares de Sordera Si (1) No (2) (pasar a 6.2)

6.1.1 Favor anotar el parentesco _____

6.2 Datos de la Madre

6.2.1 Cédula: _____

6.2.2 Profesión: _____

6.2.3 Nacionalidad Costarricense (1) Otro (2): _____ (pasar a 6.2.7)

6.2.4 Provincia de origen: San José (1) Alajuela (2) Cartago (3) Heredia (4)
Guanacaste (5) Puntarenas (6) Limón (7)

6.2.5 Cantón _____ 6.2.6 Distrito _____

6.2.7 Edad de paridad 15 a 20 (1) 21 a 35 (2) 36 a más (3)

6.2.8 Patologías asociadas a la gestación: Si (1) No (2) (pasar a 6.2.9)

6.2.8.1 Especifique el si: (1) DM (2) HTA (3) Infecciones (4) Otra

6.2.9 Usos de drogas o sustancias nocivas Si (1) No (2)

6.3 Datos del padre

6.3.1 Cédula _____

6.3.2 Profesión: _____

6.3.3 Nacionalidad Costarricense (1) Otra (2): _____ (pasar a 6.3.7)

6.3.4 Provincia de origen: San José (1) Alajuela (2) Cartago (3)
Heredia (4) Guanacaste (5) Puntarenas (6) Limón (7)

6.3.5 Cantón _____ 6.3.6 Distrito _____

6.3.7 Usos de drogas o sustancias nocivas Si (1) No (2)

6.4 Es matrimonio consanguíneo: Si (1) No (2) (pasar a 7.1) Desconocido (3) (pasar a 7.1)

6.4.1 (1) Tío (a) Sobrino (a) (2) primos hermanos (3) Primos segundos

(4) Primos terceros (5) Otro 6.4.2 Especificar _____

7- Tratamiento

7.1 Prótesis auditivas (1). Si (2). No (pasar a 7.5)

7.1.1 Prótesis auditiva (1). Unilateral (2). bilateral

7.1.2. Edad en la que se puso la prótesis auditiva

0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.1.3 Tiempo durante el cual utilizó/ha utilizado audifonos:

0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.1.4 Cantidad de años entre la aparición de la sordera y la colocación de la prótesis auditiva

0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.2 Terapia de lenguaje oral: (1) Si (2) No (pasar a 7.3)

7.2.1 A que edad empezó la terapia del lenguaje oral:

0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.2.2 Duración de terapia oral

< 1 año (1) 1-3 años(2) 3-5años(3) > 5 años(4)

7.3 Valoración por Trabajo Social: (1). Si (2). No (pasar a 7.4)

7.3.1 Aprobado: (1). Si (2). No 7.3.2 Especifique _____

7.4 Valoración por Psicología: (1). Si (2). No (pasar a 7.5)

7.4.1 Adecuado (1). Si (2). No 7.4.2 Especifique _____

7.5 Candidato a Implante coclear: (1). Si (2). No (pasar a 8.1)

7.5.1 Implante Coclear Realizado (1). Si (2). No

7.5.2 Marca del implante coclear (marcar una de las siguientes)

(1). Advanced Bionics 7.5.2.1 Especifique Modelo _____

(2). Cochlear 7.5.2.2 Especifique Modelo _____

(3). Medel 7.5.2.3 Especifique Modelo _____

(4). Neurolec 7.5.2.4 Especifique Modelo _____

(5). Otro: _____ 7.5.2.5 Especifique Modelo _____

7.5.3 Edad a la cual se colocó el implante coclear (en sordera prelingual)

(excluyente con 7.5.4) 0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.5.4 Edad a la cual se colocó el implante coclear (en sordera post-lingual)

0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.5.5 Cantidad de años entre prótesis auditiva y momento del implante coclear

0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.5.6 Cantidad de años entre aparición de sordera y momento de implante coclear

0-4 años (1) 4-8 años (2) 8-12 años (3) 12 o más años (4)

7.5.7 Complicaciones (1)Si 7.5.7.1 Especifique _____ (2) No (pasar a 8.1)

8- Genética

8.1 Estudio de genética anterior: Si (1) No(2) (pasar a 8.2)

8.1.1 Favor anotar el diagnóstico obtenido en estas pruebas: _____

8.2 Califica para estudio genético: Si(1) No(2) (pasar a 9.1)

8.2.1 Conexina 26 Si(1) No(2)

9- Resultados

9.1 Otoscopia: (1) Si (2) No (pasar a 9.2)

9.1.1 Resultado: (1) Normal (2) Anormal 9.1.2 Especifique_____

9.2 Audiometría: (1) Si (2) No (pasar a 9.3)

9.2.1 Resultado: (1) Normal (2) Anormal 9.2.2 Especifique_____

9.3 Juguetes Sonoros : (1) Si (2) No (pasar a 9.4)

9.3.1 Resultado: (1) Normal (2) Anormal 9.3.2 Especifique_____

9.4 Impedanciometria (1) Si (2) No (pasar 9.5)

9.4.1 Resultado: (1) Normal (2) Anormal 9.4.2 Especifique_____

9.5 EOA (1) Si (2) No (pasar a 9.6)

9.5.1 Resultado (1) Normal (2) Anormal 9.5.2 Especifique_____

9.6 PEA (1) Si (2) No (pasar a 9.7)

9.6.1 Resultado: (1) Normal (2) Anormal 9.6.2 Especifique_____

9.7 TAC (1) Si (2) No (pasar a 9.8)

9.7.1 Resultado (1) Normal (2) Anormal 9.7.2 Especifique_____

9.8 RMN 1) Si (2) No (pasar a 9.9)

9.8.1 Resultado (1) Normal (2) Anormal 9.8.2 Especifique_____

9.9 Audiometría CON TRATAMIENTO Actual: (1) Si (2) No (pasar a 10.1)

9.9.1 Grado de sordera con tratamiento

Leve (1) Moderada (2) Grave (3) Profunda (4)

10.Resultado etiología

10.1 (1) GENETICO (2) ADQUIRIDO (3) DESCONOCIDO

10.2 Especifique_____

Anexo 2: Consentimiento informado firmado por los sujetos de la muestra de población de referencia de la MSc. Sandra Silva de la Fuente.

<p><i>Laboratorio de Análisis Clínicos y Moleculares, S.A.</i> L.A.C.Y.M.</p> <p>CONDICIONES ESPECÍFICAS PARA REALIZAR EL ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FILIACIÓN POR ANÁLISIS DEL ADN</p>	<p>CÓDIGO: RC-09</p> <p>CONSECUTIVO: 13112062</p>
--	--

Se les van a tomar muestras biológicas para realizar el estudio de marcadores genéticos para la determinación de filiación por análisis del ADN. De acuerdo con la Legislación de Costa Rica, ustedes deben saber que:

1. Esta es una prueba que debe ser informada y voluntaria.
2. **L.A.C.Y.M.** no realiza el estudio de marcadores genéticos, sin la previa autorización de TODOS los participantes mayores de edad, por lo que requiere la expresa autorización por medio de su firma en el documento que se facilita para tal función.
3. A continuación se detallan posibles casos que pueden requerir de este tipo de estudio y que deben ser conocidos por ustedes:
 - Caso 1: Si todas las personas participantes son mayores de edad, deben firmar el documento de autorización.
 - Caso 2: Participantes menores de edad
 - Caso 2.1: Si se trata del niño o niña en estudio, la o las personas que ejercen la Patria Potestad o custodia del menor al momento de efectuarse el estudio deben conceder su autorización por medio de la firma en los documentos pertinentes.
 - Caso 2.2: Si la madre es menor de edad, para todos los actos relacionados con sus hijos, la Ley Costarricense las considera mayores, por lo que ellas mismas pueden autorizar la prueba.
 - Caso 2.3: Si el presunto padre es menor de edad la autorización la otorga cualquiera de los padres o encargados de éste
 - Caso 3: Cuando el presunto padre a probar NO es el padre registral, es necesaria la autorización escrita del padre en ejercicio de la Patria Potestad. Cuando esta autorización no se firma en las instalaciones de **L.A.C.Y.M.** en presencia de sus funcionarios, debe ser aportada por los participantes y autenticada por un Notario.
4. Las muestras de sangre se recogen en tarjetas absorbentes diseñadas para este fin. Es requerido que las personas revisen que la tarjeta se encuentre completamente limpia y codificada. Una vez efectuada esta revisión las participantes mayores de edad deben firmar en el espacio establecido para esto en la tarjeta.
5. Deben indicar si alguno de los participantes en el estudio ha sido sometido a un trasplante de médula ósea o ha recibido, en las últimas seis semanas, una transfusión sanguínea.

Sí ¿Quién? _____ No
6. Deben aportarse original y fotocopia de las respectivas identificaciones (cédulas de identidad, residencia o pasaportes vigentes) y del certificado de nacimiento o pasaporte, en el caso de los menores. Si al momento de presentarse a la toma de las muestras, los participantes no portan sus identificaciones, la entrega de resultados de cada caso no procede, hasta tanto no se cumpla con este requisito.

-Favor firmar al concluir la lectura de esta página-

<p><i>Laboratorio de Análisis Clínicos y Moleculares, S.A.</i> <i>L.A.C.Y.M.</i></p> <p>CONDICIONES ESPECÍFICAS PARA REALIZAR EL ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FILIACIÓN POR ANÁLISIS DEL ADN</p>	<p>CÓDIGO: RC-09</p> <p>CONSECUTIVO: 13112062</p>
--	--

7. En todos los casos antes enumerados, L.A.C.Y.M., S.A., entrega un original impreso de los resultados a cada uno de los adultos que participaron en la prueba. Los menores de edad, al cumplir 18 años, pueden reclamar una copia del resultado que les afecte. Por ningún motivo o circunstancia se dan resultados por teléfono o se envían por fax. Los resultados deben ser retirados, por las personas implicadas o se les remiten por encomienda, cuando viven fuera del área metropolitana o por correo cuando viven fuera del país. Para entregar resultados a persona diferente, los interesados tienen, en este acto, que autorizar por escrito, la entrega.
8. **L.A.C.Y.M.** garantiza el análisis y la confidencialidad de los resultados de todos los estudios que realiza. Además, certifica el origen de las muestras tomadas por sus funcionarios asegurando su custodia permanente, pero no puede garantizar ni certificar el origen de las muestras que recibe del exterior.
9. Las muestras biológicas, permanecerán en custodia de **L.A.C.Y.M.**, y podrán ser usadas anónimamente, para estudios genéticos, poblacionales y/o de validación de nuevos marcadores.
10. Cualquier participante por su libre elección puede solicitar la suspensión del estudio antes de firmar la autorización o antes de la toma de la muestra, cancelando a **L.A.C.Y.M.**, los costos incurridos hasta el momento de la suspensión.
11. El costo del estudio es de 180.000,00 colones (CIENTO OCHENTA MIL COLONES), los cuales también pueden pagarse en moneda nacional al tipo de cambio oficial de compra del día de firma de este documento. Es condición indispensable cubrir la totalidad del costo del estudio para retirar el informe final de los resultados. No abonar parte o la totalidad de la prueba ocho semanas después de firmado el presente documento **L.A.C.Y.M.** recurrirá a la vía Judicial para cobrar la misma.
12. El tiempo de entrega de los resultados es de CINCO días hábiles luego de la toma de todas las muestras de los participantes.

Declaración

Nosotros, los abajo firmantes declaramos haber leído, entendido y aceptado las condiciones arriba señaladas y estamos dispuestos a someternos al estudio de marcadores genéticos para la determinación de filiación por análisis de ADN:

-Favor firmar al concluir la lectura de esta página-

La abajo firmante, declara que se han seguido los procedimientos indicados y que los interesados, antes de firmar han manifestado comprender las implicaciones de la prueba.

Sello

Fecha

Dra. Sandra Ma. Silva de la Fuente, M. Sc.
Directora Técnica
(M.Q.C. Código N° 491)

Anexo 3: Ejemplos de regiones del gen GJB2 donde que puede ocurrir autodimerización o formación asas pequeñas.

Potential hairpin formation Foward :

5'

AGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTGGTCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGT
CTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTTCGTCCTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGT
AGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAA
GATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGA
TGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
CATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCA
CGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGA
CATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAG**CATCT**
TCT 3'

5'

AGG**TTGTGTA**AGAGTTGGTGTGGTCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGT
CTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTTCGTCCTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGT
AGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAA
GATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGA
TGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
CATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCA
CGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGA
CATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCT**TACACA**AGCAGCATCT
TCT 3'

5'

AGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTGGTCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGT
CTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTTCGTCCTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGT
AGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACT**TCCACCA**GCATTGGAAA
GATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGA
TGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
CATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCA

CGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGA
 CATCGAGGAGATCAAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCT
 TCT 3'

Potential hairpin formation Reverse:

5'

AGAAGATGCTGCTTGTGTAGGTCCACCACAGGGAGCCTTCGATGCGGACCTTCTGGGTTTTGATCTCCTCGA
 TGTCCTTAAATTCACCTTTATCTCCCCCTTGATGAACTTCCTCTTCTCATGTCTCCGGTAGGCCACGTGC
 ATGGCCACTAGGAGCGCTGGCGTGGACACGAAGATCAGCTGCAGGGCCCATAGCCGGATGTGGGAGATG
 GGGAAAGTAGTGATCGTAGCACACGTTCTTGCAGCCTGGCTGCAGGGTGTTCAGACAAAGTCGGCCTGCTC
 ATCTCCCCACACCTCCTTTGCAGCCACAACGAGGATCATAATGCGAAAAATGAAGAGGACGGTGAGCCAGA
 TCTTTCAATGCTGGTGGAGTGTGGTTTTCACACCCCCAGGATCGTCTGCAGCGTGCCCAATCCATCTTCTA
 CTCTGGGCGTTTTGCTCTGGAAAAGACGAATGCACACAACACAGGAATCACTAGCTAGGACAGAACAGGG
 AGACTTCTCTGAGTCTGGGTAAGCAAGCATGCTTAAATCTTCTCTGAGCAAACACCAACTCTTACACAACCT

3'

5'

AGAAGATGCTGCTTGTGTAGGTCCACCACAGGGAGCCTTCGATGCGGACCTTCTGGGTTTTGATCTCCTCGA
 TGTCCTTAAATTCACCTTTATCTCCCCCTTGATGAACTTCCTCTTCTCATGTCTCCGGTAGGCCACGTGC
 ATGGCCACTAGGAGCGCTGGCGTGGACACGAAGATCAGCTGCAGGGCCCATAGCCGGATGTGGGAGATG
 GGGAAAGTAGTGATCGTAGCACACGTTCTTGCAGCCTGGCTGCAGGGTGTTCAGACAAAGTCGGCCTGCTC
 ATCTCCCCACACCTCCTTTGCAGCCACAACGAGGATCATAATGCGAAAAATGAAGAGGACGGTGAGCCAGA
 TCTTTCAATGCTGGTGGAGTGTGGTTTTCACACCCCCAGGATCGTCTGCAGCGTGCCCAATCCATCTTCTA
 CTCTGGGCGTTTTGCTCTGGAAAAGACGAATGCACACAACACAGGAATCACTAGCTAGGACAGAACAGGG
 AGACTTCTCTGAGTCTGGGTAAGCAAGCATGCTTAAATCTTCTCTGAGCAAACACCAACTCTTACACAACCT

3'

5'

AGAAGATGCTGCTTGTGTAGGTCCACCACAGGGAGCCTTCGATGCGGACCTTCTGGGTTTTGATCTCCTCGA
 TGTCCTTAAATTCACCTTTATCTCCCCCTTGATGAACTTCCTCTTCTCATGTCTCCGGTAGGCCACGTGC
 ATGGCCACTAGGAGCGCTGGCGTGGACACGAAGATCAGCTGCAGGGCCCATAGCCGGATGTGGGAGATG
 GGGAAAGTAGTGATCGTAGCACACGTTCTTGCAGCCTGGCTGCAGGGTGTTCAGACAAAGTCGGCCTGCTC
 ATCTCCCCACACCTCCTTTGCAGCCACAACGAGGATCATAATGCGAAAAATGAAGAGGACGGTGAGCCAGA
 TCTTTCAATGCTGGTGGAGTGTGGTTTTCACACCCCCAGGATCGTCTGCAGCGTGCCCAATCATCTTCTA

CTCTGGGCGGTTTGTCTGGAAAAGACGAATGCACACAACACAGGAATCACTAGCTAGGACAGAACAGGG
 AGACTTCTCTGAGTCTGGGTAAGCAAGCATGCTTAAATCTTCTCTGAGCAAACACCAACTCTTACACAACCT
 3'

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

5'
 AGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTGTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGT
 CTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTCGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGT
 AGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAA
 GATCTGGCTCACCGTCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGA
 TGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCC**TGCAGCCAGGCTGCA**AGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
 CATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCA
 CGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGA
 CATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCT
 TCT

3'

3'

TCTTCTACGACGAACACATCCAGGTGGTGTCCCTCGGAAGCTACGCCTGGAAGACCCAAAACCTAGAGGAGC
 TACAGGAATTTAAGTGAGAAATAGAGGGGAACTACTTGAAGGAGAAGAAGAGTACAGAGGCCATCCGG
 TGCACGTACCGGTGATCCTCGCGACCGCACCTGTGCTTCTAGTCGACGTCCCGGGTATCGGCCTACACCCTC
 TACCCCTTCATCACTAGCATCGTGTGCAAGA**ACGTCGGACCGACGT**CCCACAACGTCTGTTTCAGCCGGACG
 AGTAGAGGGGTGTGGAGGAAACGTCGGTGTGCTCCTAGTATTACGCTTTTTACTTCTCCTGCCACTCGGTC
 TAGAAAGGTTACGACCACCTCACAACAAGTGTGGGGGGTCTAGCAGACGTCGCACGGGGTTAGGTAGA
 AGATGAGACCCGCCAAACGAGACCTTTTCTGCTTACGTGTGTTGTGTCCTTAGTGATCGATCCTGTCTTGCC
 CTCTGAAGAGACTCAGACCCATTCGTTCTGACGAATTTAGAGAAGGACTCGTTTGTGGTTGAGAATGTGTTG
 GA

5'

5'

AGGTTGTGTAAGAGTTGGT**GTTTGCTCAGGAA**GAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGT
 CTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTCGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGT
 AGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAA

GATCTGGCTACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGA
 TGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
 CATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCA
 CGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGA
 CATCGAGGAGATCAAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCT
 TCT

3'

3'

TCTTCTACGACGAACACATCCAGGTGGTGTCCCTCGGAAGCTACGCCTGGAAGACCCAAAAGTAGAGGAGC
 TACAGGAATTTAAGTGAGAAATAGAGGGGGAAGTACTTGAAGGAGAAGAAGAGTACAGAGGCCATCCGG
 TGCACGTACCGGTGATCCTCGCGACCGCACCTGTGCTTCTAGTCGACGTCCCGGGTATCGGCCTACACCCTC
 TACCCCTTCATCACTAGCATCGTGTGCAAGAACGTCCGACCGACGTCCCACAACGTCTGTTTCAGCCGGACG
 AGTAGAGGGGTGTGGAGGAAACGTCCGGTGTGCTCCTAGTATTACGCTTTTTACTTCTCCTGCCACTCGGTC
 TAGAAAGGTTACGACCACCTCACAAACAAGTGTGGGGGGTCTAGCAGACGTGCACGGGGTTAGGTAGA
 AGATGAGACCCGCAAAACGAGACCTTTCTGCTTACGTGTGTTGTGTCCTTAGTGATCGATCCTGTCTTGCC
 CTCTGAAGAGACTCAGACCCATTCGTTCTGACGAATTTAGAGAAGGACTCGTTTGTGGTTGAGAATGTGTTG
 GA

5'

5'

AGGTTGTGTAAGAGTTG**GTGTTTGCTCA**GGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGT
 CTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCCTGTGTTGTGTGCATTCGTCTTTCCAGAGCAAACCGCCAGAGT
 AGAAGATGGATTGGGGCAGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAA
 GATCTGGCTACCGTCCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGA
 TGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
 CATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCA
 CGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGA
 CATCGAGGAGATCAAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCT
 TCT

Anexo 4: Primers diseñados por el Dr. Pedro León (no publicado)

AACCACAGCCCACAATTATAATGCACTGTTGCAGCACTTATCAAAACAGATATGCTAACTGAGCCATCAGTG
 CCAGCCTGACAGTGAGGCCACCAAGCCATCCACAAAGCCTACACGAAAGTCTGTGCTCACAGTGGCTTTTCT
 CCATGAAGAGGGCATTCTTAACCTCTTCTTTACGTAGGAGGAAGCAAGGTCCTTTGTAAAATTTAACTC
 GGGGTGCCTCAAATGTAACTTAACCACTGGTAACAACAGTTTCACTGCTACATGCCACGTCTGTGAAAATT
 CATTCAAGACATTAAGGAAAGTGGCTCAGCAGAGAGACTAGACATCTTATCCTCACGGTTCTCCTGTACTTG
 GCCTCTCAGCCTTTGAGCAAGGTTGGCCCAAGCTAGTATCGGCCCCAGTGGTACAGCCAAAACCTTGAGACT
 GCAAATGGATGCAGCTGTTGAACGCTGAGTAACTTCTGCAGAGTCAGGAAGACCCAAGGAAGCTCTGCAG
 AGGATGCAGGGGTACGGTCAGAACCCMTGAGTGCCTTTCAGCTAACGAGGACTTTATGACTCTCCCAGC
 ACAGCAAATTTTTATGATGTGTTAAAGATTGGGTGAATTACTCAGGTGAACAAGCTACTTTTTATCAGAGA
 ACACCTAAAAACACGTTCAAGAGGGTTGGGAACTATACATTTAATCCTATGACAAAACCTAAGTTGGTTCTGT
 CTTACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTGTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTAC
 CCAGACTCAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTCTGTTTTCCAGA
 GCAAACCGCCCAGAGTAGAA GATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGTGTGAACAAACACT
 CCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAA
 GGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGTGCAAGAACGTGTGC
 TAGCATCACTACTTCCCCATCTCCCA CATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGC
 TCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAA
 GAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACC
 TACACAAGCAGCATCTTCTCCGGGTCATCTTCAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACG
 GCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGAACGCCTGGCCTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCC
 GGCCACGGAGAAGACTGTCTTACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCA
 CTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAGCCA GTTTAACGCATTGCCAGTT
 GTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCY
 AGCATTTCACAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACT
 CCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTT
 TCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAAGTACTTTTCATATTTT
 AAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACAC
 AGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCT
 TTCA

L1 / R1

L2 / R2

L3 / R3

Anexo 5: Primers utilizados (en rosado se marcan los sitios de mutación más frecuentes para este gen).

AACCACAGCCCACAATTATAATGCACTGTTGCAGCACTTATCAAAACAGATATGCTAACTGAGCCATCAGTG
 CCAGCCTGACAGTGAGGCCACCAAGCCATCCACAAAGCCTACACGAAAGTCTGTGCTCACAGTGGCTTTTCT
 CCATGAAGAGGGCATTCTAACCTCTTCTTTACGTAGGAGGAAGCAAGGTCCTTTGTAATAATTTAACTC
 GGGGTGCCTCAAATGTAACTTAACCACTGGTAACAACAGTTTCACTGCTACATGCCACGTCTGTGAAAATT
 CATTCAAGACATTAAGGAAAGTGGCTCAGCAGAGAGACTAGACATCTTATCCTCACGGTTCTCCTGTACTTG
 GCCTCTCAGCCTTTGAGCAAGGTTGGCCCAAGCTAGTATCGGCCCCAGTGGTACAGCCAAAATTGAGACT
 GCAAATGGATGCAGCTGTTGAACGCTGAGTAACTTCTGCAGAGTCAGGAAGACCCAAGGAAGCTCTGCAG
 AGGATGCAGGGGTACGGTCAGAACCCMTGAGTGCCTTTCAGCTAACGAGGACTTTATGACTCCCCAGC
 ACAGCAAATTTTTATGATGTGTTAAAGATTGGGTGAATTACTCAGGTGAACAAGCTACTTTTTATCAGAGA
 ACACCTAAAAACAGTTCAGAGGGTTTGGGAACTATACATTTAATCCTATGACAACTAAGTTGGTTCTGT
 CTTACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTGTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTAC
 CCAGACTCAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTCTTTCCAGA
 GCAAACCGCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGTGTGAACAAACT
 CCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCTCTTCATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAA
 GGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCGTCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGC
 TACGATCACTACTTCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCTGTCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGC
 TCCTAGTGGCCATGCAGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAA
 GAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACC
 TACACAAGCAGCATCTTCTTCGGGTCATCTTCAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACG
 GCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGAACGCCTGGCCTTGCCCAACTGTGGACTGCTTTGTGTCCC
 GGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCA
 CTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAGCCAGTTTAACGCATTGCCAGTT
 GTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCY
 AGCATTTCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACT
 CCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTT
 TCTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAAGTACTTTCATATTTT
 AAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACAC

Anexo 6: Consentimiento informado aprobado por el CLOBI del CENDEISS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

"ESTUDIO DE LAS SORDERAS NEUROSENSORIALES AL NACIMIENTO, EN LA INFANCIA O EN LA EDAD ADULTA TEMPRANA Y SU EVENTUAL TRATAMIENTO EN PACIENTES ATENDIDOS EN EL SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA DEL HOSPITAL MÉXICO CCSS"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Dr. Julián Chaverri Polini
Médico Especialista en Otorrinolaringología.
Hospital México. CCSS
Teléfono 2426705

Médicos participantes:

Dra. Adriana Vega Rodríguez
Residente del Servicio de Otorrinolaringología, Subinvestigador
Hospital México. CCSS
Teléfono: 8175532

Dr. Roy Francisco Acosta Valerín
Residente del Servicio de Otorrinolaringología, Subinvestigador
Hospital México. CCSS
Teléfono: 899 7576

Dr. Sebastián Malek Quesada
Asistente del Servicio de Otorrinolaringología
Hospital México. CCSS

Dr. Andrés Obando Valverde
Asistente del Servicio de Otorrinolaringología
Hospital México. CCSS

Dr. Freddy Chaves Brenes
Asistente del Servicio de Otorrinolaringología
Hospital México. CCSS

Dr. Gerson Rivas
Residente del Servicio de Otorrinolaringología
Hospital México. CCSS

Dr. Eladio Valverde
Asistente del Servicio de Otorrinolaringología
Hospital México. CCSS

CENTRO ASISTENCIAL Y SERVICIO:

Servicio de Otorrinolaringología, Hospital México CCSS



Explicación General:

La sordera es un padecimiento que puede ser causado por defectos en el oído que no dejan escuchar bien, o no dejan escuchar del todo. Pueden ser causadas por enfermedades, uso de medicamentos dañinos y otras pueden ser de causa genética (heredadas de nuestros padres).

Las sorderas que son heredadas, también llamadas sorderas genéticas, pueden ser de dos formas. La primera que nuestro padre o nuestra madre sea sordo(a) y nos pasan la enfermedad o que ninguno sea sordo pero que tengan un gen con un defecto "escondido" que al unirse al momento de la concepción hagan que se presente la enfermedad.

Con este estudio se desea conocer las causas de la sordera en Costa Rica con el propósito de entender la enfermedad y ver cuáles son las mejores opciones de tratamiento.

Usted no esta obligado a participar. Su atención médica en la CCSS u otro centro de salud no esta relacionada de ninguna manera con su participación en este estudio. Esto quiere decir que la decisión de participar o no participar, no afecta de ninguna manera la atención de su salud.

Procedimientos del estudio:

Al participar voluntariamente en el estudio estos son los pasos que van a seguir los investigadores:

- 1- Si usted ha recibido tratamiento médico en algún centro de salud, sus expedientes médicos podrían ser revisados por los investigadores.

Si usted forma parte del estudio genético:

Le será solicitada una muestra de sangre del dedo. El ADN es el material genético que contiene la información genética que heredamos de nuestra madre y nuestro padre. Este se saca de la sangre y será usado por los investigadores de la Universidad de Costa Rica para buscar ahí a dentro si existe un daño que sea el que causa la sordera.

Dependiendo de la disponibilidad, nos gustaría pedir además a otros miembros de su familia que participen en el estudio. Usualmente serán los padres y hermanos. A estos parientes se les pedirá una muestra de sangre. Mantendremos su muestra dentro del estudio aunque los miembros de su familia decidan no participar

Muestras:

Las muestras de sangre serán tomadas por punción en la yema del dedo y la sangre será puesta en un papel que es especial para eso. Estas serán guardadas y analizadas en el Centro de Biología Celular y Molecular de la UCR.

Su muestra será rotulada con un número (que es un número de identificación personal diferente al de su cédula) para proteger su privacidad. Este número es parte de un código que será guardado bajo llave. Todos sus datos se consideran información confidencial y como tal serán protegidos.

Riesgos y molestias:

En principio la toma de la muestra no conlleva ningún riesgo que afecte la salud o bienestar del participante. Sin embargo podría causarle algunas incomodidades como:



dolor en el dedo por algunos minutos después de la toma de la muestra. Ocasionalmente puede producir un morete.

Si su participación en el estudio le ocasiona algún daño, puede contactar al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital México al teléfono 2426705. El daño producido será atendido en dicho Servicio siempre y cuando sea producto de alguno de los procedimientos de la investigación.

Pruebas Genéticas:

Se extraerá el ADN (material genético) de la muestra de sangre tomada, después de la firma de este consentimiento. Luego se buscará si ahí existe algún problema que pueda relacionarse con la causa de su sordera.

Los resultados de estos exámenes se le entregarán al médico tratante.

Beneficios para el paciente:

En forma general con su participación será posible aprender más acerca de las causas de la sordera en nuestro país, aportando a la ciencia mayores conocimientos y a otros pacientes mejores posibilidades de tratamiento en el futuro

Si su sordera es de causa desconocida se intentará con las pruebas genéticas, contar con un diagnóstico más completo de las posibles causas de su sordera y permitir al médico tratante un mejor entendimiento de la enfermedad.

Opciones del participante:

Como ya se le indicó, usted puede escoger o no participar en el estudio.

Privacidad de la información:

Las únicas personas que sabrán que usted ha participado en este estudio son los investigadores. Como resultado de su participación, existe una posible pérdida de privacidad al conversar con el médico sobre diferentes cosas que han pasado en su vida. Su sangre y muestras de ADN serán identificadas con un número que no incluye ningún dato personal. La confidencialidad será respetada. Ninguna información suya será ofrecida a otras personas sin su permiso por escrito. Cuando los resultados de la investigación sean publicados o discutidos en conferencias, no se incluirá ninguna información que revele su identidad.

Costo por participar:

Ni a usted ni a ningún miembro de su familia se le solicitará dinero por su participación en esta investigación.

Pagos por participar:

No hay pago por participar en el estudio.

Casos de lesión o cuidados de emergencia:

Si usted sufriera algún daño como resultado directo de los procedimientos de la investigación, recibirá el tratamiento en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital México. La Universidad de Costa Rica, ni el Hospital México proveerán ninguna otra forma de compensación por daños.

Nueva información generada durante el desarrollo del estudio:

En el presente estudio se generará nueva información acerca de las causas de sordera en nuestro país y cual sería en un futuro la mejor opción de tratamiento.

Personas a las cuales puede acudir el paciente:

En caso de que usted sufra un problema o daños relacionados con la investigación, así como cualquier duda, por favor contacte inmediatamente a alguno de los investigadores de la siguiente lista:

Dr. Julián Chaverri Polini, Teléfono: 22426705
 Dra. Adriana Vega Rodríguez Teléfono 22426704
 Dr. Roy Francisco Acosta Valerín. Teléfono: 22426704

ACUERDO:

Su participación en este estudio es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, esto no afectará su relación con sus médicos o el personal involucrado en la investigación, o con los derechos a servicios de salud u otros servicios que le corresponden. Si usted decide dejar de participar en cualquier momento aunque no haya terminado la investigación, puede hacerlo sin que esto interfiera con su atención y cuidados futuros.

Si usted acepta participar en este estudio, usted puede retirar su consentimiento y discontinuar su participación en cualquier momento sin consecuencias adversas. Usted no está renunciando a ningún derecho por su participación en este estudio. Si tiene alguna pregunta en relación con sus derechos como sujeto de investigación puede contactar al Comité Local de Bioética Hospital México Tel 2242-6589 o al Comité Institucional de Bioética en Investigación COIBI-CCSS Tel 2519-3044 bioetica@ccss.sa.cr No dude en contactarse con nosotros en caso de tener alguna duda.

Si el paciente es menor de edad la autorización será dada por el tutor legal del menor. En este caso la firma de este documento no afecta de ninguna manera los derechos legales del tutor sobre el menor.

CONSENTIMIENTO

Yo he leído (o alguien ha leído para mí) la información que se detalló anteriormente. Se me ha dado la oportunidad de preguntar. Todas mis preguntas fueron respondidas satisfactoriamente. He decidido, voluntariamente, firmar este documento para poder participar en este estudio de investigación.

 Nombre del participante Cédula Firma Fecha _____ a.m./p.m.
 Hora

 Nombre del representante Cédula Firma Fecha _____ a.m / p.m.
 legal Hora

 Nombre del testigo Cédula Firma Fecha _____ a.m / p.m.
 Hora



Yo he explicado personalmente el estudio de investigación al participante y he respondido a todas sus preguntas. Creo que él (ella) entiende la información descrita en este documento de consentimiento informado y consiente libremente en participar en esta investigación.

 Nombre del investigador/
 Persona que obtiene el
 consentimiento

 Cédula

 Firma

 Fecha

 Hora

a.m/ p.m.

	COIBI	
COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN		
Versión:	22/04/2008	
Fecha Recomendación:	24/04/2008	
Recomendación vigente hasta:	25/04/2009	
Presidente COIBI:	